UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ÁLVARO HENRIQUE MELLO JOSÉ

Avaliação da hidrólise enzimática do sabugo de milho após pré-tratamento em extrusora de dupla rosca para obtenção de açúcares

LORENA – SP

2018

ÁLVARO HENRIQUE MELLO JOSÉ

Avaliação da hidrólise enzimática do sabugo de milho após pré-tratamento em extrusora de dupla rosca para obtenção de açúcares

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues

Versão Original

LORENA – SP
2018

NÃO AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, SERÁ DISPONIBILIZADO AUTOMATICAMENTE APÓS 2 ANOS DA PUBLICAÇÃO

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

José, Álvaro Henrique Mello
Avaliação da hidrólise enzimática do sabugo de milho após pré-tratamento em extrusora de dupla rosca para obtenção de açúcares / Álvaro Henrique Mello José; orientadora Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues - Versão Original. - Lorena, 2018.
73 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018
Orientadora: Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues

1. Extrusão. 2. Pré-tratamento. 3. Sabugo de milho. 4. Hidrólise enzimática. I. Título. II. Rodrigues, Rita de Cássia Lacerda Brambilla, orient.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e acima de tudo, a Deus e ao meu Santo Anjo da Guarda pela companhia e força cedidas a mim;

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da EEL – USP;

À bolsa concedida pela Capes;

À Novozymes pela doação da enzima utilizada no desenvolvimento do projeto;

À Professora Rita Rodrigues, minha querida orientadora;

À Professora Esperidiana do IPEN pelo auxílio com o uso da extrusora na realização do pré-tratamento;

Ao Professor Durval pelo auxílio com o MEV e DRX;

Aos técnicos do DEBIQ por todo e fundamental apoio operacional, em especial ao Paulinho, Nicamor, Bárbara, Dijalma, Zé Cobrinha e Zé Moreira.

À minha família e amigos do meu coração, por todo o apoio;

A todos aqueles que me ajudaram a ser quem eu sou hoje.

Muito obrigado!

RESUMO

JOSÉ, A.H.M. **Avaliação da hidrólise enzimática do sabugo de milho após pré-tratamento em extrusora de dupla rosca para obtenção de açúcares.** 2018. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2018.

Os materiais lignocelulósicos, devido ao seu importante potencial de conversão em açúcares e biocombustíveis, estão sendo extensivamente estudados, nas últimas três décadas. O uso de sabugo de milho como matéria-prima lignocelulósica oferece possibilidades promissoras para a produção de energia renovável. A lignocelulose normalmente consiste em celulose, hemicelulose e lignina. A celulose e a hemicelulose podem ser convertidas em açúcares através de processos químicos ou biológicos, e estes açúcares (principalmente glicose, xilose e arabinose) podem ser fermentados a produtos químicos valiosos como o bioetanol. Na conversão de biomassa em biocombustíveis, o pré-tratamento é o primeiro passo para desestruturar a lignocelulose, deixando-a mais acessível para enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis. A tecnologia de extrusão por dupla rosca é comumente usada nas indústrias de polímeros e alimentos, podendo ser um método de pré-tratamento viável, uma vez que possui capacidade de expor a biomassa a uma variedade de condições de cisalhamento sob diferentes temperaturas em um processo de fluxo contínuo, com grande quantidade de sólidos (40-60% em massa). Neste trabalho, foi avaliada a hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado em extrusora de dupla rosca para obtenção de açúcares. O pré-tratamento por extrusão, a 115-130°C e 14 rpm (velocidade da dupla rosca), empregou uma relação sólido:líquido de 1:1, onde a fração líquida foi estudada variando-se a relação dos aditivos água e glicerol. O sabugo de milho extrudado, na melhor relação água e glicerol, foi hidrolisado pelo complexo enzimático Cellic CTec2, associado ou não ao Cellic HTec2, empregando-se carga de sólidos de 10%. Na sequência, a dosagem de enzimas e a carga de sólidos foram otimizadas pela metodologia de superfície de resposta (RSM), a fim de se obter elevados valores de conversão de celulose em glicose (y_1) e produtividade em glicose (y_2). A extrusão do sabugo de milho foi favorecida com o uso de água e glicerol na relação 25:25 (% m/m). O glicerol presente no meio não causou inibição na hidrólise enzimática dispensando a etapa de lavagem dos sólidos. O complexo enzimático comercial Cellic Ctec2 favoreceu a conversão de celulose em glicose. Através da metodologia de análise de superfície de resposta (RSM), foram estabelecidas a dosagem do complexo enzimático comercial Cellic Ctec2 (32 FPU/$g_{\text{material lignocelulósico seco}}$) e a carga de sólidos (17,8% m/m) para maximizar as conversões de celulose em glicose (90,4% m/m) e de hemicelulose em xilose e arabinose (44,0% m/m) e produtividade em glicose (0,69 g/L.h). O rendimento em açúcares totais (323 Kg de glicose e 148 Kg de xilose e arabinose) foi de 471 Kg para cada tonelada de sabugo de milho seco. Nesta condição, as constantes cinéticas para a conversão de celulose em glicose foram: V_{max} de 6,00 % (m/m)/h e K_m de 22,59 $g_{celulose}/L_{solução}$. Estes resultados são promissores para obtenção de um hidrolisado de sabugo de milho com elevado teor de monossacarídeos para uso em bioprocessos, de forma sustentável e com mínimo impacto ambiental.

Palavras-chave: Extrusão. Pré-tratamento. Sabugo de milho. Hidrólise enzimática

ABSTRACT

JOSÉ, A.H.M. **Evaluation of enzymatic hydrolysis of corn cob after pretreatment in a twin-screw extruder to obtain sugars**. 2018. 73 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2018.

Lignocellulosic materials due to their significant conversion potential in sugars and biofuels have been extensively studied in the last three decades. The use of corn cob as a lignocellulosic feedstock offers promising possibilities for the production of renewable energy. Lignocellulose usually consists of cellulose, hemicellulose and lignin. Cellulose and hemicellulose can be converted into sugars by chemical or biological processes, and these sugars (especially glucose, xylose and arabinose) can be fermented to valuable chemicals such as bioethanol. In the conversion of biomass to biofuels, pretreatment is the first step in de-structuring lignocellulose, making it more accessible to enzymes that convert carbohydrates to fermentable sugars. Twin screw extrusion technology is commonly used in the polymer and food industries, and it may be a viable pretreatment method due to its ability to simultaneously expose biomass to a variety of shear conditions at different temperature in a flow continuous process using large amount of material (40-60% of biomass). In this work, the enzymatic hydrolysis of corn cob was evaluated after its pretreatment in a twin-screw extruder to obtain sugars. Extrusion pretreatment, at 115-130°C and 14 rpm (double screw velocity), employed a solid: liquid ratio of 1: 1, where the liquid fraction was studied by varying the ratio of water and glycerol additives. Extruded corn cob, in the best water and glycerol ratio, was hydrolyzed by the Cellic CTec2 enzymatic complex, associated or not to Cellic HTec2, using 10% solids loading. In the sequence, the dosage of enzymes and the solids loading were optimized by response surface methodology (RSM) to obtain high values of cellulose conversion to glucose (y_1), and glucose productivity (y_2). The extrusion of corn cob was favored by using water and glycerol in the ratio of 25:25 (% m/m). The glycerol present in the medium did not cause inhibition in the enzymatic hydrolysis dispensing the washing step of the solids. The commercial enzymatic complex Cellic Ctec2 favored the conversion of cellulose to glucose. By the response surface methodology (RSM) were established the dosage of the commercial enzymatic complex Cellic Ctec2 (32 FPU/$_{g\ dry\ lignocellulosic\ material}$) and solids loading (17.8% m/m) to maximize the conversions of cellulose to glucose (90.4% w/w) and of hemicellulose to xylose and arabinose (44.0% w/w) and glucose productivity (0.69 g/Lh). The yield of total sugars (323 kg of glucose and 148 kg of xylose and arabinose) was 471 kg for each ton of dried corn cob. In this condition, the kinetic constants for the conversion of cellulose to glucose were: Vmax of 6.00% (m/m)/h and Km of 22.59 $g_{cellulose}/L_{solution}$. These results are promising for obtaining a corn cob hydrolysate with high content of monosaccharides to be used in bioprocesses, in a sustainable manner and with minimal environmental impact.

Keywords: Extrusion. Pretreatment. Corn cob. Enzymatic hydrolysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Estruturas moleculares da celulose e hemicelulose presentes na parede celular vegetal..... 17

Figura 3.2 – Esquema da estrutura molecular da lignina..... 18

Figura 3.3 – Estrutura do sabugo de milho: 1 – Palha fina, 2 – Palha grossa, 3 – Anel Lenhoso, 4 – Medula..... 19

Figura 3.4 – Diferentes perfis de rosca para extrusora; A) Filete de transporte; B) Filete de amassar; C) Filete reverso..... 24

Figura 3.5 – Produtos de degradação de materiais lignocelulósicos..... 26

Figura 3.6 – Diferentes tipos de celulases em reação com o substrato celulose..... 27

Figura 3.7 – Via metabólica simplificada da produção de etanol a partir da biomassa..... 29

Figura 4.1 – Extrusora de dupla rosca (*American Maplan Corporation-AMC*) utilizada no pré-tratamento do sabugo de milho..... 32

Abela 4.1 – Dupla rosca utilizada no processo de extrusão com a esquematização das zonas de alimentação, compressão e controle de vazão..... 33

Figura 5.1 – (a) Sabugo de milho *in natura*, (b) sabugo de milho extrudado com aditivos água e glicerol (SME-25%), (c) sabugo de milho extrudado (homogeneizado) com aditivos água e glicerol (SME-25%)..... 43

Figura 5.2 – Dupla rosca utilizada no processo de extrusão após processar sabugo de milho com aditivos água e glicerol (SME-25%) antes de sua limpeza..... 44

Figura 5.3 – Análises por microscopia eletrônica de varredura dos sabugos de milho extrusado e *in natura*..... 47

Figura 5.4 – Difratogramas de raios X do sabugo de milho *in natura* sem glicerol, do sabugo de milho *in natura* com glicerol e do sabugo de milho extrudado..... 49

Figura 5.5 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a conversão de celulose em glicose (%) em função dos valores codificados para a dosagem de enzima (x_1) e carga de sólidos (x_2)..... 58

Figura 5.6 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a produtividade em glicose (g/L.h) em função dos valores codificados para a dosagem de enzima (x_1) e carga de sólidos (x_2)..... 59

Figura 5.7 – Perfis das concentrações dos açúcares, glicose (●), xilose (▲) e celobiose (■), obtidos durante hidrólise enzimática do sabugo de milho extrudado (SME-25%-NL) nas condições estabelecidas pela metodologia de análise de resposta (RMS)..... 64

Figura 5.8 – Perfis das conversões de celulose em glicose (■) e hemicelulose em xilose (●) obtidos durante hidrólise enzimática do sabugo de milho extrudado (SME-25%-NL) nas condições estabelecidas pela metodologia de análise de resposta (RMS)..... 65

Figura 5.9 – Gráfico de Lineweaver-Burk (1/Vo *versus* 1/[S])..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição química de materiais lignocelulósicos (%)..... 18

Tabela 4.1 – Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^2 completo para relacionar as cargas do complexo enzimático e biomassa..... 36

Tabela 4.2 – Matriz estatística apresentando os níveis codificados e naturais de um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 4 repetições no ponto central para relacionar as cargas do complexo enzimático e biomassa..... 37

Tabela 5.1 – Composição química do sabugo de milho *in natura* (SM) e do sabugo de milho após pré-tratamento por extrusão com glicerol (SME-25%)..... 45

Tabela 5.2 – Cristalinidade dos sabugos de milho *in natura* (SM) e após pré-tratamento por extrusão (SME-25%)..... 49

Tabela 5.3 – Conversão da celulose e hemicelulose em açúcares durante hidrólise enzimática do sabugo de milho *in natura* (SM) e após pré-tratamento por extrusão (SME-25%) antes (NL) e após (L) sua lavagem empregando os complexos enzimáticos Cellic Ctec2 e Cellic Htec2 (Novozymes)..... 50

Tabela 5.4 – Conversão da celulose e hemicelulose em açúcares durante hidrólise enzimática do sabugo de milho *in natura* (SM) e após pré-tratamento por extrusão (SME-25%) antes de sua lavagem empregando o complexo enzimático Cellic Ctec2 (Novozymes)..... 52

Tabela 5.5 – Valores utilizados e codificados no planejamento fatorial completo 2^2 com fase centrada (4 pontos) e 4 repetições no ponto central para os dois fatores: dosagem de enzimas (x_1) e carga de sólidos (x_2) e as respostas: conversão de celulose em glicose (y_1) e produtividade em glicose (y_2)..... 53

Tabela 5.6 – Coeficientes de regressão para a resposta conversão de celulose em glicose (y_1)..... 54

Tabela 5.7 – Coeficientes de regressão para a resposta produtividade em glicose (y_2).. 55

Tabela 5.8 – Análise de variância (ANOVA) para a maximização da conversão de celulose em glicose na hidrolise enzimática do sabugo de milho extrudado (SME-25%-NL) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 4 repetições no ponto central..... 56

Tabela 5.9 – Análise de variância (ANOVA) para a maximização da produtividade de glicose na hidrolise enzimática do sabugo de milho extrudado (SME-25%-NL) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 4 repetições no ponto central..... 56

Tabela 5.10 – Condições operacionais utilizadas nos ensaios experimentais para validação dos modelos para maximar a conversão de celulose em glicose em associação com a produtividade em glicose durante hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por extrusão..... 60

Tabela 5.11 – Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo do processo de hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por extrusão..... 60

Tabela 5.12 – Composição parcial do hidrolisado de sabugo de milho obtido nas condições do ponto ótimo do processo de hidrólise enzimática..... 61

Tabela 5.13 – Açúcares monoméricos obtidos do sabugo de milho pré-tratado por extrusão e após sua hidrolise enzimática sob condições otimizadas e não otimizadas (SME-25%-NL, Ctec2) pela metodologia de análise de superfície de resposta..... 62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 OBJETIVOS 16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
3.1 Materiais lignocelulósicos e biorrefinaria 17
3.2 Sabugo de Milho 19
3.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos 20
3.3.1 Hidrólise ácida 21
3.3.2 Hidrólise alcalina 21
3.3.3 Solvente orgânico 22
3.3.4 Explosão à vapor 22
3.3.5 Extrusão 23
3.3.6 Subprodutos dos pré-tratamentos químicos e físicos de biomassa vegetal 25
3.3.7 Hidrólise enzimática 26
3.4 Uso de açúcares provenientes de hidrolisados de biomassa: Produção de etanol 28
4. MATERIAIS E MÉTODOS 31
4.1 Pré-tratamento por extrusão do sabugo de milho 31
4.1.1 Preparo da matéria prima 31
4.1.2 Características da rosca e condições operacionais do processo de extrusão 31
4.1.3 Avaliação de aditivos no processo de extrusão: água e glicerol 33
4.2 Avaliação do glicerol presente no sabugo de milho extrudado na etapa de hidrólise enzimática empregando os complexos enzimáticos: Cellic CTec2 e Cellic HTec2 34
4.2.1 Complexos enzimáticos 34
4.2.2 Lavagem dos sólidos 34
4.2.3 Hidrólise enzimática 34
4.3 Metodologia de análise de superfície de resposta (RSM) 36
4.4 Métodos analíticos e determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise enzimática 37
4.4.1 Análise composicional do sabugo de milho *in natura* e após pré-tratamento 37

4.4.2 Determinação do teor de umidade do sabugo de milho 37

4.4.3 Preparação das amostras para determinação do teor de glicerol no sabugo de milho extrudado 38

4.4.4 Determinação da concentração de açúcares, acetato e glicerol 38

4.4.7 Determinação da concentração de 5-hidroximetilfurfural 38

4.4.8 Determinação do pH no hidrolisado enzimático 39

4.4.9 Análise de microscopia eletrônica de varredura – MEV 39

4.4.10 Análise cristalográfica por difratometria de raios X 39

4.4.11 Determinação das constantes cinéticas das reações de hidrolise enzimática: condição otimizada pela metodologia de análise de resposta 40

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

5.1 Pré-tratamento por extrusão: influência dos aditivos água e glicerol nas alterações químicas e físicas do sabugo de milho 42

5.1.1 Análise composicional do sabugo de milho 45

5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 46

5.1.3 Análise cristalográfica do sabugo de milho por difratometria de raios X 48

5.2 Avaliação do glicerol presente no sabugo de milho extrudado na etapa de hidrólise enzimática empregando os complexos enzimáticos: Cellic CTec2 e Cellic HTec2 49

5.3 Estudo da hidrólise enzimática do sabugo de milho pré tratado por extrusão: metodologia de análise de superfície de resposta 52

5.3.1 Validação experimental.....60

5.3.2 Cinética do processo de hidrólise enzimática 63

5 CONCLUSÕES 68

REFERÊNCIAS 69

1 INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos devido ao seu importante potencial de conversão em açúcares e biocombustíveis estão sendo extensivamente estudados nas últimas três décadas por estarem ligados ao atual conceito de biorrefinaria. Este conceito é definido por (BIORREFINARIA).

> A biorrefinaria é composta por facilidades e instalações produtivas que geram e utilizam matéria prima de origem vegetal e renovável, operando de forma totalmente integrada, e que através de processos físico-químicos, enzimáticos ou biológicos transformam estas matérias em subprodutos que atendam às necessidades do consumo moderno, de forma sustentável e com o mínimo de impacto ambiental.

O custo para obtenção de combustíveis a partir de materiais lignocelulosicos é determinado por fatores baseados na sustentabilidade que envolvem a eficiência de conversão e a quantidade disponível de biomassa (BOZELL, 2010). Além de outros resíduos agrícolas, o uso de sabugo de milho como matéria-prima lignocelulósica oferece possibilidades promissoras para a produção de energia renovável.

O sabugo de milho é um dos resíduos provenientes do beneficiamento do milho e corresponde a 22% da massa do grão ou a 11% da massa da planta (CARVALHO, 1992). Seu rendimento é de aproximadamente 18 kg (70% base úmida) após o processamento de 100 kg de espigas de milho (ALVES, 2016). É um resíduo em abundância visto que o Brasil, segundo o IBGE, teve uma safra recorde de 88,014 milhões de toneladas de milho em 2017, um aumento de 38,9% em relação a 2016 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos de componentes estruturais (celulose, hemicelulose, lignina, proteínas e cinzas) e componentes não estruturais. A lignina é uma estrutura polimérica altamente aromática e ramificada que apresenta elevada massa molecular e uma estrutura complexa (HAMES, 2009). A celulose é um polímero de estrutura rígida com unidades repetidas de glicose, e é altamente estável e resistente ao ataque químico (HAMES, 2009).

A hemicelulose é um polímero constituído por cadeias de açúcares mais curtas e altamente ramificadas. Este polissacarídeo pode conter açúcares de cinco carbonos, tais como xilose e arabinose, assim como os açúcares de seis carbonos, como glicose, galactose e manose (HAMES, 2009). Esse caráter ramificado da hemicelulose faz com que ela seja mais amorfa e mais facilmente hidrolisada em açúcares fermentescíveis em comparação com

a celulose.

Na conversão de biomassa em biocombustíveis, o pré-tratamento é o primeiro passo para desestruturar a lignocelulose deixando-a mais acessível para enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis. A hidrólise enzimática e a fermentação podem ser realizadas em separado (SHF), ou simultaneamente, utilizando sacarificação simultânea a fermentação (SSF) (LIU et al., 2014).

O pré-tratamento pode ser feito por processos físicos, químicos e biológicos e pela combinação destes. O pré-tratamento busca o aproveitamento integral dos resíduos agroindustriais gerados na cadeia produtiva de um produto específico, o que se enquadra no novo conceito de biorrefinaria, conferindo valor agregado a estes processos (MARVIN et al., 2011). A tecnologia de extrusão por dupla rosca é comumente usada nas indústrias de polímero e alimentos e pode ser um método de pré-tratamento viável.

De acordo com Lee et al. (2009), o processo de extrusão apresenta vantagens com relação a outros pré-tratamentos por proporcionar cisalhamento elevado, rápida transferência de calor, mistura, temperatura moderada, tempo de residência curto e a facilidade de alteração no processo. Estas variáveis podem ocorrer em um processo de fluxo contínuo com grande quantidade de material (40-60% em massa) e apresentam facilidades para ampliação de escala. Além disso, no processo de extrusão não se obtém fração líquida e assim não há problemas com descarte de efluentes e nem perda de sólidos. A biomassa pré-tratada por extrusão não requer etapas de lavagem e condicionamento conforme requerido em outros métodos de pré-tratamento como ácidos diluídos e alcalinos.

Zheng et al. (2014) publicaram um artigo de revisão sobre o pré-tratamento de extrusão de biomassa lignocelulósica onde é observado o emprego da extrusão associado com pré-tratamentos químicos (ácido, álcali e solventes) como preparação da biomassa para a hidrólise enzimática. A combinação do pré-tratamento com a hidrólise enzimática da celulose é um passo chave na derivação de açúcares fermentescíveis para subsequente obtenção de etanol ou de outros produtos de fermentação, por leveduras ou bactérias.

No entanto, para que a biomassa possa ser extrudada, é necessário o uso de aditivos (glicerol, Tween 80, etilenoglicol, etc.) para facilitar seu transporte dentro da extrusora. O glicerol é um aditivo interessante em termos de custo por ser um subproduto da produção de biodiesel e possui temperatura de ebulição de 290 °C. A extrusão proporciona elevada força de cisalhamento no material, aumentando a sua superfície de contato e facilitando a ação das enzimas. A extrusão preserva a hemicelulose e não são produzidos inibidores potenciais de fermentação tais como o furfural e o 5-hidroxi metil furfural (5-HMF), podendo ser

utilizados diferentes tamanhos de partículas de biomassa na extrusora (LEE et al., 2009, ZHENG et al., 2014).

Neste contexto, este trabalho avaliou o processo de hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por extrusão na obtenção de açúcares. Foram utilizados dois complexos enzimáticos provenientes da Novozymes A/S (Curitiba, PR), o Cellic CTec2 que é combinação de celulases potentes, contendo alto nível de β-glicosidades, e o Cellic HTec2, que é combinação de endoxilanase com alta especificidade para solubilizar a hemicelulose e que possui também celulases. O glicerol foi utilizado como aditivo no processo de extrusão. O pré-tratamento utilizou uma extrusora com dupla rosca posicionadas de forma intercaladas e em movimento co-rotacional. O desenho da rosca é um fator relevante na etapa de cisalhamento do material, pois ocasiona aumento em sua área superficial e consequentemente facilita o processo de hidrólise pelas enzimas (ZHANG et al., 2015; ZHENG et.al., 2014).

Esperou-se com esse trabalho contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de obtenção de hidrolisado de sabugo de milho com elevado teor de monossacarídeos para uso em bioprocessos, de forma sustentável e com o mínimo de impacto ambiental.

2 OBJETIVOS

Geral:

- Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de obtenção de um hidrolisado rico em açúcares, empregando o pré-tratamento por extrusão associado à hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.

Específicos:

- Realizar o pré-tratamento do sabugo de milho pelo processo de extrusão e avaliar a influência dos aditivos água e glicerol nas alterações químicas e físicas deste material.

- Avaliar a influência do glicerol presente no sabugo de milho extrudado na etapa de hidrólise enzimática empregando os complexos enzimáticos Cellic CTec2 e Cellic HTec2.

- Realizar, na condição otimizada, a metodologia de análise de superfície de resposta (RSM), a fim de maximizar os valores de conversão de celulose em glicose e produtividade em glicose durante a hidrólise enzimática do sabugo de milho extrudado.

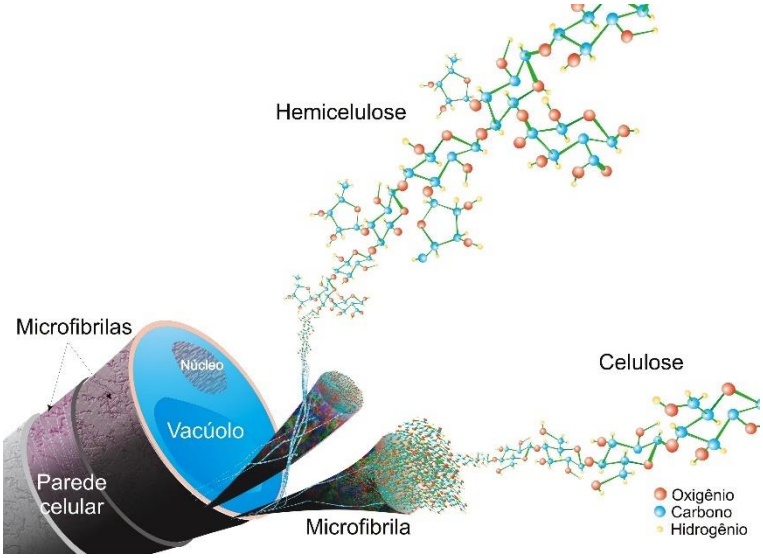
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Materiais lignocelulósicos e biorrefinaria

A produção primária mundial de lignocelulósicos florestais, como madeira, resíduos agrícolas, plantas aquáticas, gramíneas e outros, é estimada entre 10 e 50 bilhões de toneladas anualmente, o que representa em torno de 50% da produção total de biomassa mundial, que são os materiais de origem de plantas terrestres (HAQ et al., 2016). Estes materiais constituem reservas naturais renováveis em grandes quantidades na natureza e representam importante fonte de matérias-primas que podem ser utilizadas em processos químicos ou biotecnológicos. A utilização destes materiais lignocelulósicos pode atender à demanda crescente de energia, produtos químicos e alimentos (BISARIA; GHOSE, 1981), uma vez que são únicos em sua composição química bem como em suas propriedades químicas, físicas e mecânicas (LAKS; HON; SHIRAISHI, 1991).

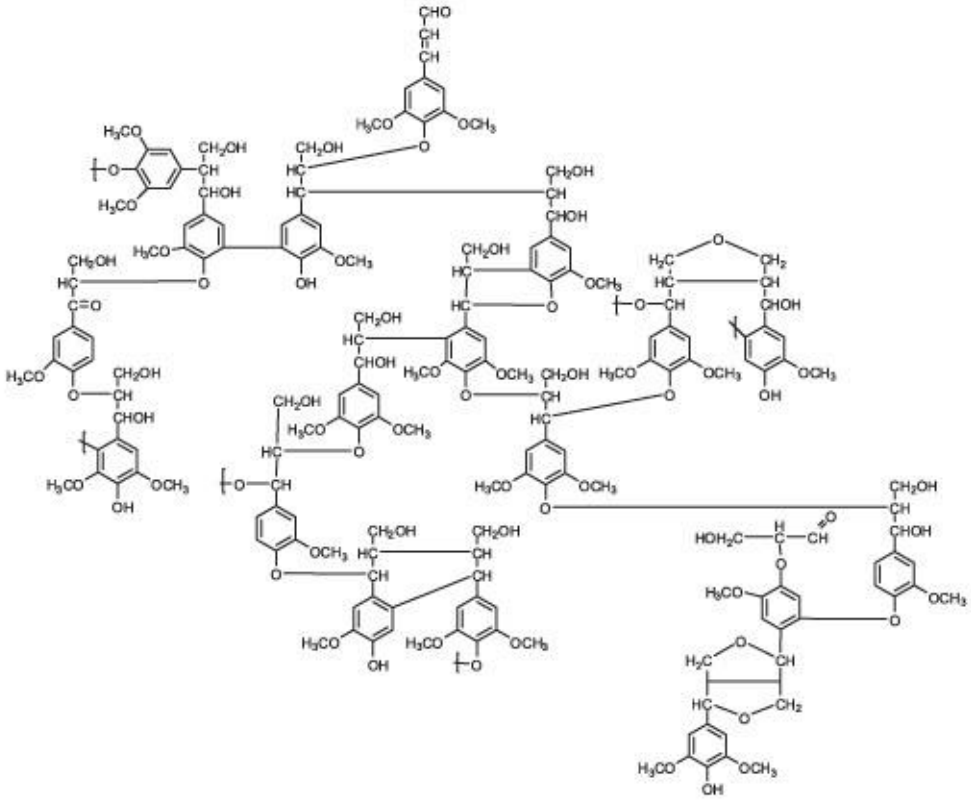
A composição química destes materiais é complexa, sendo constituída principalmente de celulose (Figura 3.1), hemicelulose (Figura 3.1), lignina (Figura 3.2) e compostos de baixa massa molar, como extrativos (POLETTO; JÚNIOR; ZATTERA, 2014).

Figura 3.1 – Estruturas moleculares da celulose e hemicelulose presentes na parede celular vegetal.



Fonte: (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010)

Figura 3.2 – Esquema da estrutura molecular da lignina.



Fonte: (SANTOS et al., 2012)

As proporções e composição química de lignina e hemicelulose variam em madeiras duras e moles, enquanto a celulose é um componente uniforme em todo tipo de madeira (HAMES, 2009). Algumas fontes importantes de materiais lignocelulósicos estão listadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Composição química de materiais lignocelulósicos (%).

Fonte lignocelulósica	**Celulose**	**Hemicelulose**	**Lignina**
Madeira dura	40-45	24-40	18-25
Madeira Mole	45-50	25-35	25-35
Palha de arroz	32,1	24	18
Bagaço de cana	42	25	20
Resíduos de banana	13,2	14,8	14
Sabugo de milho	45	35	15
Palha de milho	38	26	19
Concha de noz	25-30	25-30	30-40
Palha de trigo	29-35	26-32	16-21

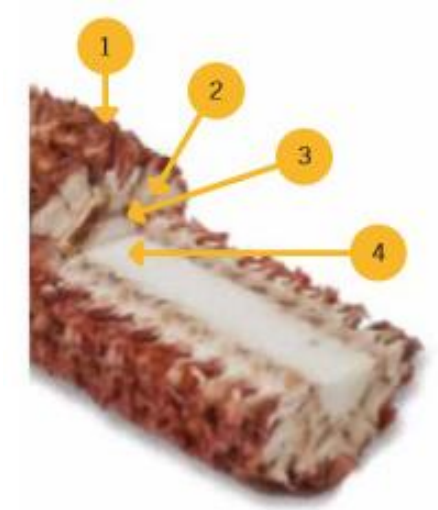
Fonte: (ANWAR; GULFRAD; IRSHAD, 2014).

Outro conceito que surgiu na década de 80 é sobre a química verde, onde o desenvolvimento da sociedade atual não deve comprometer a possibilidade de crescimento e prosperidade das gerações futuras (SHELDON, 2017). Portanto, é interessante haver um equilíbrio entre a economia, sociedade, e meio ambiente, obtendo assim um desenvolvimento sustentável. As biorrefinarias não apenas têm potencial para atingir tal propósito, como já vem sendo utilizadas em diversas empresas (SHELDON, 2017).

3.2 Sabugo de Milho

O sabugo de milho é a parte central da espiga de milho, onde estão presos os grãos de milho. Estruturalmente, divide-se o sabugo de milho em quatro partes fundamentais: palha fina, a região externa do sabugo; palha grossa, camada que se segue à palha fina; anel lenhoso, região interna que constituí mais de 50% do sabugo; e medula região interna do anel lenhoso (FOLEY; VANDER HOVEN, 1981). A palha fina constitui aproximadamente 5% do sabugo de milho em massa; a palha grossa 33%; o anel lenhoso 60% e a medula, 2% (Figura 3.3). Contudo estas proporções e as caracterisiticas físicas de cada parte do sabugo de milho podem variar de acordo com o cultivar (FOLEY; VANDER HOVEN, 1981).

Figura 3.3 – Estrutura do sabugo de milho: 1 – Palha fina, 2 – Palha grossa, 3 – Anel Lenhoso, 4 - Medula.



Fonte: (ANDERSONSCOB, 2015)

O sabugo de milho, um dos resíduos provenientes do beneficiamento do milho, corresponde a 22% do peso do grão ou a 11% do peso da planta (CARVALHO, 1992). Seu rendimento é de aproximadamente 18 kg (70% base úmida) após o processamento de 100 kg de espigas de milho (ALVES, 2016). É um resíduo em abundância visto que o Brasil,

segundo o IBGE, deve colher uma safra recorde de 88,014 milhões de toneladas de milho em 2017, um aumento de 38,9% em relação a 2016 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017).

Em sabugos de milho, as xilanas encontradas tem sido consideradas constituidas, em geral, principalmente por ácido 4-0-metil-d-glucurônico, L-arabinose e D-xilose, na proporção 2:7:19. Nessa mema fonte vegetal, as xilanas encontradas são heteropolímeros, como por exemplo, glucuroarabinoxilana e arabinoxilana. Entretanto, a proporção dos monossacarídeos pode variar dependendo do método de extração, cultivar, fatores ambientais, etc. (SILVA et al., 1998).

O Sabugo de milho contêm aproximadamente 391 g de celulose, 421 g de hemicelulose, 91 g de lignina, 17 g de proteína e 12 g de cinzas por kg de matéria seca, que podem servir como fonte de açúcares solúveis que, através de processos químicos, enzimáticos e fermentativos, podem ser convertidos em produtos de elevado valor agregado como xilitol, etanol e outros (BARL et al., 1991). A maior parte é celulose, um polissacarídeo que pode ser convertido em glicose. As hemiceluloses são heteropolímeros de pentoses e hexoses, e correspondem de 10 à 40% da matéria seca dos materiais lignocelulósico (RAMOS, 2000).

Apesar da grande quantidade gerada desse subproduto, sua utilização ainda não se mostra compatível com o seu potencial de uso (SULTANA; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2007). Alguns usos industriais do sabugo de milho são: produção do composto químico furfural (FOLEY; VANDER HOVEN, 1981), oléos vegetais, formulações de massas de bolos, pães ou pizzas, etc.

3.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Vários grupos de pesquisa têm direcionado seus esforços para o desenvolvimento de estratégias que visam o processamento da biomassa com máxima eficiência na utilização do material *in natura*, proporcionando com isso baixo impacto ambiental e maior rentabilidade econômica. Em consequência da sua natureza polissacarídica, os materiais lignocelulósicos não são diretamente utilizados pelos microrganismos produtores das substâncias de interesse industrial, sendo necessário proceder à hidrólise dos seus componentes para gerar os respectivos monômeros (LUQUE et al., 2016).

O processo de fracionamento é uma solução interessante para este aproveitamento, permitindo com isso a separação da lignina, celulose e hemicelulose, uma vez que cada fração pode ser utilizada para obtenção de diferentes produtos. O pré-tratamento de materiais

lignocelulósicos é realizada por processos físicos, químicos, biológicos e pela combinação destes. Diferentes métodos de pré-tratamento são propostos, como hidrólise ácida (PESSOA JR.; MANCILHA; SATO, 1997), extração através de soluções alcalinas, hidrólise enzimática e explosão a vapor (SILVA et al., 1998), extrusão do material por roscas simples ou duplas, entre outros.

3.3.1 Hidrólise ácida

O processo de hidrólise ácida consiste em adicionar um ácido a uma determinada concentração em uma solução contendo a biomassa, podendo utilizar temperaturas acima de 100°C e pressões acima de 1 atm. Este processo pode utilizar diferentes concentrações de ácido, fazendo com que o tipo de interação entre o ácido e a biomassa seja diferente. A hidrólise utilizando ácido concentrado pode ser realizada a temperatura e pressão ambiente. Com isso, é obtido um material com conversão de até 90% dos polissacarídeos em açúcares monoméricos e baixa formação de subprodutos, como furfural e hidroximetil furfural. Este processo também atinge maiores rendimentos de glicose e xilose quando comparados ao processo de hidrólise com ácido diluído. Porém, a utilização de ácido concentrado faz com os reatores estejam sujeitos à corrosão, além de apresentar maior consumo de ácido do que a utilização do processo de hidrólise utilizando ácido diluído (WIJAYA et al., 2014).

A hidrólise utilizando ácido diluído (baixa concentração de ácido) é realizada utilizando altas temperaturas (entre 120 e 200°C). Esta hidrólise é realizada quando se faz necessário remover a hemicelulose do material lignocelulósico, reduzindo o tamanho das cadeias de hemicelulose até a produção dos açúcares monoméricos presentes no polissacarídeo, como xilose, manose e outros compostos como o ácido acético. O ácido mais utilizado é o ácido sulfúrico, uma vez que possui resultados interessantes e baixo custo (AKANKSHA et al., 2014). O processo de pré-tratamento utilizando ácido diluído é um dos processos mais utilizados para remoção da hemicelulose de materiais lignocelulósicos (JOSÉ, 2014).

3.3.2 Hidrólise alcalina

A hidrólise alcalina é utilizada com o objetivo de remover a lignina presente na biomassa vegetal (MENG, 2014). Para isto, é utilizada uma base (o hidróxido de sódio é o mais utilizado) em uma solução contendo a biomassa. Como na hidrólise ácida, são utilizadas temperaturas acima de 100 °C e sistema pressurizado (SINGH et al., 2015).

Acontecem também reações de *peeling* (remoção da ponta redutora da celulose na forma de glicose, formando outra ponta redutora na celulose) durante as hidrólises alcalinas do material lignocelulósico, aumentando a perda no rendimento dos polissacarídeos presentes na biomassa, além de reduzir o grau de polimerização destas longas cadeias de carboidratos (TESTOVA et al., 2014).

3.3.3 Solvente orgânico

O processo de fracionamento por solventes (VOM STEIN et al., 2011), também conhecido como *organosolv*, é um método de pré-tratamento em que a lignina da biomassa lignocelulósica é extraída por diferentes solventes orgânicos (etanol, metanol, metil-isobutil cetona, etc.). Após a extração, as celuloses estão presentes em estado sólido e apresentam alta digestibilidade enzimática. A quantidade de lignina e hemicelulose contida no sólido pode variar, uma vez que a hemicelulose que estava presente no sólido é atingida no processo em conjunto com a lignina. O solvente é, em seguida, recuperado e o licor restante é diluído com água para precipitar a lignina. A hemicelulose é recuperada a partir da solução aquosa.

De acordo com Zhao et al. (2009) as vantagens gerais deste processo referem-se à facilidade de recuperação dos solventes orgânicos, à obtenção da lignina e a obtenção da celulose na forma de um sólido e da hemicelulose na fase aquosa.

3.3.4 Explosão à vapor

A explosão a vapor, também chamada de auto-hidrólise, é um pré-tratamento físico, em que a biomassa é imersa em água dentro de um reator com elevada temperatura e pressão. Este pré-tratamento é um dos mais utilizados, pois não há a necessidade de se utilizar reagentes químicos. As moléculas de água penetram entre as cadeias dos polissacarídeos estruturais da biomassa, e então o meio é submetido a uma descompressão, fazendo com que as moléculas de água presentes entre as cadeias dos carboidratos vaporizem rapidamente, separando as fibras de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa (SINGH et al., 2015).

Em elevadas temperaturas, ácidos orgânicos presentes na hemicelulose são hidrolisados pela própria água, ficando expostos ao meio e reduzindo o seu pH. Com isso, é realizada a auto-hidrólise da biomassa sem adição de ácido inorgânico (ZHENG et al., 2014).

3.3.5 Extrusão

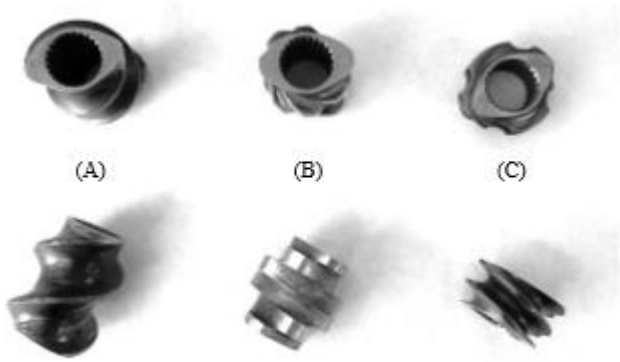
A extrusão é um processo em que o material é carregado no início do equipamento, e por uma rosca sem fim, é transportado para o final do equipamento, expondo este material a forças de cisalhamento em um processo contínuo. Este material é exposto a temperaturas que variam entre 40 e 200°C, podendo ser pressurizado (DUQUE et al., 2017; ZHANG et al., 2015), e o material ao sair da extrusora, sofre uma redução de pressão a pressão atmosférica expandindo assim o material, processo semelhante ao processo de explosão a vapor.

A umidade de entrada do produto da extrusora, como também a temperatura do interior da extrusora, são dois fatores importantes para a melhor obtenção do produto desejado, fazendo com que a otimização destes fatores possa viabilizar a utilização deste processo (BAHCEGUL et al., 2013). Outros fatores importantes são: perfil da rosca, velocidade de rotação e tempo de residência do material na extrusora, podendo até serem relacionados entre si (DUQUE et al., 2017).

O perfil da rosca é importante, pois existem diferentes tipos de filetes que podem ser empregados em uma mesma rosca, como também a distância entre eles, e a angulação. A Figura 3.4 mostra três tipos de filetes: A) Filete de transporte, que tem como finalidade transportar o material ao longo da rosca; B) Filete de amassar, que tem como finalidade de reduzir o tamanho de partícula do material, aumentando assim a desfibrilação da biomassa lignocelulósica; C) Filete reverso, que tem como finalidade aumentar a pressão exercida sobre o material através da criação de uma força reversa ao material, podendo ser combinado com os outros tipos de filetes para aumentar sua eficiência (DUQUE; MANZANARES; BALLESTEROS, 2017).

O processo de extrusão possui diversas vantagens, como a possibilidade de utilizar cargas sólido-líquido superiores a outros pré-tratamentos, valores acima de 15% nesta relação. Porém, é necessário otimizar a carga de material na entrada da extrusora, ou seja, sua relação sólido-líquido para facilitar o processo de mistura pelos elementos das roscas e para que o cisalhamento e o fluxo mássico ocorram de forma satisfatória. No processo de biomassa, caso o material de entrada possua carga superior de líquidos em relação a carga de sólidos haverá maior fluidez dentro da extrusora o que pode influenciar nas forças de cisalhamento (DUQUE et al., 2017).

Figura 3.4 – Diferentes perfis de rosca para extrusora; A) Filete de transporte; B) Filete de amassar; C) Filete reverso.



Fonte: (DUQUE et al., 2017)

O mais comum em outros pré-tratamentos é a utilização de água como meio dispersante, porém, no processo de extrusão, a água em concentrações altas pode atrapalhar o fluxo do material, como também apresentar picos de temperatura dentro da extrusora em temperaturas acima de 100°C (DUQUE et al., 2017). Portanto, são utilizados agentes químicos, ou agentes específicos de gelatinização, como o glicerol e o Tween 80 (SENTURK-OZER et al., 2011).

Outras vantagens do pré-tratamento de extrusão sobre os outros citados são: a rápida transferência de calor entre o material e o alto cisalhamento ao material lignocelulósico, aumentando a acessibilidade das enzimas às fibras da biomassa. Este aumento de acessibilidade se dá através da desfibrilação e redução das fibras de celulose, do aumento da área de superfície para atuação das enzimas, como também pela redução do índice de cristalinidade e polimerização da celulose (OLIVA et al., 2017).

Zheng e Rehmann (2014) publicaram um artigo de revisão sobre o pré-tratamento de extrusão de biomassa lignocelulósica, mostrando que a extrusão pode ser associada a outros pré-tratamentos como químicos (ácido, alcali e solventes) visando a preparação da biomassa vegetal para a hidrólise enzimática. A extrusão preserva a hemicelulose e não são produzidos inibidores potenciais de fermentação tais como o furfural e o 5-hidroxi metil furfural (5-HMF), podendo ser utilizados diferentes tamanhos de partículas de biomassa na extrusora (LEE et al., 2009, ZHENG et al., 2014).

A fim de quantificar a influência do processo de extrusão no tamanho da partícula, cor e viscosidade, dentre outros parâmetros do substrato que está sendo estudado (ZHANG

et al., 2015), é utilizado o cálculo da energia mecânica específica da extrusora (ou *Specific Mechanic Energy – SME*) a partir da equação 1:

$$SME\,(kJ/kg) = \frac{2\pi \times n \times T}{MFR} \quad (1)$$

Onde SME = energia mecânica específica (kJ/kg), n = velocidade da rosca (min^{-1}), T = torque do motor (N.m) e MFR é o fluxo de massa (g/min), ou fluxo de alimentação do produto.

3.3.6 Subprodutos dos pré-tratamentos químicos e físicos de biomassa vegetal

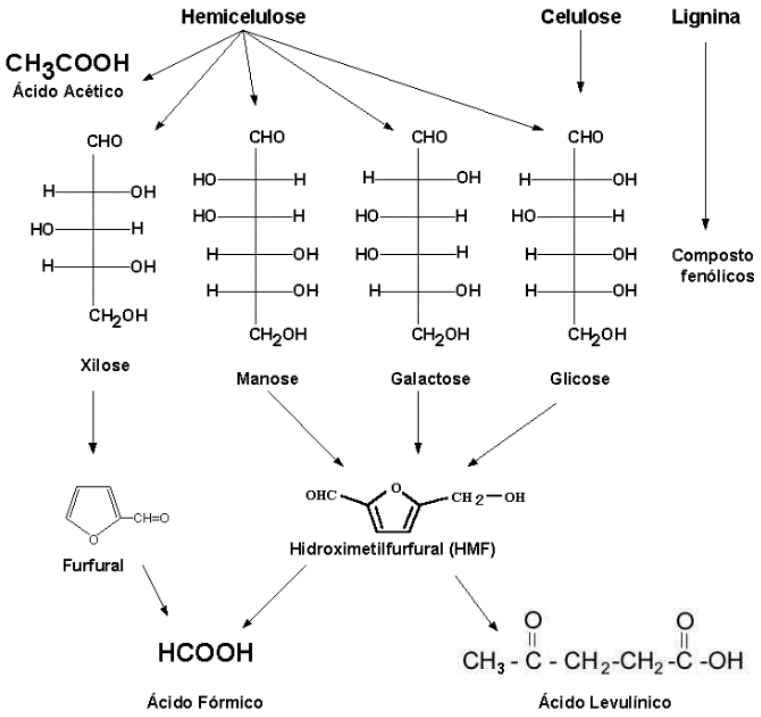
Os sub-produtos dos pré-tratamentos químicos e físicos mais importantes são furanos, ácidos carboxílicos e compostos fenólicos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) são os furanos mais importantes. Estes são formados pela decomposição de pentoses e hexoses, respectivamente (SJÖSTRÖM, 1993). As reações de formação de HMF a partir de glicose e furfural a partir de xilose estão demonstradas na Figura 3.5.

A decomposição de açúcares corresponde a reações de primeira ordem, em que os valores de meia vida dos açúcares são dependentes das concentrações de ácido e da temperatura (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A formação de diferentes tipos de ácidos carboxílicos tem sido mencionada na literatura durante o processo de hidrólise. Os ácidos levulínico e fórmico são geralmente produtos de degradação de HMF (SJÖSTRÖM, 1993). Entretanto, o ácido fórmico pode também ser formado a partir de grupos metoxil da hemicelulose. Os grupos metoxil podem também ser hidrolisados a metanol (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). O ácido acético é formado a partir da hidrólise de grupos acetil da hemicelulose, como consequência da diacetilação de pentosanas acetiladas (LAWFORD; ROUSSEAU, 1993).

A formação de compostos aromáticos e poliaromáticos, com uma variedade de substituintes durante a hidrólise, tem sido reportada na literatura (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Estes compostos são mencionados como produtos de degradação de lignina. Entre estes compostos, temos o fenol, a vanilina, o ácido vanílico, o álcool vanílico, o ácido 4-hidroxibenzóico, o 4-hidroxibenzaldeido, o ácido cumárico, o seringaldeido, o ácido siríngico, o cinamaldeido, o álcool dihidroconiferil, a hidroquinona, o catecol, a acetoguaiacetona, o ácido homovanílico e as cetonas de Hibbert's. Na literatura também são

mencionadas outras substâncias como formaldeído, maltol, 2-hidroximetilfurano, dihidroxiacetona, gliceraldeido e metilglioxal (SJÖSTRÖM, 1993).

Figura 3.5 – Produtos de degradação de materiais lignocelulósicos.



Fonte: (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000)

3.3.7 Hidrólise enzimática

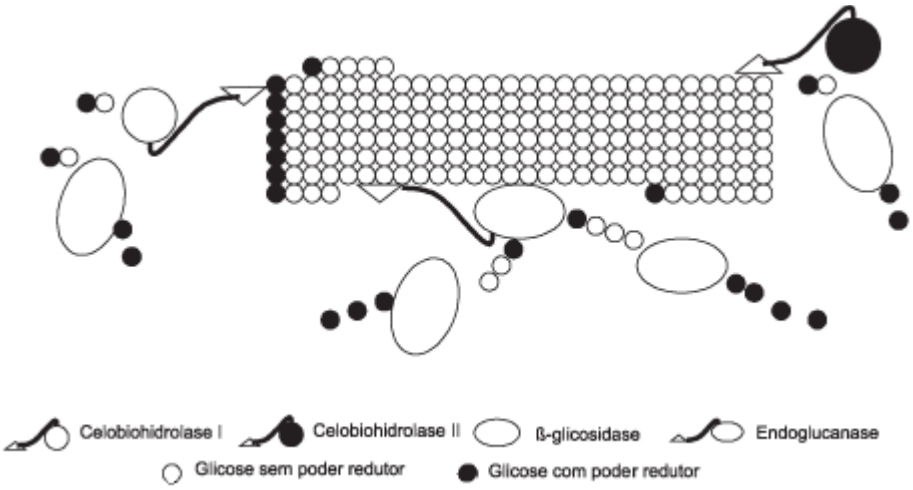
A combinação de outros pré-tratamentos com a hidrólise enzimática da celulose é um passo chave na derivação de açúcares fermentescíveis para subsequente obtenção de etanol ou de outros produtos de fermentação, por leveduras ou bactérias. Neste caso, a hidrólise enzimática da celulose ocorre sob condições brandas de pressão, temperatura e pH. Sua alta especificidade elimina a chance de ocorrência de furfural, que pode dificultar os processos subsequentes a hidrólise enzimática como a fermentação (HU et al., 2014).

A hidrólise enzimática, por sua vez, é um dos passos mais dispendiosos na produção de bioetanol, principalmente devido ao preço de celulases e a quantidade de doses dessas enzimas necessárias. A redução da carga de enzimas é, portanto, muito desejável. Neste sentido, tem-se o complexo enzimático Cellic CTec2 desenvolvido pela Novozymes A/S especialmente para a sacarificação de biomassa lignocelulósica que, em comparação com outros complexos enzimáticos, apresenta menor custo, pode ser utilizado em menor dosagem, e maior estabilidade frente aos inibidores sem a necessidade de seu enriquecimento com β-glucosidase, como no caso da Celluclast 1.5 L FG, considerado um complexo

enzimático padrão na área de lignocelulósicos. Tem-se também o complexo enzimático Cellic HTec2 (Novozymes A/S) que é combinação de endoxilanase com alta especificidade para solubilizar a hemicelulose, que possui também celulases.

O complexo enzimático utilizado na hidrólise da celulose é denominado "enzimas celulósicas", as quais se dividem em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico: a) Endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; b) Exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e c) ß-glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (KESHK, 2016; MENG; RAGAUSKAS, 2014). A atuação destas enzimas encontra-se na Figura 3.6.

Figura 3.6 – Diferentes tipos de celulases em reação com o substrato celulose.



Fonte: (CASTRO; PEREIRA JR, 2010)

Hidrólise de celulose requer ações de sinergismo de várias celulases em sistema de reação heterogênea, e esse fato determina que o mecanismo dessa reação seja altamente complexo. Sinergismo, geralmente, é definido como o aumento da atividade de uma mistura de enzimas comparada com a soma das atividades das enzimas individuais (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Hemiceluloses (xilanas e glucomananas) estão intimamente associadas com feixes de celulose (BERLIN et al., 2005) e assim a hidrólise simultânea de celulose e hemiceluloses parece essencial para a solubilização eficiente da celulose (GÜBITZ et al., 1998). No entanto, a celulose é composta por partes cristalinas e amorfas. A parte amorfa é mais suscetível à hidrólise enzimática, devido a sua maior área superficial, do que a forma ordenada ou cristalina. A celulose cristalina, por apresentar uma região bastante organizada, possui grandes quantidades de ligações de hidrogênio, o que dificulta o processo de hidrólise.

Cada tipo de celulase ataca preferencialmente uma região especifica da celulose (KESHK, 2016; MENG; RAGAUSKAS, 2014).

A fim de intensificar a atividade das enzimas sobre o material lignocelulósico, podem ser utilizados surfactantes no meio, como o Tween 80, ácido sulfônico dodecilbenzeno, polietileno glicol 4000 (PEG 4000) (SINGH; SUHAG; DHAKA, 2015). Estes surfactantes tem como função se ligar irreversivelmente à lignina presente à biomassa, dificultando a adsorção das celulases e hemicelulases às moléculas de lignina, reduzindo a perda na eficiência destas enzimas ao aumentar a disponibilidade destas enzimas no meio (MORI, 2015).

Outra maneira de se utilizar estas enzimas é em sua forma imobilizada, o que aumenta a estabilidade, atividade e seletividade destas enzimas. As enzimas são imobilizadas no suporte através de ligações covalentes do suporte com a enzima. Este suporte pode ser feito por nanopartículas magnéticas, fáceis de serem recuperadas do meio. Através da imobilização, estas enzimas aumentam sua durabilidade, uma vez que estão rígidas imobilizadas ao suporte, além de serem mais facilmente recuperadas para reutilização (JIA et al., 2017). As enzimas utilizadas nos processos de degradação da celulose são imobilizadas todas juntas, uma vez que estas enzimas apresentam efeitos sinérgicos. Porém, ao imobilizá-las, o procedimento não pode danificar nenhuma das enzimas, pois poderia reduzir o rendimento drasticamente (KESHK, 2016).

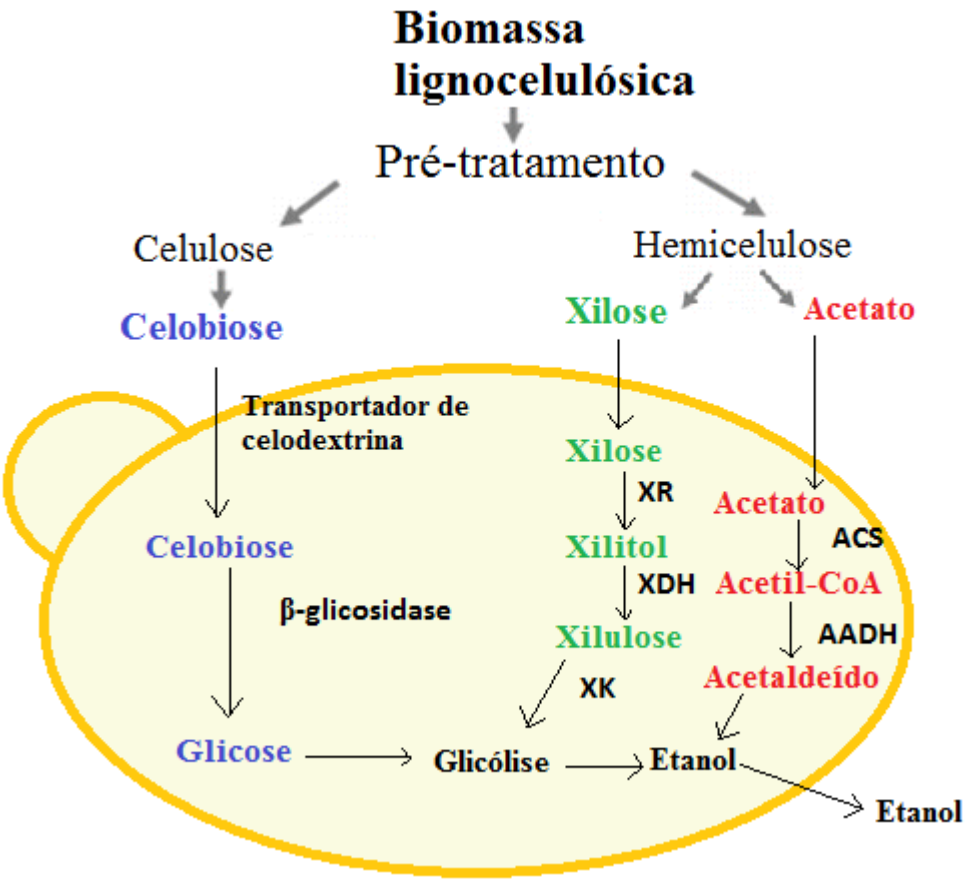
3.4 Uso de açúcares provenientes de hidrolisados de biomassa: Produção de etanol

O bioetanol pode ser misturado na gasolina ou como único combustível em motores de combustão interna com ignição por centelha (Ciclo Otto) presentes em veículos *flex* (em inglês *flexible-fuel vehicle* – FFV) ou veículo de combustível duplo (em inglês *dual-fuel vehicle*) (THÁLYTA, 2011). O etanol tem maior calor de vaporização e número de octanos do que a gasolina. Além disso, o etanol na gasolina pode atuar como um combustível oxigenado aumentando o seu conteúdo de oxigênio e favorecendo a oxidação dos hidrocarbonetos e diminuição dos gases de efeito estufa (HILL et al., 2006). O Brasil com a publicação da Lei nº 13.033, em 25 de setembro de 2014 condicionou o aumento da mistura de 27% de etanol anidro na gasolina C mediante comprovação de sua viabilidade e hoje essa proporção é uma realidade com exceção na gasolina Premium que continua com 25% de etanol anidro (THÁLYTA, 2011).

Atualmente, o etanol utilizado nos automóveis é produzido no Brasil principalmente via fermentação da sacarose presente no caldo da cana-de-açúcar com a levedura

Saccharomyces cerevisiae. Porém, toda biomassa é um material lignocelulósico com um potencial para a produção de etanol (Figura 3.7), uma vez que possui polímeros de glicose e polímeros de xilose. Portanto, basta o fracionamento destas macromoléculas para se liberar os açúcares monoméricos para a ação dos microrganismos fermentadores (SINGH; BAJAR; BISHNOI, 2014).

Figura 3.7 – Via metabólica simplificada da produção de etanol a partir da biomassa.



Fonte: Adaptado de (WEI et al., 2015)

Como a biomassa pré-tratada possui em seu meio tanto açúcares de cinco carbonos (pentoses), quanto açúcares de seis carbonos (hexoses), se faz necessária a utilização de um microrganismo que metabolize tanto as hexoses, quanto as pentoses para maximizar a produção de etanol. Apesar da *Saccharomyces cerevisiae* apresentar o melhor rendimento de conversão de hexoses em etanol, esta não metaboliza as pentoses para produção de etanol caso esta levedura não possuir alterações em seu código genético (CAI et al., 2016). *Scheffersomyces stipitis* é uma levedura que possui rotas metabólicas tanto para as hexoses, quanto para as pentoses, produzindo etanol (SU; WILLIS; JEFFRIES, 2015).

A hidrólise enzimática e a fermentação podem ser realizadas em separado (SHF), ou simultaneamente, utilizando sacarificação simultânea à fermentação (SSF). Durante a última década, o SSF tornou-se o processo preferido, uma vez que a inibição do produto final das enzimas pode ser evitada com da realização de fermentação concomitantemente com a hidrólise enzimática. Em SSF também se observa a redução no custo de investimento da instalação, por requerer um número menor de tanques. No entanto, uma desvantagem do processo SSF é que a temperatura do processo deve ser definida em função das temperaturas ótimas de hidrólise enzimática e fermentação, enquanto que no processo SHF estas podem ser otimizadas independentemente (LIU et al., 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O processo de extrusão foi realizado no Centro de Química e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e o restante do trabalho no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena- EEL-USP.

4.1 Pré-tratamento por extrusão do sabugo de milho

4.1.1 Preparo da matéria prima

O sabugo de milho, triturado, seco e ensacado (20 kg), proveniente da RASUL - Indústria e Comércio de Rações Ltda – PR, foi armazenado a temperatura ambiente até a realização dos ensaios de extrusão. Este material, antes da etapa de extrusão, passou pelo processo de moagem em moinho de facas e peneiração a 250 *mesh*. Antes de sua utilização este material moído e peneirado foi submetido à padronização em sistema vibratório de peneiras, nas aberturas menores que 710 µm. O material retido, ou seja, com diâmetros maiores que 710 µm foi extrudado.

4.1.2 Características da rosca e condições operacionais do processo de extrusão

O processo de extrusão foi realizado em uma extrusora (*American Maplan Corporation-AMC*) (Figura 4.1) de dupla rosca que estavam posicionadas de forma intercalada e com movimento co-rotacional.

A Figura 4.2 mostra a configuração das roscas. Na zona de alimentação (transporte) têm-se 11 filetes de espessuras finas e com mesma angulação. Nesta região, o aquecimento foi menor. A altura destes filetes é maior do que das outras regiões, fazendo com que o material seja transportado para a próxima região.

Na zona de compressão (Figura 4.2), a biomassa sofre maior força de cisalhamento dependendo da configuração desta região. Neste modelo de rosca, tem-se 6 filetes com espessuras intermediarias aos filetes da zona de alimentação e controle de vazão. Na zona de compressão, a angulação dos filetes variou de 3 em 3 filetes, ou seja, logo após a zona de alimentação, aumenta-se a distância entre os filetes, mantendo-se a mesma angulação. Os outros 3 filetes têm alteração de angulação que simulam um elemento reverso empurrando a biomassa para o sentido contrário ao transporte, com isso, o material é submetido a intensas forças de cisalhamento.

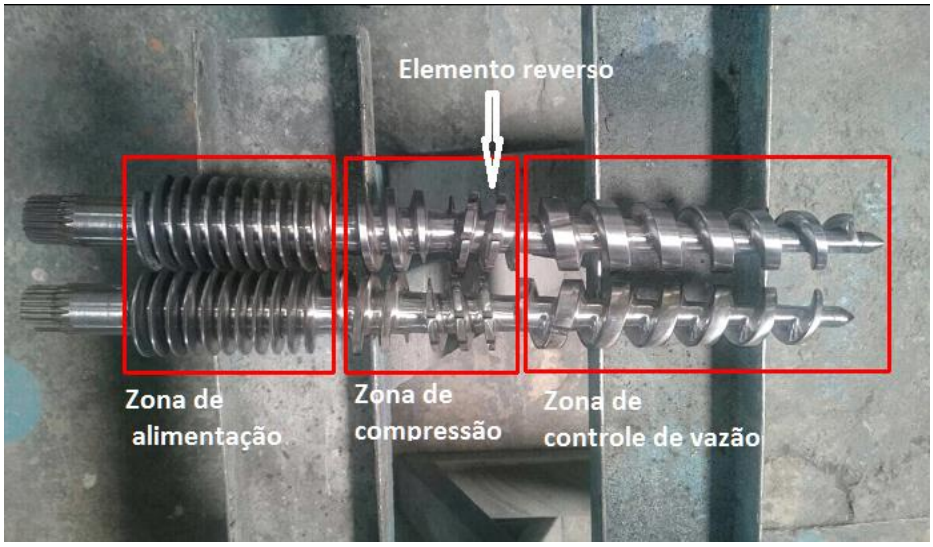
Figura 4.1 – Extrusora de dupla rosca (*American Maplan Corporation-AMC*) utilizada no pré-tratamento do sabugo de milho.

Fonte: Própria do autor.

Desta forma, a biomassa permanece mais tempo nesta zona sofrendo maiores efeitos de cisalhamento. A zona de controle de vazão (Figura 4.2), que é responsável pela finalização da homogeneização e pelo fluxo uniforme do material, possui 7 filetes. O diâmetro do cilindro na zona de alimentação é constante, e nas zonas de compressão e controle de vazão é variável com diminuição do seu diâmetro ao longo do eixo no sentido zona de compressão para zona de controle de vazão. Este fato proporciona distâncias maiores ou menores da borda do filete à parte interna do cilindro e cria regiões de maior ou menor impacto e homogeneização do material.

Na zona de compressão tem-se variação do diâmetro do cilindro, variações nos ângulos dos filetes, simulando elementos reversos, e por ser uma zona mais curta (Figura 4.2) que as outras proporciona maior força de cisalhamento e maior mistura. Durante a extrusão, o fluxo de material entre a primeira e as etapas posteriores deve ser balanceado para que o produto extrudado fique uniforme e para isso as zonas devem ser suficientemente alimentadas. O processo de alimentação foi controlado manualmente para prevenir entupimentos e excesso de torque.

Figura 4.2 – Dupla rosca utilizada no processo de extrusão com a esquematização das zonas de alimentação, compressão e controle de vazão.



Fonte: Própria do autor.

Com relação ao controle operacional, as variáveis importantes que interferem neste processo são a relação de compressão da rosca, que é a relação entre a profundidade da zona de alimentação e a profundidade da zona de mistura, a velocidade da rosca e a temperatura do cilindro. As temperaturas foram mantidas na faixa de 115 à 120°C na zona de alimentação, e entre 125 à 130 °C nas zonas de compressão e controle de vazão, a velocidade da rosca foi mantida à 14 rpm.

A compressão afeta positivamente o desenvolvimento das forças de cisalhamento e o fluxo de material dentro do cilindro da extrusora. A temperatura do cilindro auxilia, no caso do processamento de biomassa, o amaciamento afetando seu padrão de fluxo e o tempo de residência. A velocidade da rosca é responsável pelo desenvolvimento do cisalhamento do material e pelo tempo médio de residência.

4.1.3 Avaliação de aditivos no processo de extrusão: água e glicerol

O processo de extrusão foi conduzido com os aditivos água e glicerol da seguinte maneira:

a) Extrusão do sabugo de milho in *natura* (SM) sem adição de aditivos;
b) Extrusão do sabugo de milho embebido em glicerol na proporção 50% (m/m);
c) Extrusão de sabugo de milho embebido em diferentes concentrações dos aditivos água e glicerol. O sabugo de milho foi embebido em uma solução aquosa contendo diferentes concentrações de glicerol (0%, 10% e 50% m/m), empregando uma

relação sólido:liquido de 1:1 (1 grama de sabugo de milho em massa seca para 1 grama da solução de glicerol em água). Desta forma, no processamento do sabugo de milho a relação (% m/m) dos aditivos água:glicerol no produto final foram de 50:0; 45:5 e 25:25 denominadas SME-0%, SME-5% e SME-25%, respectivamente.

4.2 Avaliação do glicerol presente no sabugo de milho extrudado na etapa de hidrólise enzimática empregando os complexos enzimáticos: Cellic CTec2 e Cellic HTec2

4.2.1 Complexos enzimáticos

Foram empregados na hidrólise enzimática os seguintes complexos enzimáticos comerciais doados pela Novozymes A/S (Curitiba, PR):

a) Cellic CTec2: combinação de celulases potentes, contendo alto nível de β-glicosidades, com estabilidade operacional nas faixas de temperatura de 45 a 50 °C e pH de 5,0 a 5,5;

b) Cellic HTec2: combinação de endoxilanase com alta especificidade para solubilizar a hemicelulose, possuindo também celulase.

4.2.2 Lavagem dos sólidos

A hidrolise enzimática foi realizada para os seguintes sólidos: sabugo de milho contendo a relação de aditivos (água:glicerol, 1:1) otimizada no (**item 4.1.3**) antes e após a etapa de extrusão. Esses sólidos também passaram pela etapa de hidrólise enzimática após lavagens. O processo de lavagem foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 g de sabugo de milho e 50 mL de água destilada, sob agitação manual intermitente por 5 minutos. A seguir o meio foi deixado em repouso por 5 minutos. A seguir o sobrenadante foi descartado e os sólidos reservados para a etapa de hidrólise enzimática. A lavagem foi realizada em 3 ciclos consecutivos para cada amostra.

4.2.3 Hidrólise enzimática

Os experimentos de hidrólise enzimática destes sólidos (lavados e não lavados) foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL nas seguintes condições: tampão citrato de sódio 50 $mmol.L^{-1}$, pH 4,8, sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório a 50 °C e relação sólido:líquido 1:10 (m/v) com volume total de líquido de 50 mL. Foi adicionado o surfactante Tween 80 em uma carga de 9,8% m de Tween 80/m de material lignocelulósico seco. A carga enzimática foi de 25,25 FPU/g de material lignocelulúsico

seco (KLEINGESINDS, 2017) composta por 90% do complexo enzimático Cellic® CTec2 e 10 % do complexo enzimático Cellic HTec2. Essas porcentagens foram de acordo com recomendações da Novozymes (fabricante dos complexos) e correspondem a uma substituição de grau médio. Também foram realizados ensaios contendo somente Cellic CTec2 (25,25 FPU/g $_{\text{material lignocelulósico seco}}$).

Após a adição do complexo enzimático adicionou-se ao meio reacional azida de sódio (0,3 % m/v), para inibir contaminação microbiana. De cada ensaio foi coletada uma amostra para análise dos açúcares monoméricos iniciais no meio. Após 96 h, o hidrolisado enzimático foi autoclavado a 111°C por 5 minutos para inativação das enzimas e centrifugado a 2000 x g por 20 min. O sobrenadante foi coletado e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foram realizados dois ensaios de controle, em um deles não havia a presença de enzimas para detectar possível liberação de açúcares presentes em cada amostra de sabugo e no outro não havia a presença de sabugo para verificar a presença de açúcares liberados no meio pelo complexo enzimático.

A conversão enzimática da celulose foi calculada pela equação 2:

$$\eta = \frac{m_{glicose} \times f_{hc} + m_{celobiose} \times f_{hcb}}{m_{inicial} \times y_{ic}} \times 100 \qquad \textbf{(2)}$$

Em que: η = conversão enzimática da celulose (%);
$m_{glicose}$: massa de glicose presente no hidrolisado (g);
$m_{inicial}$: massa seca de material lignocelulósico, antes da etapa de hidrólise;
y_{ic} = teor de celulose no material lignocelulósico;
f_{hc}: fator de hidrólise da celulose (correspondente a 0,9);
f_{hcb}: fator de hidrólise da celobiose (correspondente a 0,95).

A conversão enzimática da hemicelulose foi calculada pela equação 3:

$$\eta = \frac{(m_{xilose} + m_{arabinose}) \times f_{hh}}{m_{inicial} \times y_{ih}} \times 100 \qquad \textbf{(3)}$$

Em que: η = conversão enzimática da hemicelulose (%);
m_{xilose}: massa de xilose presente no hidrolisado (g);
$m_{arabinose}$: massa de arabinose presente no hidrolisado (g);
$m_{inicial}$: massa seca de material lignocelulósico, antes da etapa de hidrólise;
y_{ih} = teor de hemicelulose no material lignocelulósico;
f_{hh}: fator de hidrólise da hemicelulose (correspondente a 0,88).

4.3 Metodologia de análise de superfície de resposta (RSM)

As melhores condições obtidas para o processo de extrusão (**item 4.1**) e complexo enzimático (**item 4.2**) foram utilizadas na metodologia de análise de superfície de resposta (RSM). A condução da hidrólise enzimática foi realizada como descrita no **item 4.2.3**, com variação da dosagem de enzimas e carga de sólidos (Tabela 4.1). Para isto, foram conduzidos ensaios de acordo com planejamento experimental 2^2 completo com face centrada e 4 repetições no ponto central. Os fatores estudados, variáveis independentes, foram dosagem de enzimas (E, x_1) e carga de sólidos (SME, x_2) e as respostas, variáveis dependentes, foram a conversão de celulose em glicose (y_1) e produtividade em glicose (y_2). Os fatores e níveis avaliados estão apresentados na Tabela 4.1. Na Tabela 4.2 tem-se matriz estatística com os níveis codificados e naturais de um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 4 repetições no ponto central.

A análise estatística dos dados foi feita através do programa Statgraphics, versão 6.0. Os resultados desta primeira etapa do trabalho foram expressos em tabelas de análise de variância com colunas de causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrado médio (QM), teste F e nível de significância (ρ). As superfícies de respostas foram feitas através do programa Statistica, versão 6.0. A etapa de otimização para maximizar as variáveis respostas (conversão de celulose em glicose e produtividade em glicose) foram através do programa Minitab versão 17.

Tabela 4.1 – Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^2 completo para relacionar a dosagem de enzimas e carga de sólidos.

Fatores	**Níveis**		
	-1	**0**	**+1**
Dosagem de enzimas (E) (FPU/$g_{\text{material lignocelulósico seco}}$)	11	21	31
Carga de sólidos (SME) (%m/m)	7,5	14	20,5

Fonte: Própria do autor.

Os níveis dos fatores foram codificados de acordo com a equação 4.

$$X = \frac{V_R - \sum V_R/2}{\left(V_{R_2} - V_{R_1}\right)/2} \qquad \textbf{(4)}$$

Em que: X é o valor codificado da variável;
V_R é o valor real da variável;
$\sum V_R/2$ é a média dos valores reais da variável.

Tabela 4.2 – Matriz estatística apresentando os níveis codificados e naturais de um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 4 repetições no ponto central para relacionar a dosagem de enzimas e carga de sólidos.

	Ensaios	**E*** **(FPU/g)** **x_1**	**SME*** **(%m/m)** **x_2**	**x_1**	**x_2**
Planejamento Fatorial 2^2	1	11	7,5	-1	-1
	2	31	7,5	+1	-1
	3	11	20,5	-1	+1
	4	31	20,5	+1	+1
Composição do Modelo Face Centrada	**5**	**11**	**14**	**-1**	**0**
	6	**31**	**14**	**+1**	**0**
	7	**21**	**7,5**	**0**	**-1**
	8	**21**	**20,5**	**0**	**+1**
Erro puro Ponto central	*PC1	21	14	0	0
	*PC2	21	14	0	0
	*PC3	21	14	0	0
	*PC4	21	14	0	0

*E = Dosagem de enzimas utilizada na hidrólise enzimática em FPU/g de matéria seca
*SME = Relação em massa seca de sabugo de milho por massa de solução da hidrólise enzimática
*PC1, PC2, PC3, PC4 = Pontos centrais (repetições)
Fonte: Própria do autor.

4.4 Métodos analíticos e determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise enzimática

4.4.1 Análise composicional do sabugo de milho *in natura* e após pré-tratamento

Os resíduos sólidos, sabugo de milho pré-tratado por extrusão, bem como o sabugo *in natura* foram analisados quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina solúvel e lignina insolúvel com base na metodologia utilizada no laboratório norte-americano NREL, 2009 (*National Renewable Energy Laboratory*) (SLUITER et al., 2008).

A realização da análise composicional do sabugo de milho foi em triplicada para cada amostra.

4.4.2 Determinação do teor de umidade do sabugo de milho

O teor de umidade do sabugo *in natura* e após extrusão foram determinados em balança semi-analítica MARTE ID50 equipada com secador de infravermelho, a 105 °C. Para esta determinação foi utilizado aproximadamente 1,0 g de sabugo úmido.

4.4.3 Preparação das amostras para determinação do teor de glicerol no sabugo de milho extrudado

Para o preparo das amostras para determinação do teor de glicerol (% m/m) no sabugo de milho extrudado pesou-se aproximadamente 0,20 g do material em um tubo tipo Falcon de 15 mL, adicionou-se água até 5 g. O tubo foi agitado manualmente em intervalos de 5 minutos durante 1 hora. O material foi centrifugado (2000 x g por 20 min) e o sobrenadante foi diluído para quantificação de glicerol por HPLC. Este mesmo procedimento foi realizado para o material *in natura* sem adição do glicerol e para material *in natura* após a adição do glicerol. As amostras foram preparadas em triplicatas.

4.4.4 Determinação da concentração de açúcares, acetato e glicerol

As concentrações dos açúcares glicose, xilose, arabinose, bem como de glicerol e ácido acético foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), empregando-se as seguintes condições: coluna Bio Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura da coluna, 45 °C; temperatura do detector, 35 °C; detector de índice de refração Waters 410; eluente, solução de H_2SO_4 0,005M, fluxo de 0,6 mL/min.; volume da amostra injetada, 20 μL.

As amostras, após devidamente diluídas, foram filtradas em filtro Sep Pak C18 (Millipore) e o eluente, antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana de éster de celulose, 0,45 μm de poro, 47 mm de diâmetro (Millipore) e simultaneamente foi degaseificado em banho de ultra-som (Thornton) por 25 minutos (RODRIGUES, 2005).

4.4.7 Determinação da concentração de 5-hidroximetilfurfural

As concentrações de 5-hidroximetilfurfural (HMF) nos hidrolisados enzimáticos de sabugo de milho foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de acordo com Rodrigues (2005), empregando-se as seguintes condições: coluna Waters Resolve^{tm} 5 μ Spherical C18 (3,9 x 300 mm); temperatura da coluna, 25 °C; detector de ultravioleta Waters 2487 no comprimento de onda de 276 nm; eluente, solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; volume da amostra injetada, 20 μL.

As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtros Swennex com membrana HA de éster de celulose, 0,45 μm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore). Na composição do eluente, a água deionizada foi filtrada a vácuo empregando-se membrana HA em éster de celulose, 0,45 μm de poro, 0,47 mm de diâmetro (Millipore) e os outros

componentes como ácido acético e acetronitrila foram, nas proporções adequadas, adicionados à água devidamente filtrada. Em seguida, o eluente foi desgaseificado em banho de ultra-som (Thornton) por 15 minutos e deixado antes de ser utilizado, em repouso por 10 minutos (RODRIGUES, 2005).

4.4.8 Determinação do pH no hidrolisado enzimático

O pH das amostras dos hidrolisados enzimáticos de sabugo de milho obtidas sob diferentes condições experimentais foram determinadas em pH/condutivímetro marca Mettler Toledo modelo SevenGO Duo-SG23.

4.4.9 Análise de microscopia eletrônica de varredura – MEV

O sabugo de milho *in natura* adicionado de glicerol e o sabugo após pré-tratamento de extrusão foram analisados por MEV de acordo com RODRIGUES 2005. Os sabugos de milho *in natura* com glicerol e sabugo de milho extrudado foram fixados sobre um porta-amostra com o auxílio de uma fita condutora dupla-face de carbono. Para aterramento, foi depositada uma fina camada de ouro sobre as amostras, para aumentar a condutividade do material, e então estas foram submetidas à análise em Microscópio Eletrônico de Varredura modelo LEO1450VP disponível no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena. Foram realizadas análises em diferentes ampliações: 100 vezes, 500 vezes, 1000 vezes, 5000 vezes e 15000 vezes.

4.4.10 Análise cristalográfica por difratometria de raios X

Com o propósito de avaliar a alteração da cristalinidade dos materiais lignocelulósicos após as etapas de pré-tratamento, os sabugos de milho foram preparados para análise de difratometria de raios X, utilizando um difratômetro da marca Panalytical, modelo Empyrean, com radiação de cobre Kα, filtro de Ni, ângulo inicial de 10 °, ângulo final de 90 °, passo angular de 0,02 °, tempo de exposição por passo de 80 s, e fenda de um quarto de grau.

De acordo com Mori (2015), a cristalinidade da biomassa pode ser relacionada com amostras de Avicel (100% de celulose), que apresenta 83% de cristalinidade (RAMOS, 2005). Assim, com a quantificação da fração celulósica do sabugo de milho, tem-se 39,46 % de cristalinidade do sabugo em relação à Avicel (equação 5).

A cristalinidade relativa esperada das amostras foi calculada de acordo com (RAMOS, 2005).

O índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos foi calculado pela equação 5, segundo Cao e Tan (2002):

$$I_c = \frac{I_{002} - I_{101}}{I_{002}} \; x \; 100 \qquad \textbf{(5)}$$

Em que:

I_c: Índice de cristalinidade medida (%);
I_{002}: Intensidade do pico devido aos planos cristalinos (002), com 2θ = 22,4 °;
I_{101}: Intensidade do pico devido aos planos cristalinos (101), com 2θ = 16,4 °.

Utilizando-se os dados obtidos da composição química da celulose em cada etapa do processamento, pode-se determinar a cristalinidade esperada. A diferença entre a cristalinidade esperada e a cristalinidade obtida experimentalmente fornece o valor de diminuição da cristalinidade da celulose conforme indicado nas equações 6 e 7 (MORI, 2015):

$$Ice = \frac{CQcelulose * 39{,}46}{CQcelulose\ in\ natura} \qquad \textbf{(6)}$$

$$Dc = Ice - Ic \qquad \textbf{(7)}$$

Em que:

Ice: Índice de cristalinidade esperada;
$CQ_{celulose}$: composição química da celulose das amostras de sabugo;
$CQ_{celulose\ in\ natura}$: Composição química da celulose do sabugo *in natura*;
Dc: Diminuição da cristalinidade;
Ic medida: Índice de cristalinidade obtido experimentalmente.

4.4.11 Determinação das constantes cinéticas das reações de hidrolise enzimática: condição otimizada pela metodologia de análise de resposta

A determinação das constantes cinéticas (K_m e V_{max}) das reações de hidrólise enzimática foi realizada na condição otimizada pela metodologia de análise de resposta (**item 4.3**).

Durante a reação enzimática foram coletas amostras em períodos regulares até 96 h. A cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas segue o modelo Michaelis-Menten (equação 8).

As constantes cinéticas (K_m e V_{max}) foram determinadas usando-se o método gráfico de Lineweaver Burk (SHULER; KARGI, 2002), plotando-se 1/S versus $1/V_0$. A velocidade máxima (V_{max}) foi obtida na região linear da curva de conversão de celulose em glicose versus tempo de reação.

Para o cálculo da constante de Michaelis (K_m), foi utilizada a equação de Michaelis-Menten (equação 8).

$$Vo = \frac{V_{max} * [S]}{Km + [S]} \quad \textbf{(8)}$$

Em que:

Vo = Velocidade em determinado tempo ($\%m/m.h^{-1}$);
V_{max} = Velocidade máxima do processo de hidrólise enzimática ($\%m/m.h^{-1}$);
[S] = Concentração do carboidrato em determinado tempo (%m/m);
Km = Constante de Michaelis-Menten;

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pré-tratamento por extrusão: influência dos aditivos água e glicerol nas alterações químicas e físicas do sabugo de milho

A tentativa de utilizar sabugo de milho seco *in natura* (Figura 5.1a) ocasionou entupimentos no equipamento em vazões de alimentação mais elevadas e ao reduzir esta vazão não se obteve um material homogêneo, provavelmente devido ao baixo preenchimento do material na zona de compressão da extrusora e consequentemente baixa força de cisalhamento. Além de ocasionar queima do material devido à associação entre maior tempo de resistência e entupimentos.

Também testou-se o uso de 50% (m/m) de glicerol sem a presença de água. Neste caso, teve-se dificuldade para realizar a alimentação. O material ficava retido na zona de alimentação provavelmente pela diminuição da força de atrito nesta região. O material extrudado apresentava-se quase intacto, indicando que provavelmente essa concentração de glicerol (50% m/m) possa ter contribuído para redução dos efeitos de cisalhamento dentro da extrusora.

Após estes testes preliminares, observou-se que o sabugo de milho seco ou até com 50% (m/m) de glicerol foi processado ineficientemente por extrusão. Assim, o sabugo de milho moído (Figura 5.1a) foi imerso em uma solução aquosa contendo diferentes concentrações de glicerol (0 %, 10 % e 50 % m/m), empregando-se uma relação sólido:líquido de 1:1. Assim, no processamento do sabugo de milho a relação (% m/m) dos aditivos água:glicerol foram de 50:0; 45:5 e 25:25 denominadas SME-0 %, SME-5 % e SME-25 %.

Na Figura 5.1 tem-se o sabugo de milho *in natura* (a), sabugo de milho extrudado com aditivo glicerol 25 % (m/m) (b) e sabugo de milho extrusado e homogeneizado (c).

Figura 5.1 – Sabugo de milho *in natura* (a), sabugo de milho extrudado com aditivos água e glicerol (SME-25%) (b), sabugo de milho extrudado (homogeneizado) com aditivos água e glicerol (SME-25%) (c).

a)

b)

c)

Fonte: Própria do autor.

O processo de extrusão do sabugo de milho com a adição de água e glicerol nas relações 50:0 e 45:5, respectivamente não foram eficientes. Nestes casos, o material saiu da

extrusora de forma intermitente e pressurizada com pigmentação escura. Provavelmente as explosões ocorreram devido a evaporação da água nas temperaturas de 115 a 130 °C, o que mostra que o uso da água restringe a operação a temperaturas mais baixas para evitar sua evaporação.

No entanto, na condição em que se adicionou os aditivos água e glicerol nas relações (% m/m) de 25:25 ao sabugo *in natura*, observou-se um processamento contínuo e homogêneo (SME-25%) (Figura 5.1b e Figura 5.1c). Com esse procedimento elevou-se a umidade inicial do sabugo de milho *in natura* de 5,94% para 27,25%. Nesta condição, a água e o glicerol presentes favoreceram o amaciamento térmico na temperatura do cilindro mantendo-se boa velocidade de cisalhamento, atrito e tempo de residência.

A Figura 5.2 mostra as roscas logo após a realização do ensaio SME-25%. Pode-se observar que o material está incrustado nos filetes e apresentam aparência homogênea. A coloração mais escura deve-se ao maior tempo de resistência desse material até a retirada das roscas para limpeza.

Figura 5.2 – Dupla rosca utilizada no processo de extrusão após processar sabugo de milho com aditivos água e glicerol (SME-25%) antes de sua limpeza.

Fonte: Própria do autor.

Após a extrusão a umidade do sabugo de milho atingiu valores de 7,24%, enquanto que a concentração de glicerol, de 21,44% (m/m), aumentou para 29,08% (m/m). A vantagem de se empregar o aditivo glicerol é que seu custo como aditivo pode ser reduzido por tratar-se de um subproduto da produção de biodiesel. Além de possuir elevado ponto de ebulição (290 °C) o que pode favorecer operações com temperaturas mais elevadas. Segundo Da Silva et al. (2013) os aditivos glicerol, etilenoglicol e dimetil sulfóxido (DMSO), que

possuem afinidade com a celulose, são boas opções, pois desfibrilam eficientemente as paredes celulósicas da biomassa, facilitando seu transporte ao longo da rosca da extrusora.

5.1.1 Análise composicional do sabugo de milho

A Tabela 5.1 mostra a caracterização química do sabugo de milho *in natura* com água e glicerol (SM-25%) e após sua extrusão (SME-25%). Os valores representam a média e o desvio padrão dos ensaios em triplicata. O sabugo de milho *in natura* (Tabela 5.1) apresentou composição química semelhante a obtida em outros trabalhos da literatura que apresentaram 35-45% de celulose, 35-42% de hemicelulose e 5-15% de lignina (ANWAR; GULFRA; IRSHAD, 2014). Observa-se que ao final do processo de extrusão do sabugo de milho SME-25% as frações estruturais do sabugo de milho foram praticamente inalteradas. Observa-se uma ligeira redução (em torno de 9%) na concentração de hemicelulose (Tabela 5.1).

Os teores baixos de cinzas no sabugo *in natura* (1,54 % ±0,37) e após o pré-tratamento (2,24 % ±0,78, Tabela 5.1) representam vantagem para o uso do sabugo de milho em processos de bioconversão em comparação a outros resíduos agrícolas, como palha de arroz e palha de trigo, os quais apresentam teores de cinzas de 17,5 e 11,0%, respectivamente (PANDEY et al., 2000).

Tabela 5.1 – Composição química do sabugo de milho *in natura* (SM) e do sabugo de milho após pré-tratamento por extrusão com glicerol (SME-25%).

Amostras	**Celulose (%)**	**Hemicelulose (%)**	**Lignina Klason (%)**	**Cinzas (%)**	**Extrativos (%)**	**Total (%)**
SM-*in natura*	36,15±0,64	41,07±0,82	16,70±2,80	1,54±0,37	5,51±0,05	100,97±3,03
***SM-E**	36,72±0,24	37,51±0,09	16,66±1,33	2,24±0,78	6,59±0,78	102,02±2,34

*= composição química do sabugo de milho extrusado com aditivo glicerol (50% m/m) após correção com relação á presença mássica de glicerol nos extrativos (valor de recuperação mássica utilizado na correção foi de 1,3988).
Fonte: Própria do autor.

Segundo Alvira et al. (2010), a extrusão não altera a composição química da biomassa, mas aumenta a acessibilidade das enzimas à celulose por meio de mudanças em sua estrutura como o aumento de sua área superficial, desfibrilação podendo algumas vezes reduzir seu grau de polimerização e cristalização.

5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

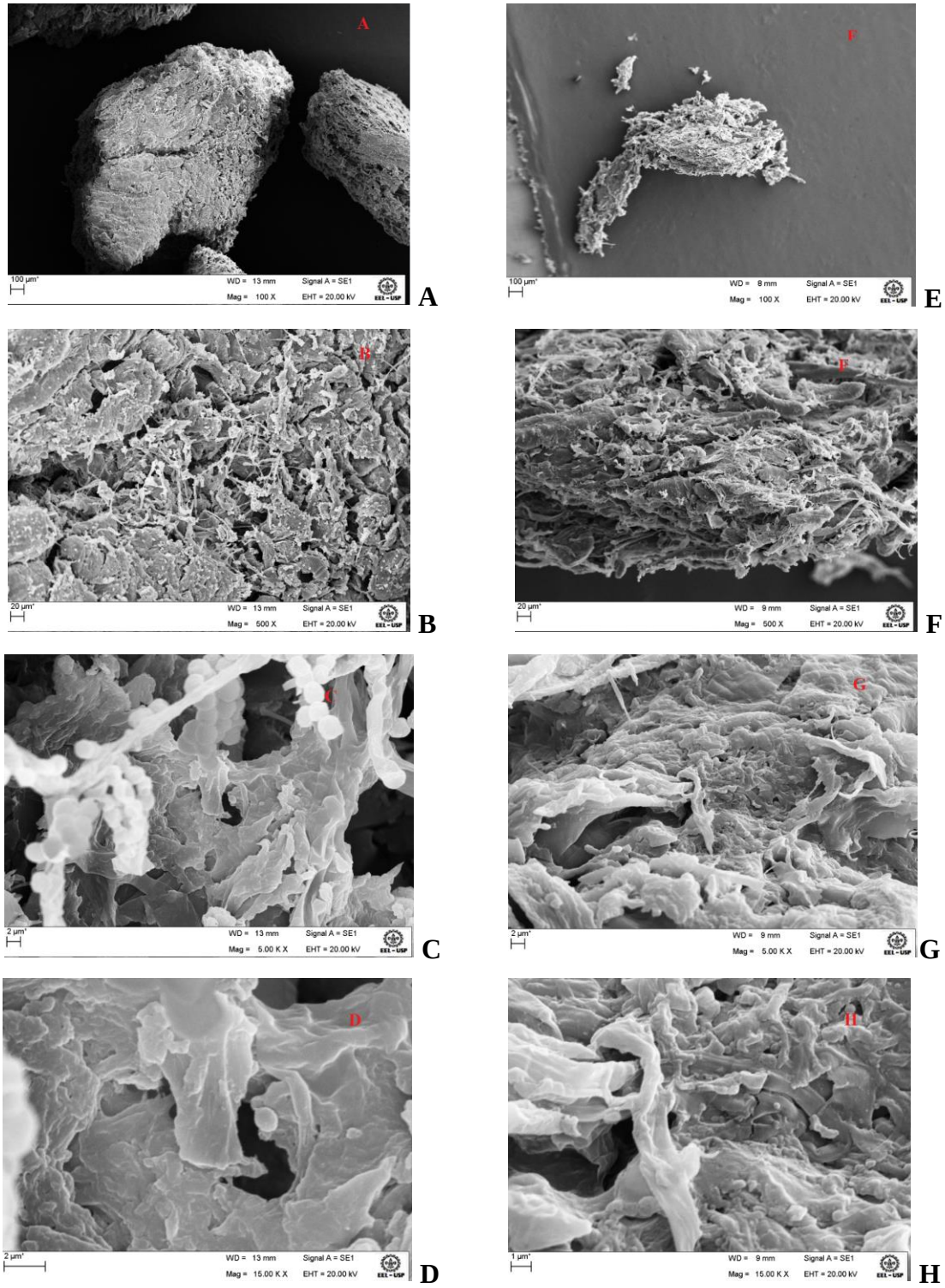
A Figura 5.3 mostra as micrografias do sabugo de milho *in natura* com os aditivos água (25% m/m) e glicerol (25% m/m) (SM-25%) e após sua extrusão (SME-25%) em diferentes ampliações. Após a extrusão (Figura 5.3 (E - H)), observa-se que o material apresentou estrutura fibrilar com pequenos poros irregulares em sua superfície. Estes poros podem ter sido causados pela evaporação de água.

De acordo com Zheng et al. (2016) o pré-tratamento por extrusão favorece a mistura e fornece força de cisalhamento e calor ao sabugo de milho. De acordo com estes mesmos autores, a água no interior das partículas pode evaporar-se pela súbita redução de pressão no final do processo de extrusão, resultando uma expansão e uma estrutura porosa que pode apresentar-se mais permeável ao ataque enzimático, favorecendo a eficiência da hidrólise enzimática.

No entanto, Zhang et al., (2015) mostrou que, dependendo do tipo e configuração da rosca da extrusora, pode-se ter a ocorrência da formação de muitos ou poucos poros com tamanhos variados no material processado. Este autor menciona que, dependendo do desenho da rosca, os poros no material podem ser bloqueados pelo deslocamento da lignina. A presença de filetes inversos na zona de compressão pode gerar altas forças de cisalhamento durante o processo de extrusão, possivelmente resultando elevadas temperaturas locais que podem derreter a lignina e depositá-la uniformemente sobre a superfície do sabugo de milho extrudado, dificultando o acesso enzimático a celulose.

As micrografias do sabugo de milho *in natura* com os aditivos água (25% m/m) e glicerol (25% m/m) (SM-25%) (Figura 5.3 (A-D)) e após sua extrusão (SME-25%) (Figura 5.3 (E-H)), mostram estruturas globulares que podem ser o glicerol aderido à superfície desses materiais. No entanto, após a etapa de extrusão observa-se que esses glóbulos estão localizados mais no interior do material e em tamanhos relativamente menores do que no material *in natura*. Além do processo de extrusão poder alterar a estrutura da biomassa, o glicerol é um aditivo com afinidade para celulose e pode fibrilar eficazmente a parede celular da biomassa em sub-micro ou nano escala, abrindo assim a estrutura da parede celular para melhorar a acessibilidade enzimática e diminuindo o torque na extrusão (LEE et al., 2009).

Figura 5.3 – Análises de microscopia eletrônica de varredura dos sabugos de milho extrusado e *in natura*.



Legenda: A: Sabugo de milho *in natura* (SM-25%) com ampliação de 100x; **B**: SM-25% com ampliação 500x; **C**: SM-25% com ampliação 5000x; **D**: SM-25% com ampliação 1500x; **E**: Sabugo de milho extrusado (SME-25%) com ampliação de 100x; **F**: SME-25% com ampliação 500x; **G**: SME-25% com ampliação 5000x; **H**: SME-25% com ampliação 15000x.
Fonte: Própria do autor.

5.1.3 Análise cristalográfica do sabugo de milho por difratometria de raios X

As estruturas do sabugo de milho *in natura* (SM-25%) e extrudado (SME-25%) foram analisadas quanto a sua cristalinidade (Figura 5.4) (Tabela 5.2).

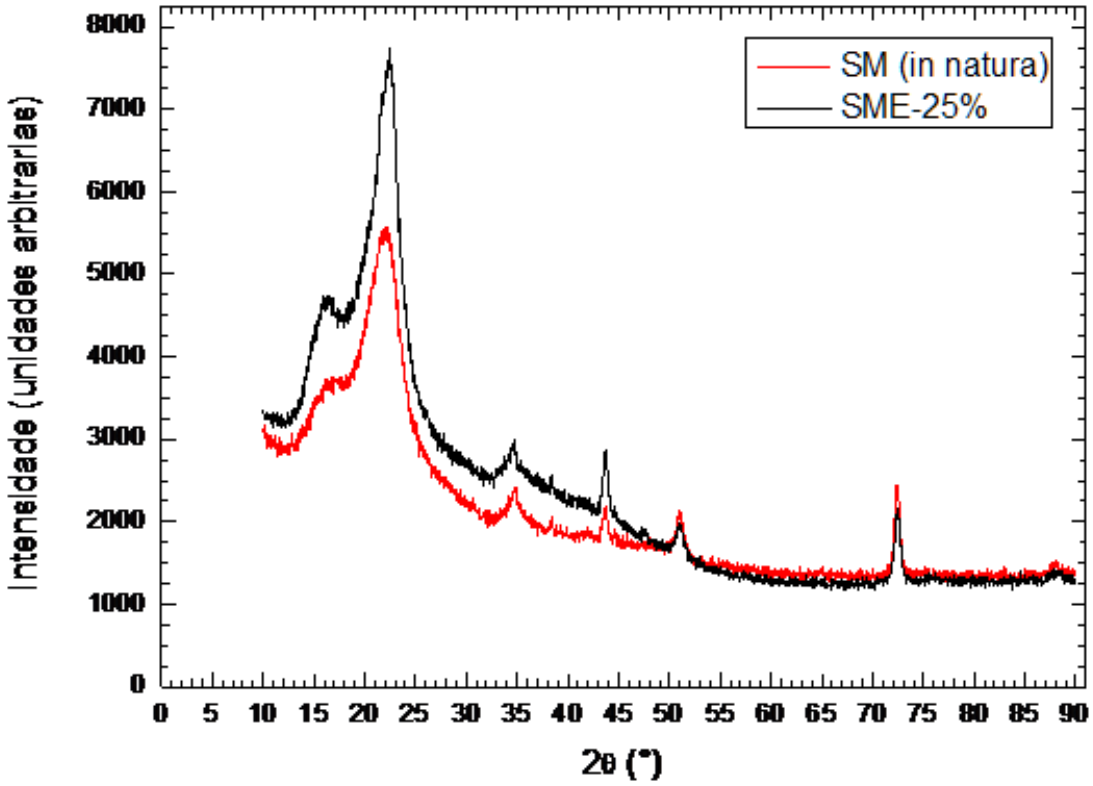
O índice de cristalinidade de um material lignocelulósico mede a quantidade relativa de celulose cristalina no sólido total. O índice de cristalinidade é utilizado para determinar a cristalinidade da celulose, pois a determinação do índice de cristalinidade por DRX apresenta somente valores relativos para as regiões cristalinas e amorfas (PARK et al., 2010). A estrutura cristalina da celulose pode ser alterada após diferentes pré-tratamentos, onde há quebra nas cadeias de fibrilas de celulose das ligações de hidrogênio inter e intramolecular (PARK et al., 2010).

Os resultados de difratometria de raios X (Figura 5.4) mostram que o sabugo de milho *in natura* (SM-25%) e extrudado (SME-25%) têm as características alomórficas típicas de celulose I e celulose II em $2\theta = 22,4°$ e $2\theta = 16,4°$, respectivamente. Para ambos os sabugos de milho, *in natura* (SM-25%) e extrudado (SME-25%), o pico cristalino ($2\theta = 22,4°$) predominou sobre o pico amorfo ($2\theta = 16,4°$) (KUMAR; NEGI; UPADHYAYA, 2010).

Após o pré-tratamento por extrusão, a altura do pico do sabugo de milho extrudado aumentou (Figura 5.4). Neste caso, constatou-se aumento da cristalinidade do sabugo *in natura* de 32,72% para 38,68% após pré-tratamento (Tabela 5.2), causado pela remoção de componentes amorfos de lignina e hemiceluloses, consistente com a análise química do sabugo de milho apresentado na Tabela 5.1, em que se observou 8,5% de remoção de hemicelulose. Devido à baixa remoção de sua parte amorfa, obteve-se baixa diminuição de sua cristalinidade (1,4 %) após pré-tratamento por extrusão (Tabela 5.1).

O aumento da cristalinidade do material corresponde à maior presença de celulose cristalina que é a mais difícil de ser hidrolisada enzimaticamente e proporciona aumento na rigidez da estrutura da biomassa. No entanto, a relação entre o índice de cristalinidade da biomassa extrudada e a sua taxa de hidrólise enzimática correspondente não é bem compreendida. Uma biomassa com alto índice de cristalinidade pode não afetar negativamente a taxa de hidrólise enzimática (DA SILVA et al., 2013).

Figura 5.4 – Difratogramas de raios X do sabugo de milho *in natura* sem glicerol, do sabugo de milho *in natura* com glicerol e do sabugo de milho extrudado.



Fonte: Própria do autor.

Tabela 5.2 – Cristalinidade dos sabugos de milho *in natura* (SM) e após pré-tratamento por extrusão (SME-25%).

Amostras	Cristalinidade medida (Ic)	Cristalinidade esperada (Ice)	Diminuição da cristalinidade (Dc) (%)
SM- *in natura*	32,75	-	-
SME-25%	38,68	40,08	1,4

Fonte: Própria do autor.

5.2 Avaliação do glicerol presente no sabugo de milho extrudado na etapa de hidrólise enzimática empregando os complexos enzimáticos: Cellic CTec2 e Cellic HTec2

As hidrólises enzimáticas foram conduzidas com material lavado e não lavado para verificar se a concentração presente de glicerol poderia interferir no mecanismo enzimático. A quantificação mássica de glicerol no sabugo de milho extrudado foi realizada por HPLC.

A seguir os sabugos de milho *in natura* (SM-25%), bem como o pré-tratado por extrusão (SME-25%) antes e após a etapa de lavagem foram hidrolisados enzimaticamente empregando os complexos enzimáticos Cellic Ctec2 e Cellic Htec2 (Tabela 5.3).

As conversões de celulose em glicose e de hemicelulose em xilose e arabinose apresentaram valores em torno de 63,17 % e 95,77 %, respectivamente, para os sabugos de milho pré-tratados por extrusão e lavados (SME-25%-L) (Tabela 5.3). Estes valores foram ligeiramente maiores para 67,43% e aproximadamente 100%, respectivamente, nos sabugos de milho pré-tratados por extrusão e não lavados (SME-25%-NL). Nestes casos, para ambos os materiais, se observaram menores valores de conversão de celulose em glicose (Tabela 5.3).

O sabugo de milho *in natura* sem lavagem (SM-25%-NL) também sofreu sacarificação, apresentando valores de conversões de celulose em glicose e hemicelulose em xilose e arabinose de 51,04 % e 24,80 %, respectivamente. Estes resultados podem ser devido ao uso de sabugo de milho *in natura* moído, ou seja, com elevada área superficial e também ao uso dos dois complexos enzimáticos comerciais, Cellic Ctec2 e Cellic Htec2 que, de acordo com o fabricante, devem ser utilizados na proporção de 90 % para 10 %, respectivamente. O complexo enzimático CTec2 possui celulases agressivas, altos níveis de β-glicosidases e apenas uma pequena parcela de hemicelulases, e o complexo Htec2 possui uma maior diversidade de endoxilanases com alta especificidade e apenas uma pequena quantidade de celulases.

Tabela 5.3 – Conversão da celulose e hemicelulose em açúcares durante hidrólise enzimática do sabugo de milho *in natura* (SM-25%) e após pré-tratamento por extrusão (SME-25%) antes (NL) e após (L) sua lavagem empregando os complexos enzimáticos Cellic Ctec2 e Cellic Htec2 (Novozymes).

Amostras	**Celobiose (g/L)**	**Glicose (g/L)**	**Xilose e Arabinose (g/L)**	**Conversão de celulose em glicose (%)**	**Conversão de hemicelulose em xilose e arabinose (%)**
SM-NL** (Ctec2/Htec2)*	0,00	20,41	12,10	51,04%	24,80%
SME-25%-L** (Ctec2/Htec2)*	3,93 ± 0,08	41,83 ± 3,67	35,70 ± 1,17	63,17 ± 1,64%	95,77 ± 2,69%
SME-25%-NL (Ctec2/Htec2)*	2,34 ± 0,00	25,83 ± 0,01	45,05 ± 0,96	67,43 ± 0,07%	101,92 ± 2,11%

*Relação Cellic Ctec2 (90%m/m) e Cellic Htec2(10%m/m) de acordo com fabricante (Novozymes).
**NL=não lavado e L=lavado.
Fonte: Própria do autor.

Com relação aos açúcares liberados ao meio reacional, constatou-se no material extrudado e lavado maiores concentrações de glicose (41,83 g/L) que quando se realizou a hidrólise enzimática com o material não lavado (25,83 g/L). Nestes casos, as concentrações de xilose e arabinose foram de 35,70 g/L e 45,05 g/L, respectivamente. Estes resultados mostram que há um indício de interferência da xilose na conversão de celulose a glicose.

Cabe salientar que foram realizados ensaios de controle para averiguar a presença de açúcares tanto no material extrudado não lavado quanto no próprio complexo enzimático, ou seja, nestes casos os ensaios foram realizados sem a presença de enzimas e sem a presença de sabugo, respectivamente. Os resultados destes ensaios mostraram que não havia açúcares detectáveis no complexo enzimático e nem adsorvidos no sabugo de milho pré-tratado por extrusão.

Para verificar se a liberação da xilose ao meio reacional poderia estar dificultando a conversão de celulose em glicose foram realizados ensaios com o sabugo de milho *in natura* e extrudado sem o processo de lavagem (SME-25%-NL) (em que se obteve menor liberação de glicose ao meio reacional – Tabela 5.3) e utilizando somente o complexo enzimático Cellic Ctec2 (Tabela 5.4).

O sabugo de milho *in natura* não lavado (SM-25%-NL) e hidrolisado somente com o complexo enzimático Cellic Ctec2 (Tabela 5.4) não apresentou alterações significativas na conversão de hemicelulose em xilose e arabinose e nas concentrações dos açúcares (celobiose, glicose e xilose e arabinose) com relação ao uso simultâneo dos complexos enzimáticos Cellic Ctec2 e Cellic Htec2 (Tabela 5.3). Neste caso, a conversão de celulose em glicose foi reduzida em 18,12%.

No entanto, no material extrudado e não lavado (SME-25%-NL) e hidrolisado somente com o complexo enzimático Cellic Ctec2 foi constatada uma redução (45,66%) na conversão de hemicelulose em xilose e arabinose em relação a condição que fez uso simultâneo dos complexos enzimáticos Cellic Ctec2 e Cellic Htec2 (Tabela 5.3). Este fato, provavelmente favoreceu a conversão de celulose em glicose (~ 100%) (Tabela 5.4). Segundo Zheng et al (2016) a remoção da fração de hemicelulose é uma das metas de pré-tratamento, uma vez que a xilose tipicamente interfere com as enzimas celulases utilizadas durante a sacarificação antes da fermentação.

Estes resultados foram encontrados mesmo com pouca diminuição no grau de cristalinidade (1,4%) do material pré-tratado e também sem adição de químicos ao processo de extrusão. Resultados semelhantes foram obtidos por Zhang et al. (2012) ao pré-tratar

palha de milho em uma extrusora de dupla rosca e também por Lee et al. (2009) que mencionaram o aumento da área superficial como um fator mais importante que a redução do índice de cristalinidade na melhora da sacarificação da biomassa. A desconstrução da parede celular observada por MEV e o aumento da área superficial foram considerados os responsáveis pelo aumento da sacarificação enzimática nos trabalhos conduzidos por Zhang et al. (2012).

Tabela 5.4 – Conversão da celulose e hemicelulose em açúcares durante hidrólise enzimática do sabugo de milho *in natura* (SM-25%) e após pré-tratamento por extrusão (SME-25%) antes de sua lavagem empregando o complexo enzimático Cellic Ctec2 (Novozymes).

Amostras	**Celobiose (g/L)**	**Glicose (g/L)**	**Xilose + Arabinose (g/L)**	**Conversão de Celulose em glicose (%)**	**Conversão de hemicelulose em xilose e arabinose (%)**
SM-25%-NL* (Ctec2)	0,00	17,30	11,31	43,21%	23,11%
SME-25%-NL (Ctec2)	1,84±0,08	36,56±3,67	23,708±1,17	93,99±3,01%	55,38±3,01%

*NL=não lavado
Fonte: Própria do autor.

A extrusão diminuiu o tamanho das fibras que pode ter favorecido o aumento da sacarificação em relação à biomassa *in natura*, devido à maior área de contato entre as enzimas e a celulose, facilitando o ataque enzimático.

No entanto, a configuração da rosca tem um papel importante no processo de extrusão para um rompimento eficiência destas fibras (KARUNANITHY; MUTHUKUMARAPPAN, 2010; ZHENG; REHMANN; CLARK, 2014). A rosca utilizada neste trabalho possui um projeto único e diferenciado que apresentou excelente desempenho no cisalhamento do sabugo de milho após ajustes necessários no controle operacional e uso de água e glicerol como aditivo, favorecendo a sacarificação enzimática do sabugo sem o uso de aditivos químicos.

5.3 Estudo da hidrólise enzimática do sabugo de milho pré tratado por extrusão: metodologia de análise de superfície de resposta

A seguir, realizou-se um estudo detalhado do efeito da dosagem de enzimas, complexo enzimático Cellic Ctec2, (E, x_1) e da carga de sólidos (SME-25%-NL, x_2) na conversão de celulose em glicose (y_1) e na produtividade em glicose (y_2) durante o processo de hidrólise enzimática (Tabela 5.5). Os ensaios foram realizados de acordo com um

planejamento fatorial completo 2^2 que incluiu 6 pontos na fase centrada e 3 repetições no ponto central. A Tabela 5.5 apresenta os valores reais e codificados das variáveis independentes: dosagem de enzimas (E, x1) e carga de sólidos (SME-25%-NL, x2), bem como das variáveis respostas: conversão de celulose em glicose (y1) e produtividade em glicose (y2).

Tabela 5.5 – Valores utilizados e codificados no planejamento fatorial completo 2^2 com fase centrada (4 pontos) e 4 repetições no ponto central para os dois fatores: dosagem de enzimas (x_1) e carga de sólidos (x_2) e as respostas: conversão de celulose em glicose (y_1) e produtividade em glicose (y_2).

	Ensaios	**E (FPU/g de material lignocelulósico seco) x_1**	**SME-25%-NL (% m/m) x_2**	**x_1**	**x_2**	**Conversão de Celulose em Glicose (%m/m) y_1**	**Produtividade em Glicose (g/(L.h)) y_2**
Planejamento Fatorial 2^2	1	11,00	7,50	-1	-1	84,68	0,270
	2	32,00	7,50	1	-1	95,59	0,305
	3	11,00	20,50	-1	1	64,99	0,571
	4	32,00	20,50	1	1	79,98	0,696
Composição do Modelo Face Centrada	**5**	11,00	14,00	-1	0	69,43	0,414
	6	32,00	14,00	1	0	93,75	0,558
	7	21,50	7,50	0	-1	87,53	0,279
	8	21,50	20,50	0	1	70,39	0,615
Erro puro Ponto central	PC1	21,50	14,00	0	0	96,65	0,576
	PC2	21,50	14,00	0	0	90,96	0,543
	PC3	21,50	14,00	0	0	95,09	0,565
	PC4	21,50	14,00	0	0	95,00	0,566

Fonte: Própria do autor.

Inicialmente foram realizados os ensaios correspondentes ao planejamento fatorial 2^2 (ensaios 01 a 04) e as 4 repetições no ponto central (PC1, PC2, PC3 e PC4). Nesta etapa foi possível selecionar fatores e interações de segunda ordem que foram significativos ao nível de 90-95 % de confiança. Os ensaios realizados nas mesmas condições experimentais (pontos centrais, PC) apresentaram resultados com pequenas variações tanto para a conversão de celulose em glicose (desvio padrão de 2,11 %) quanto para a produtividade em glicose (desvio padrão de 1,22 %) indicando uma boa repetibilidade para o processo.

Para estes ensaios (01 a 04), a análise estatística da conversão de celulose em glicose (y_1) e produtividade em glicose (y_2) mostraram curvaturas significativas e assim os modelos estatísticos para estas duas variáveis respostas foram compostos pelos ensaios correspondentes a face centrada (ensaios 05-08).

No geral, a máxima conversão de celulose em glicose (valores maiores que 90 %) foram encontrados com o uso de elevadas doses de enzimas (20,5 e 32 FPU/$g_{material\ lignocelulósico\ seco}$) em associação com baixas concentrações de sólidos (7,5 %m/m: ensaio 02 e 14 % m/m: ensaio 6 e pontos centrais). Com a diminuição da dosagem de enzimas (11 FPU/g $_{material\ lignocelulósico\ seco}$) e aumento da carga de sólidos (20,50 % m/m: ensaio 3) a conversão de celulose em glicose foi reduzida para 64,99 %.

Com relação ao máximo valor de produtividade em glicose (0,696 g/L.h), este foi encontrando com o uso tanto de elevada dose de enzimas (32 FPU/g $_{de\ material\ lignocelulósico\ seco}$) quanto de elevada carga de sólidos (20,5 % m/m) (Tabela 5.5). Os ensaios com redução da carga de sólidos (7,5 %m/m), independentemente da dose de enzimas, apresentaram os menores valores de produtividade em glicose (~ 0,27 g/L.h).

Os coeficientes de regressão para as respostas: conversão de celulose em glicose (Tabela 5.6) e produtividade em glicose (Tabela 5.7), foram calculados com os resultados dos experimentos realizados de acordo com a Tabela 5.5. Em ambos os casos, observa-se que os termos lineares das variáveis (x_1 e x_2), bem como o termo quadrático da variável x_2 foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 10 % ($p < 0,1$). Os fatores e interações que não foram estatisticamente significativos no nível de 90% de confiança foram retirados da composição dos respectivos modelos.

Tabela 5.6 – Coeficientes de regressão para a resposta conversão de celulose em glicose (y_1).

Fatores	**Coeficiente de regressão**	**Erro padrão**	**p – valor**
Constante	0,9189	0,0273	<0,0001
x_1(L)	0,0837	0,0244	0,014
x_2(L)	-0,0874	0,0244	0,012
x_1(Q)	-0,0524	0,0366	0,202
x_2(Q)	-0,0787	0,0366	0,075
x_1X_2	0,0102	0,0299	0,745

Fonte: Própria do autor.

Tanto para a resposta conversão de celulose em glicose, quanto para a produtividade em glicose, foi realizada uma análise dos resíduos de cada modelo proposto que mostrou que os valores preditos pelas curvas com relação à média e seus respectivos resíduos estavam

dispostos de maneira aleatória (dados não apresentados). Este fato não sugere um padrão geométrico que possa indicar uma anormalidade na distribuição dos resíduos. Com isso, para ambos os casos, considerou-se que as curvas estão representando os pontos de maneira satisfatória, pois os erros seguem uma distribuição normal.

Tabela 5.7 – Coeficientes de regressão para a resposta produtividade em glicose (y_2).

Fatores	**Coeficiente de regressão**	**Erro padrão**	**p – valor**
Constante	0,548	0,016	<0,0001
x_1(L)	0,0506	0,0143	0,012
x_2(L)	0,1716	0,0143	<0,0001
x_1(Q)	-0,0315	0,0215	0,193
x_2(Q)	-0,0706	0,0215	0,017
x_1x_2	0,0224	0,0175	0,249

Fonte: Própria do autor.

A seguir, para a resposta conversão de celulose em glicose (Tabela 5.8) e para a produtividade em glicose (Tabela 5.9), foram realizadas a análise de variância (ANOVA), que utiliza o método de ajuste do mínimo quadrado, incluindo as médias quadráticas e as interações de 2ª ordem, para testar se a equação de regressão é estatisticamente significativa.

Em ambos os casos (Tabela 5.8 e Tabela 5.9), os níveis de significância para os fatores e interações encontram-se em 99% de confiança, indicando que o F estimado foi maior que o F Tabelado. Assim, em ambos os casos (Tabela 5.8 e Tabela 5.9), tem-se a evidência da existência de uma relação quadrática dos fatores e interações (variáveis independentes) com a variáveis respostas que são a conversão de celulose em glicose e a produtividade em glicose, respectivamente, indicando que todos os fatores foram estatisticamente significativos, com bom intervalo de confiança.

Nas Tabelas 5.8 e 5.9, também se encontram as análises de variância de ajuste dos modelos quadráticos. Em cada caso, o resíduo total foi desmembrado em falta de ajuste e erro puro. Este procedimento é válido uma vez que foram realizadas as repetições no ponto central para poder se obter uma estimativa do erro aleatório (erro puro). Assim, pode-se julgar de maneira quantitativa se os modelos representam satisfatoriamente as observações.

Tabela 5.8 – Análise de variância (ANOVA) para a maximização da conversão de celulose em glicose na hidrolise enzimática do sabugo de milho extrudado (SME-25%-NL) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 4 repetições no ponto central.

Fonte de variação	Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
Modelo		1156	3	385	10,55	0,004
	x_1 (L)	420,341	1	420,341	11,51	0,009
	x_2 (L)	458,326	1	458,326	12,54	0,008
	x_2 (Q)	277.633	1	277.633	7,6	0,025
Resíduo		292,083	8	36,5104	-	-
	Falta de ajuste	274,354	5	54,8707	9,29	0,048
	Erro puro	17,7297	3	5,9099	-	-
Total (Corr)		1448,38	11	-	-	-

R^2 =0,7983 R^2 (ajustado)=0,7226

Fonte: Própria do autor.

Tabela 5.9 – Análise de variância (ANOVA) para a maximização da produtividade de glicose na hidrolise enzimática do sabugo de milho extrudado (SME-25%-NL) seguindo um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 4 repetições no ponto central.

Fonte de variação	Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
Modelo		0,2117	3	0,0706	46,94	>0,0001
	x_1 (L)	0,0154	1	0,0154	10,22	0,013
	x_2 (L)	0,1766	1	0,1766	117,48	>0,0001
	x_2 (Q)	0,0197	1	0,0197	13,13	0,007
Resíduo		0,0120	8	0,0015	-	-
	Falta de ajuste	0,0114	5	0,0022	11,56	0,036
	Erro puro	0,0005	3	0,0002	-	-
Total (Corr)		0,2237	11	-	-	-

R^2 =0,9462 R^2 (ajustado)=0,9261

Fonte: Própria do autor.

Analisando as Tabelas 5.8 e 5.9 para as respostas: conversão de celulose em glicose (y_1) e produtividade em glicose (y_2), verificam-se que os modelos, após retiradas dos termos estatisticamente não significativos ao nível de 90% de confiança, foram altamente significativos com $p< 0,004$ e $p<0,0001$, respectivamente, e as porcentagens de variação explicada de 79,83% (y_1) e 94,62% (y_2). Para os casos, os valores de p das análises de variância dos modelos foram menores que 0,01; indicando que estatisticamente existe uma relação entre as variáveis ao nível de 99% de confiança.

As equações 9 e 10 descrevem a conversão de celulose em glicose (%m/m) (y_1) e a produtividade em glicose (g/L.h) (y_2), respectivamente. Estas equações foram previstas pelos modelos reparametrizados em função das variáveis codificadas, que contém apenas os termos estatisticamente significativos (Tabela 5.8 e Tabela 5.9).

$$y_1 = +90{,}1467 + 8{,}37x_1 - 8{,}74x_2 - 9{,}62x_2^2 \quad \textbf{(9)}$$

$$y_2 = +0{,}5375 + 0{,}0506x_1 + 0{,}1716x_2 - 0{,}0811x_2^2 \quad \textbf{(10)}$$

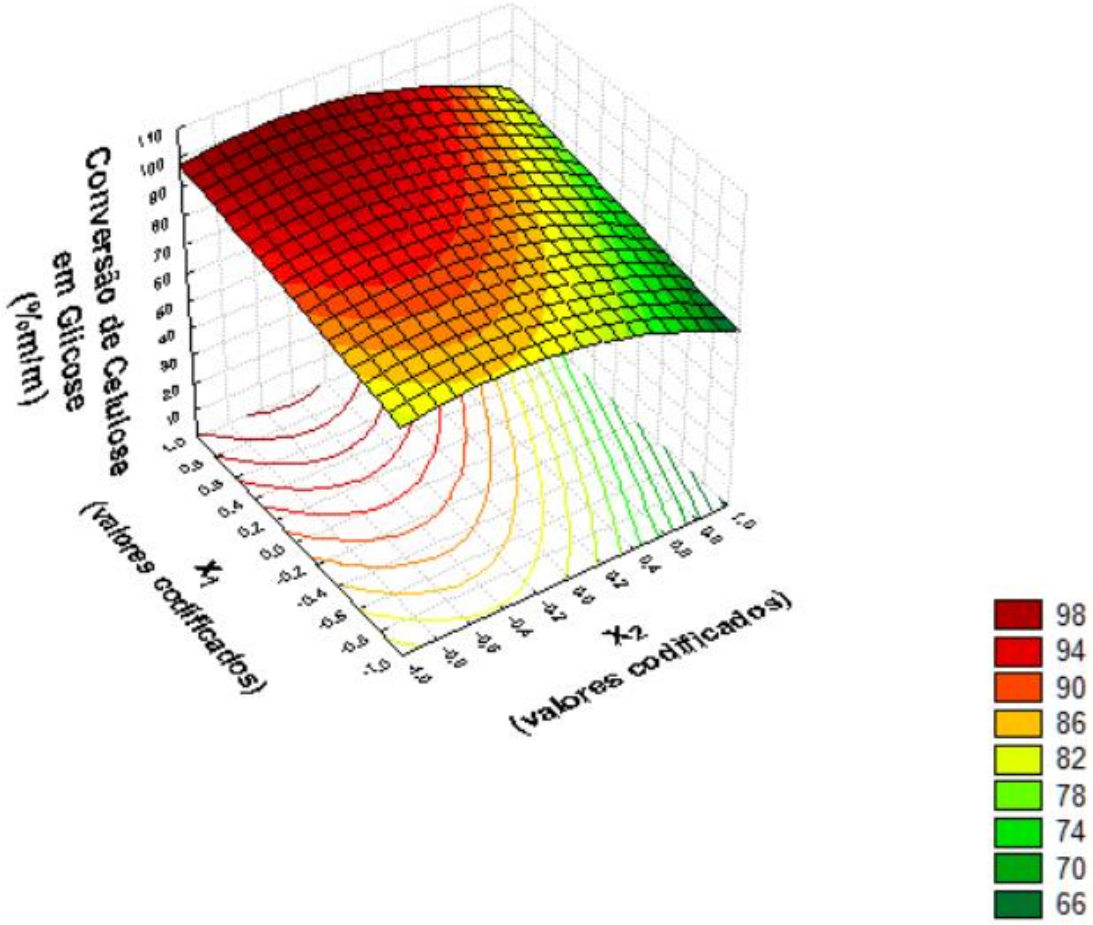
Em que: y_1 e y_2 correspondem à conversão de celulose em glicose (%m/m) e a produtividade em glicose (g/L.h), respectivamente. Os valores de x_1 e x_2 correspondem aos valores codificados para as variáveis: dose de enzima utilizada na hidrólise enzimática em FPU/$g_{\text{material lignocelulósico seco}}$ e carga de sólidos em massa seca de sabugo de milho por massa de solução da hidrólise enzimática (%m/m), respectivamente.

Observa-se pela equação 9, que ambas as variáveis lineares apresentaram sinal positivo, ou seja, quanto maior a relação de carga de sólidos e a dosagem enzimática inicialmente no processo, maior a produtividade em glicose. Porém, a equação 10 nos traz que, quanto maior a dose de enzimas, maior a sacarificação da celulose, porém, ao ser aumentada a quantidade inicial de carga de sólidos, menor esta sacarificação. Quanto à única variável quadrática no processo, esta apresentou sinal negativo em ambas as equações, tendo sempre impacto negativo às duas variáveis resposta quanto mais longe do ponto central.

Como não houve interação significativa entre os fatores (x_1x_2), não é possível fazer estudo entre interação das variáveis independentes. Foram geradas duas superfícies de respostas com suas respectivas curvas de contorno, uma para conversão de celulose em glicose (%), y_1 (Figura 5.5) e outra para produtividade em glicose (g/L.h), y_2 (Figura 5.5).

Analisando as superfícies de respostas, verifica-se a existência de regiões ótimas tanto para a conversão de celulose em glicose (Figura 5.5), quanto para a produtividade em glicose (Figura 5.6). No caso, da conversão de celulose em glicose, essa região ótima está em uma faixa de combinação da dosagem de enzimas mantida em seu nível superior à 20 FPU/$g_{\text{material lignocelulósico}}$, enquanto a carga de sólidos, abaixo de 18 %m/m. Para a produtividade em glicose (Figura 5.6), essa região ótima está em uma faixa de combinação da dosagem de enzimas mantida em seu nível superior à 20 FPU/$g_{\text{material lignocelulósico}}$ com a carga de sólidos acima de 16 % m/m.

Figura 5.5 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a conversão de celulose em glicose (%) em função dos valores codificados para a dosagem de enzima (x_1) e carga de sólidos (x_2).

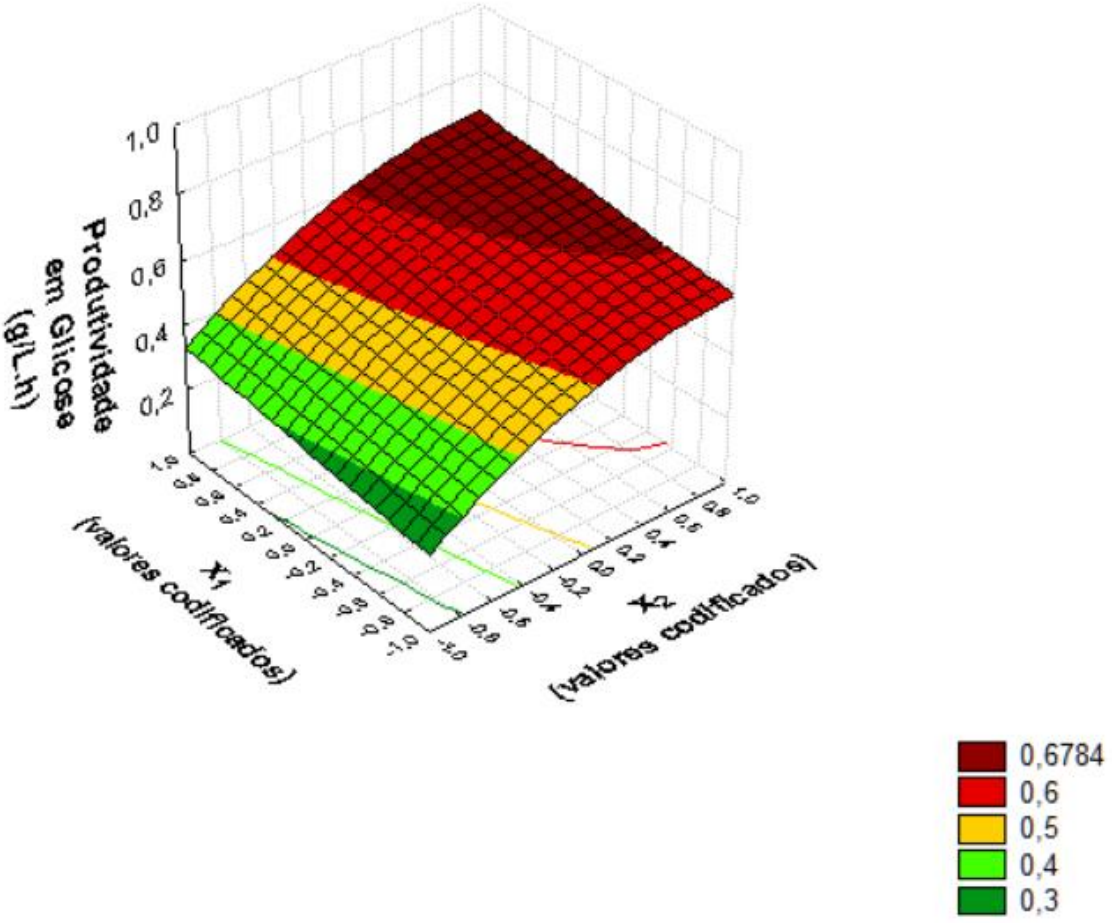


Fonte: Própria do autor.

Em escala industrial, na conversão de biomassa para etanol ou outros produtos, são necessárias altas cargas de sólidos por razões econômicas e ecológicas. Atualmente, a sacarificação em escala industrial da biomassa não é economicamente viável se a carga de sólidos for inferior a 15% (p/v) (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Os resultados encontrados neste trabalho para a carga de sólidos encontram-se bem próximos deste valor ideal. No entanto, a dosagem de enzimas precisou ser elevada para que a conversão de celulose atingisse valores maiores que 90 %. Apesar da redução relatada nos custos de produção de enzimas ao longo da última década, as enzimas podem ainda compreender 15% ou mais do custo total da conversão de biomassa em etanol (HUMBIRD et al., 2011).

Figura 5.6 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a produtividade em glicose (g/L.h) em função dos valores codificados para a dosagem de enzima (x_1) e carga de sólidos (x_2).



Fonte: Própria do autor.

A vantagem deste trabalho foi empregar sabugo de milho pré-tratado pelo processo de extrusão sem associar nenhum outro pré-tratamento químico, e conseguir elevada eficiência de conversão de celulose em glicose (> 90%). Por lado, além da celulose, o meio continha hemicelulose e lignina que também apresentam efeitos inibitórios durante a etapa de hidrólise enzimática de biomassa, reduzindo sua eficiência de conversão. Este fato pode justificar o favorecimento da conversão de celulose em glicose com o aumento da dosagem enzimática em detrimento da diminuição da carga de sólidos na etapa de sacarificação.

No entanto, para aumentar a eficiência de conversão de biomassa em seus componentes básicos (por exemplo açúcares), é desejado diminuir o tempo de reação, mantendo-se baixa dosagem enzimática, além do uso de elevada carga de sólidos. Para isso, estudos complementares serão necessários visando a associação do processo de extrusão a outros pré-tratamentos químicos, no intuito de promover a remoção total ou parcial da

lignina e hemicelulose e, com isso, otimizar o processo de sacarificação empregando maior carga de sólidos com possível redução da dosagem de enzimas.

5.3.1 Validação experimental

A metodologia de análise da superfície de resposta auxiliou na determinação das condições das variáveis independentes estudadas (dosagem de enzima e carga de sólidos), para a hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por extrusão, a fim de maximizar a conversão de celulose em glicose e produtividade em glicose. Esta análise foi facilitada com o uso do Software MINITAB, no qual se estipulou como parâmetro de otimização a conversão de celulose em glicose acima de 90% m/m, e máxima produtividade em glicose (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 – Condições operacionais utilizadas nos ensaios experimentais para validação dos modelos para maximar a conversão de celulose em glicose em associação com a produtividade em glicose durante hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por extrusão.

Variável	**Valor codificado**	**Condição experimental**
Dosagem de enzima (E, x_1) (**FPU/g** $_{\text{material lignocelulósico seco}}$)	+1,00	32
Carga de sólidos (SME-25%-NL, x_2) (**%m/m**)	+0,64	17,8

Fonte: Própria do autor.

A Tabela 5.11 mostra os resultados preditos e observados para o ensaio de validação experimental. Os resultados experimentais para a conversão da celulose em glicose e produtividade em glicose, assemelharam-se com os resultados preditos. Apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e preditos, pode-se considerar que os resultados obtidos no ensaio de validação foram satisfatórios.

Tabela 5.11 – Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo do processo de hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por extrusão.

Variável de resposta	**Resultado predito ***	**Resultado experimental**
Conversão de celulose em glicose (%m/m)	90,12% ± 3,39%	91,84%
Produtividade em glicose (g/L.h)	0,6607 ± 0,0218	0,6907

*modelos reparametrizados constituídos apenas dos parâmetros estatisticamente significativos
Fonte: Própria do autor.

A Tabela 5.12 apresenta a composição parcial do hidrolisado de sabugo de milho obtido nas condições de ponto ótimo do processo de hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por extrusão. Nestas condições, o hidrolisado de sabugo de milho, além de conter glicose (57,84 g/L), apresentou elevada concentração de xilose (26,597 g/L), que correspondeu a um rendimento mássico em xilose de 41,58 %. O hidrolisado também possui pequenas concentrações de celobiose (2,904 g/L).

O processo de extrusão apresenta uma grande vantagem, a não formação de inibidores de fermentação. No entanto, no hidrolisado de sabugo de milho foi encontrado baixas concentrações de ácido acético (0,35 g/L) e 5-hidroximetilfurfural (HMF) (0,027g/L) (Tabela 5.12), que provavelmente foram formados durante a etapa de desativação da enzima após a hidrólise enzimática (autoclavagem a 111°C por 15 min). Os trabalhos encontrados na literatura reportam ausência de inibidores no produto extrudado (ALETA DUQUE; PALOMA MANZANARES, 2017; UPPUGUNDLA et al., 2014), exceto para casos em que a extrusão é realizada em associação a outro pré-tratamento, dependendo também da temperatura utilizada (SINGH; BAJAR; BISHNOI, 2014).

A elevada concentração de glicerol (75,984 g/L) no hidrolisado deve-se ao fato do sabugo de milho extrudado não ter sido lavado, mas sua presença não interferiu na etapa de sacarificação (dados apresentados anteriormente).

Tabela 5.12 – Composição parcial do hidrolisado de sabugo de milho obtido nas condições do ponto ótimo do processo de hidrólise enzimática.

Amostra	**Glicose (g/L)**	**Celobiose (g/L)**	**Xilose e Arabinose (g/L)**	**Ácido Acético (g/L)**	**Glicerol (g/L)**	**HMF (g/L)**
Condição Otimizada	57,84	2,904	26,597	0,35	75,984	0,027

Fonte: Própria do autor.

A Tabela 5.13 mostra a concentração de açúcares monoméricos obtidos do sabugo de milho pré-tratado por extrusão e após sua hidrolise enzimática sob condições otimizadas e não otimizadas (SME-25%-NL, Ctec2) pela metodologia de análise de superfície de resposta.

A condição otimizada favoreceu a obtenção de açúcares solúveis (g/L) em 40 %. Assim, foi possível obter uma solução mais rica em açúcares solúveis (84,44 g/L) (Tabela 5.13), utilizando o mesmo volume de meio. Nesta condição foi utilizada maior carga de

sólidos (17,8 %m/m) do que na condição não otimizada (10% m/m) (SME-255-NL, Cellic Ctec2) e com isso obteve-se um aumento de 58,20% e 12,19 % nas concentrações de glicose e de xilose e arabinose, respectivamente (Tabela 5.13).

Tabela 5.13 – Açúcares monoméricos obtidos do sabugo de milho pré-tratado por extrusão e após sua hidrolise enzimática sob condições otimizadas e não otimizadas (SME-25%-NL, Ctec2) pela metodologia de análise de superfície de resposta.

Amostra	Glicose		Xilose + Arabinose		Açúcares totais	
	g/L*	g/g**	g/L*	g/g**	g/L*	g/g**
Condição Otimizada	57,843	0,323	26,597	0,148	84,437	0,471
SME-25%-NL (CteC2)	36,565	0,327	23,708	0,212	60,274	0,540

g/L* = gramas do açúcar por litro de solução de hidrolisado enzimático
g/g** = gramas de açúcar por grama de material lignocelulósico seco
Fonte: Própria do autor.

Com o uso da metodologia de análise de superfície de resposta (RSM) foi possível aumentar a concentração de sólidos mantendo-se praticamente constante o rendimento da quantidade de glicose por grama de sabugo de milho seco (~ 0,325 g/g) com redução (30,10%) no rendimento da quantidade de xilose e arabinose por grama de sabugo de milho seco. Com isso, o rendimento na quantidade de açúcares totais por grama de sabugo de milho seco (0,471 g/g) foi reduzida em 12,78% em comparação com a condição não otimizada pela RSM.

Estes resultados mostraram que na condição otimizada (dosagem de enzimas de 32 FPU/$g_{\text{material lignocelulósico seco}}$ e carga de sólidos de 17,8 % m/m) foi possível obter 471 Kg de açúcares totais (323 Kg de glicose e 148 Kg de xilose e arabinose) para cada tonelada de sabugo de milho em base seca.

Nesta condição otimizada a conversão enzimática de celulose em glicose foi de 90,12 % e a conversão enzimática de hemicelulose em xilose e arabinose foi de 44,0 %. Assim, para que o rendimento em açúcares totais seja melhorado há necessidade de otimização da conversão de hemicelulose.

A acessibilidade da celulose pode ser aumentada principalmente por pré-tratamentos eficientes da biomassa, que leva à remoção parcial dos componentes da parede celular, por exemplo, remoção de lignina ou xilana da matriz de lignocelulose (MOSIER et al., 2005). Para aumentar o rendimento global de açúcar de biomassa, pentoses, principalmente xilose, precisam ser recuperadas juntamente com a glicose. Dependendo das condições de pré-tratamento, a xilose pode ser recuperada parcialmente a partir do licor de pré-tratamento e parcialmente após hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada (MOSIER et al., 2005).

Kleingesinds (2017) obteve favorecimento no rendimento em glicose (80,54 %) e concentração em glicose (61,98 g/L) no meio reacional concomitantemente com o favorecimento no rendimento em xilose (70,66 %) ao empregar sabugo de milho pré-tratado por ácido sulfúrico diluído e surfactante na hidrólise enzimática. Este autor mostrou que o uso do surfactante no pré-tratamento de sabugo de milho com ácido sulfúrico diluído surtiu maior efeito na remoção de lignina e hemicelulose quando empregado na concentração de 10% (m/m). No entanto, nesta condição foi possível observar um aumento (21,1%) na perda de celulose em relação ao pré-tratamento sem a presença de surfactante. A maior diminuição na cristalinidade (81,23%) foi com o uso de 10% do tensoativo. Nestas condições de pré-tratamento do sabugo de milho, com uso de surfactante também na hidrolise enzimática (10 % m/m) foi possível reduzir a dosagem de enzima (25,50 FPU/$g_{material\ lignocelulósico\ seco}$).

5.3.2 Cinética do processo de hidrólise enzimática

A Figura 5.7 mostra os perfis das concentrações dos açúcares (glicose, xilose e celobiose) obtidos durante hidrólise enzimática do sabugo de milho extrudado (SME-25%-NL) nas condições de dosagem de enzimas (32 FPU/$g_{material\ lignocelulósico\ seco}$) e carga de sólidos (17,8 % m/m) estabelecidas pela metodologia de análise de superfície de resposta (RSM) para maximizar a conversão de celulose em glicose e produtividade em glicose.

As máximas concentrações de glicose (57,84 g/L) e celobiose (2,90 g/L) foram em 57 h de reação enzimática (Figura 5.7). Enquanto que a máxima concentração de xilose (26,59 g/L) foi em 20 h de reação enzimática (Figura 5.7). Nestes mesmos tempos reacionais, obteve-se valores de conversões de celulose em glicose de 90,84% (Figura 5.8) e de hemicelulose em xilose de 44,0% (Figura 5.8).

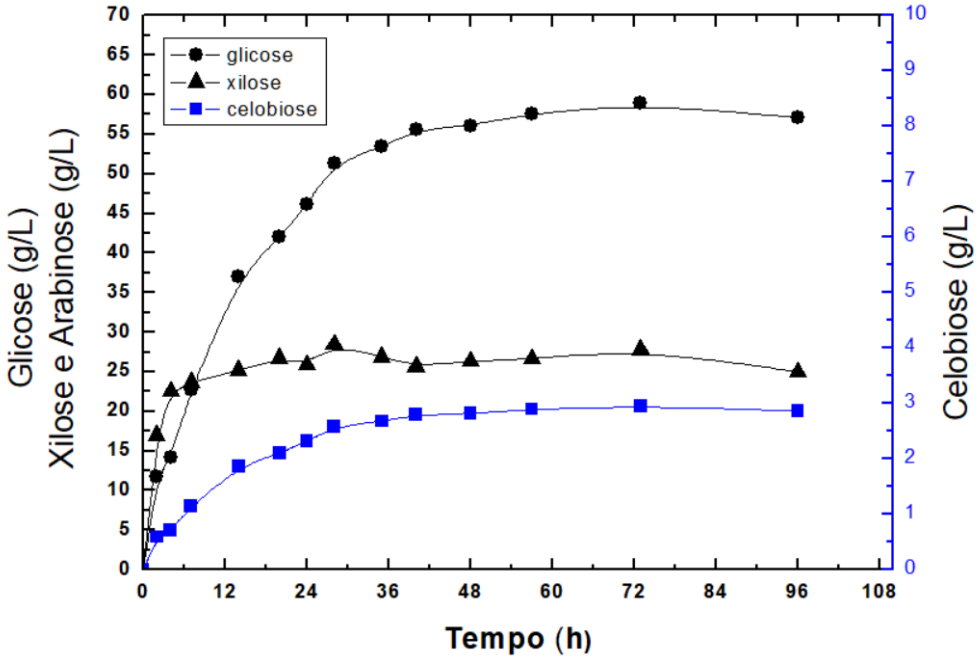
Estes valores de conversões podem ser considerados satisfatórios, visto que valores semelhantes são obtidos quando a extrusão é associada a um tratamento químico como alcalino ou ácido (PROCENTESE et al., 2015).

(SAMUEL et al., 2010)Zhang et al., (2012) obtiveram valores semelhantes para conversão de celulose em glicose (86,8 %) e conversão de hemicelulose em xilose (50,5 %) empregando semelhantes condições de hidrólise enzimática para a palha de milho (carga de sólidos de 18 %m/m) pré-tratada por extrusora de dupla rosca com adição de álcali. No entanto, Coimbra et al., (2016) obtiveram, além de elevada conversão de celulose em glicose

(80%), elevada conversão de hemicelulose em xilose (90%) empregando condições semelhantes de hidrólise enzimática para a palha de trigo pré-tratada por extrusão alcalina.

No caso do trabalho de Fan et al., (2014) obteve-se conversão de celulose em glicose de 85,3 % (m/m), porém empregando sabugo de milho pré-tratado por explosão a vapor com adição de ácido e elevada dosagem enzimática (~ 50 FPU/$g_{material\ lignocelulósico}$) e carga de sólidos de 15 % (m/m).

Figura 5.7 – Perfis das concentrações dos açúcares, glicose (●), xilose (▲) e celobiose (■), obtidos durante hidrólise enzimática do sabugo de milho extrudado (SME-25%-NL) nas condições estabelecidas pela metodologia de análise de resposta (RSM).



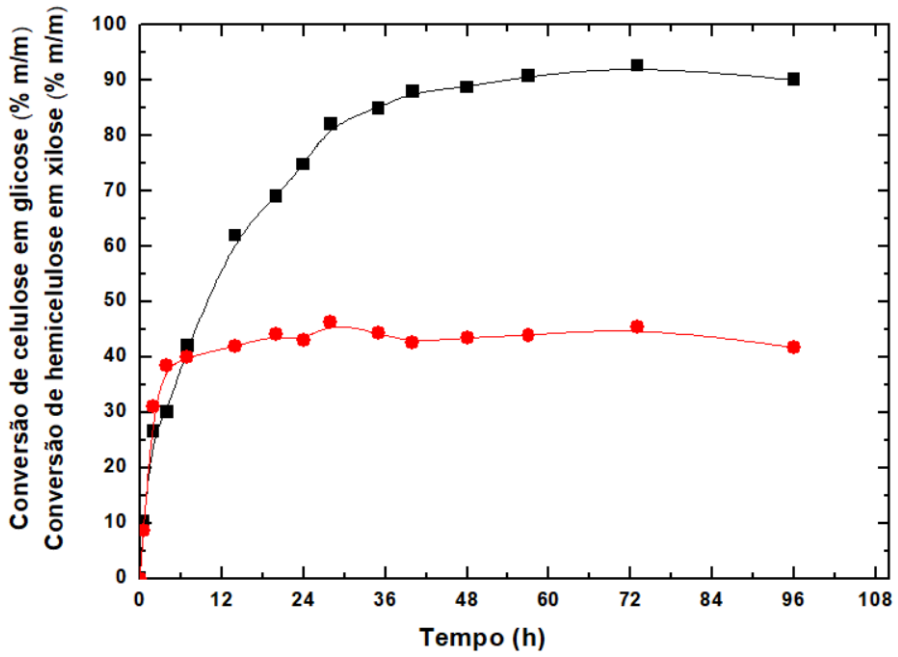
Fonte: Própria do autor

De acordo com Palmqvist (2014), a hemicelulose e lignina estão associadas física e quimicamente com a celulose por ligações de hidrogênio e ligações covalentes. A estrutura da celulose altamente ordenada, bem como a complexidade e heterogeneidade da parede celular das plantas, torna a biomassa recalcitrante, isto é, resistente à hidrólise enzimática.

Além disso, esta estrutura tridimensional densamente empacotada apresenta poros médios de pequenos diâmetros, o que dificulta a penetração de enzimas na matriz lignocelulósica, restringindo a área superficial disponível para ação enzimática (MENG; RAGAUSKAS, 2014). Assim, as matrizes de hemicelulose e lignina que estão em torno das fibras de celulose devem ser pelo menos parcialmente desagregadas ou afrouxadas para permitir a penetração de enzimas. No processo de extrusão a velocidade da rosca e a

temperatura do cilindro podem desestruturar a biomassa, aumentando a acessibilidade da celulose para hidrólise (ALETA DUQUE; PALOMA MANZANARES, 2017).

Figura 5.8 – Perfis das conversões de celulose em glicose (■) e hemicelulose em xilose (●) obtidos durante hidrólise enzimática do sabugo de milho extrudado (SME-25%-NL) nas condições estabelecidas pela metodologia de análise de resposta (RSM).



Fonte: Própria do autor.

A cinética da maioria das reações catalisadas por enzimas segue o modelo Michaelis-Menten. As constantes cinéticas (K_m e V_{max}) foram determinadas usando-se o método gráfico de Lineweaver Burk (SHULER; KARGI, 2002), plotando-se 1/S *versus* $1/V_0$ (Figura 5.9).

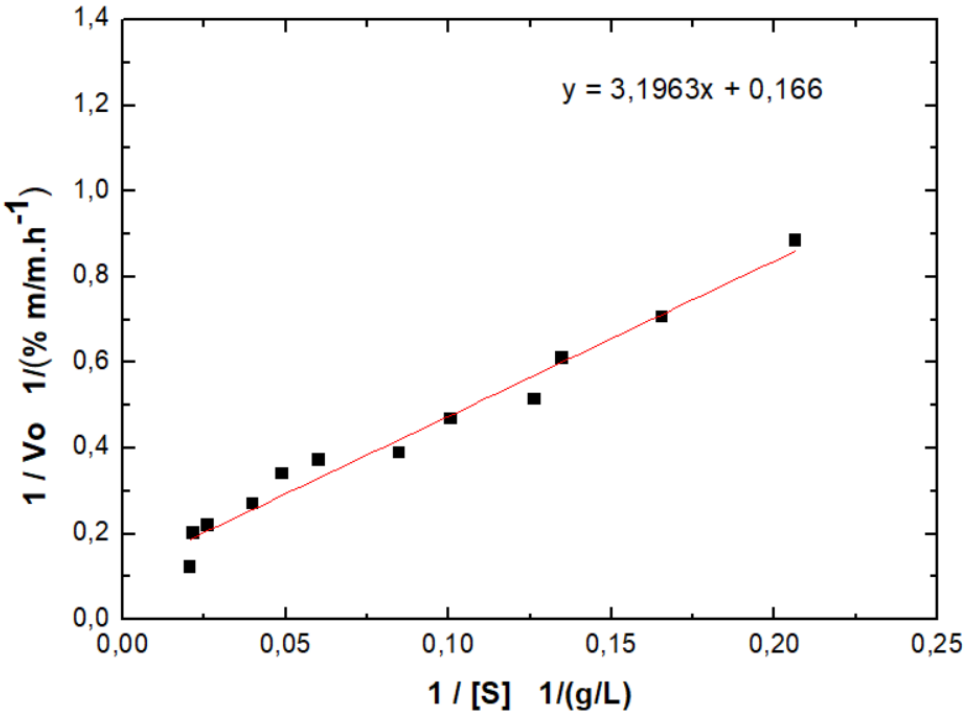
O V_{max} é o limite para que tende a velocidade da reação (V_0) quando a concentração do substrato S tende para infinito. O K_m é a concentração de substrato para o qual o valor de da velocidade da reação (V_0) é metade do valor de V_{max}. Estas constantes foram calculadas utilizando a equação 8.

A velocidade máxima (V_{max}) (9,62 %m/m por hora) de conversão de hemicelulose em xilose e arabinose foi maior do que a velocidade máxima (6,00 %m/m por hora) de conversão de celulose em glicose. Para a conversão de celulose em glicose obteve-se o K_m de 22,59 g de celulose por litro de solução (g/L).

Eckard, Muthukumarappan e Gibbons (2011) obtiveram valores semelhantes de K_m (21,29 g/L) e velocidade máxima de hidrólise enzimática (5,3 %m/m) quando fizeram o estudo cinético da hidrólise enzimática da palha de milho pré-tratada por extrusão e

polietileno glicol. Com estes valores de constantes cinéticas, esses autores obtiveram conversões da celulose em glicose de até 98%.

Figura 5.9 – Gráfico de Lineweaver-Burk (1/Vo *versus* 1/[S]).



Fonte: Própria do autor.

O ensaio na condição otimizada utilizou o complexo enzimático Cellic CTec2, que possui uma combinação de celulases potentes e enzimas auxiliares como alto nível de β-glicosidades e apenas uma pequena parcela de hemicelulases. Assim que a hidrolise enzimática prossegue, há acúmulo de produtos da hidrolise que podem causar severa inibição nas celulases, reduzindo a velocidade da hidrólise especialmente em situações com elevada carga de sólidos. Consequentemente, há diminuição dos rendimentos de hidrólises (KESHK, 2016).

Celobiohidrolases são conhecidas por serem inibidas pela celobiose, seu produto de hidrólise. Esta inibição é aliviada pela suplementação de celulases com β-glicosidades que clivam a celobiose em monômeros de glicose. Entretanto, como a celobiose, a glicose também exerce inibição como produto final das β-glicosidades. Em adição, outros açúcares como xilose, manose e galactose provenientes da hemicelulose também tem apresentado efeito inibitório sobre a atividade de celulases (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Além da hemicelulose, a remoção de lignina aumenta a acessibilidade do substrato. Além de dificultar a acessibilidade para carboidratos, a lignina também pode se ligar de forma improdutiva às celulases (PALONEN et al., 2004) e causar inativação lenta das

enzimas ligadas (RAHIKAINEN et al., 2011) levando a uma redução na quantidade de enzimas disponíveis para hidrólise, e consequentemente diminuição do rendimento de hidrólise.

Um critério importante relacionado com a velocidade de hidrólise, envolve a capacidade de adsorção de celulases sobre a superfície da celulose. A velocidade de hidrólise enzimática mostrou-se proporcional à quantidade de enzimas adsorvidas, até um valor crítico de saturação, o qual depende do índice de cristalinidade. A diferença de reatividade entre a celulose cristalina e amorfa pode ser relacionado à capacidade de adsorção de endoglucanases em ambos os tipos de substrato.

5 CONCLUSÕES

O pré-tratamento do sabugo de milho por extrusão empregando dupla rosca foi favorecido devido a estas roscas possuírem um projeto único e diferenciado que apresentou excelente desempenho no cisalhamento do sabugo de milho após ajustes necessários no controle operacional e uso de água e glicerol como aditivos. Assim, houve favorecimento da hidrólise enzimática do sabugo mesmo com pouca diminuição no grau de cristalinidade (1,4%) do material pré-tratado, e sem adição de químicos ao processo de extrusão.

O uso do complexo enzimático comercial Cellic Ctec2, que é uma combinação de celulases potentes, contendo alto nível de β-glicosidades favoreceu a conversão de celulose em glicose. Porém, esta conversão foi reduzida quando se fez uso simultâneo do complexo enzimático comercial Cellic HTec2 que, por conter uma combinação de endoxilanase com alta especificidade para solubilizar a hemicelulose, favoreceu a conversão de hemicelulose em seus açúcares monoméricos (xilose e arabinose), os quais provavelmente inibiram a conversão de celulose em glicose. A etapa de lavagem dos sólidos não interferiu significantemente nestas conversões indicando que o glicerol presente no meio reacional não causou inibição na hidrólise enzimática.

O uso da metodologia de análise de superfície de resposta (RSM) foi uma ferramenta valiosa para maximizar a conversão de celulose em glicose, bem como a produtividade em glicose através da associação da dosagem de enzimas e carga de sólidos. Nesta etapa, constatou-se favorecimento na produtividade em glicose com o aumento simultâneo da carga de sólidos e da dosagem de enzimas. Por outro lado, o aumento na dosagem de enzimas, promoveu maior sacarificação da celulose quando a carga inicial de sólidos foi reduzida no meio reacional.

A vantagem deste trabalho foi empregar sabugo de milho pré-tratado pelo processo de extrusão, sem associar nenhum outro pré-tratamento químico, e conseguir elevada eficiência de conversão de celulose em glicose (> 90%). Porém, estudos complementares precisarão ser realizados para recuperar melhor a hemicelulose e a lignina do sabugo de milho pré-tratado por extrusão.

REFERÊNCIAS

AKANKSHA, K. et al. Dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of sorghum biomass for sugar recovery - A statistical approach. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, n. 11, p. 1082–1089, 2014.

ALETA DUQUE; PALOMA MANZANARES, M. B. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. **Renewable Energy**, v. 114, p. 1427–1441, 2017.

ALVES, D. A. DE H.; KARLA MIRANDA BARCELLOS; ABUD, A. K. DE S. Caracterização de briquetes obtidos a partir de resíduos do beneficiamento da mandioca e do milho. v. 18, n. 1, p. 41–48, 2016.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.

ANDERSONSCOB. **The Corncob Drying, Milling and Packaging Process Flow**. Disponível em: <www.andersonscob.com>. Acesso em: 1 jan. 2016.

ANWAR, Z.; GULFRA, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014.

ANWAR, Z.; GULFRAD, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014.

BAHCEGUL, E. et al. Extrusion of xylans extracted from corn cobs into biodegradable polymeric materials. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 582–585, 2013.

BARL, B. et al. Combined chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 56, n. 2, p. 195–214, 1991.

BERLIN, A. et al. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates – evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 175–184, 1 jul. 2005.

Biorrefinaria: futuro para o completo aproveitamento da biomassa de cana. Disponível em: <https://www.novacana.com/estudos/biorrefinaria-futuro-para-o-completo-aproveitamento-da-biomassa-de-cana-241013/>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n. 2, p. 90–104, 1981.

BOZELL, J. Connecting biomass and petroleum processing with a chemical bridge. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 522–523, 2010.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. DOS; SOUZA, A. P. DE. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: **Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade.** São Paulo: [s.n.]. p. 365–380.

CAI, D. et al. Biorefinery of corn cob for microbial lipid and bio-ethanol production: An environmental friendly process. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 677–684, 2016.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate**

research, v. 337, n. 14, p. 1291–6, ago. 2002.

CARVALHO, F. C. DE. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. **Informações Econômicas**, v. 22, n. 12, p. 31–46, 1992.

CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

COIMBRA, M. C. et al. Sugar production from wheat straw biomass by alkaline extrusion and enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 86, p. 1060–1068, 2016.

DA SILVA, A. S. et al. Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production. In: **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. [s.l.] InTech, 2013.

DUQUE, A.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. **Renewable Energy**, v. 114, p. 1427–1441, 2017.

ECKARD, A. D.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; GIBBONS, W. Pretreatment of Extruded Corn Stover with Polyethylene Glycol to Enhance Enzymatic Hydrolysis: Optimization, Kinetics, and Mechanism of Action. **BioEnergy Research**, v. 5, n. 2, p. 424–438, 2011.

ESTATÍSTICA, I. B. DE G. E. **Safra de milho deve ser 38,9% maior em 2017, com produção recorde, diz IBGE - Globo Rural | Milho**. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/Milho/noticia/2017/02/globo-rural-safra-de-milho-deve-ser-389-maior-em-2017-com-producao-recorde-diz-ibge.html>. Acesso em: 20 jan. 2017.

FAN, X. et al. Effects of acid impregnated steam explosion process on xylose recovery and enzymatic conversion of cellulose in corncob. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, n. December 2015, p. 21–26, 2014.

FOLEY, K. M.; VANDER HOVEN, D. I. B. Properties and industrial uses of corncobs. **The American Association of Cereal Chemists**, 1981.

GÜBITZ, G. M. et al. Lignin-hemicellulose complexes restrict enzymatic solubilization of mannan and xylan from dissolving pulp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 390–395, 28 set. 1998.

HAMES, B. R. Biomass compositional analysis for energy applications. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 581, p. 145–67, 2009.

HAQ, F. et al. Recent progress in bioethanol production from lignocellulosic materials: A review. **International Journal of Green Energy**, v. 13, n. 14, p. 1413–1441, 13 nov. 2016.

HILL, J. et al. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of sciences**, v. 103, n. 30, p. 11206–11210, 2006.

HU, J. et al. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy & Environmental Science**, v. 7, n. 7, p. 2308, 2014.

HUMBIRD, D. et al. **Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover**. Golden, CO (United States): [s.n.]. Disponível em: <http://www.osti.gov/servlets/purl/1013269-rQta8H/>. Acesso em: 22 jan. 2018.

JIA, J. et al. Novel Magnetic Cross-Linked Cellulase Aggregates with a Potential Application in Lignocellulosic Biomass Bioconversion. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 269, 10 fev. 2017.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 119–134, 1 out. 2007.

JOSE, A. H. M.; RODRIGUES, R. DE C. L. B. **Obtenção de Hidrolisado Hemicelulósico de Sabugo de Milho por Hidrólise Ácida para Produção de Xilitol por Candida guilliermondii FTI**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

KARUNANITHY, C.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Effect of Extruder Parameters and Moisture Content of Corn Stover and Big Bluestem on Sugar Recovery from Enzymatic Hydrolysis. **Biological Engineering**, v. 2, n. 2, p. 91–113, 2010.

KESHK, S. M. A. S. Cellulase Application in Enzymatic Hydrolysis of Biomass. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [s.l: s.n.]. p. 185–191.

KUMAR, S.; NEGI, Y. S.; UPADHYAYA, J. S. Studies on characterization of corn cob based nanoparticles. **Advanced Materials Letters**, v. 1, n. 3, p. 246–253, 2010.

LAKS, P.; HON, D.; SHIRAISHI, N. Chemistry of bark. In: HON, D. N.-S.; SHIRAISHI, N. (Eds.). . **Wood and cellulosic**. [s.l.] Marcel Dekker, 1991. p. 243–273.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. Effects of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered ethanologenic Escherichia coli. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39–40, n. 1, p. 301–322, 1993.

LEE, S.-H.; TERAMOTO, Y.; ENDO, T. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process I – Effect of additives with cellulose affinity. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 275–279, 2009.

LIU, Z.-H. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 167, 2014.

LUQUE, L. et al. Comparison of ethanol production from corn cobs and switchgrass following a pyrolysis-based biorefinery approach. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

MARVIN, W. A. et al. Economic Optimization of a Lignocellulosic Biomass-to-Ethanol Supply Chain in the Midwest. **Chemical Engineering Science**, v. 67, n. 1, p. 68–79, 2011.

MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, n. April, p. 150–158, 2014.

MORI, N. **Etanol celulósico a partir da palha e do bagaço de cana-de-açúcar: pré-tratamentos e conversão biotecnológica não convencionais**. [s.l: s.n.].

OLIVA, J. et al. A Sequential Steam Explosion and Reactive Extrusion Pretreatment for Lignocellulosic Biomass Conversion within a Fermentation-Based Biorefinery Perspective. **Fermentation**, v. 3, n. 2, p. 15, 20 abr. 2017.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312–331, 1996.

PALMQVIST, B. **Processing Lignocellulosic Biomass into Ethanol -Implications of High Solid Loadings**. [s.l.] Department of Chemical Engineering, Lund University, 2014.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PALONEN, H. et al. Adsorption of Trichoderma reesei CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 65–72, 8 jan. 2004.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PESSOA JR., A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 3, set. 1997.

POLETTO, M.; JÚNIOR, H. L. O.; ZATTERA, A. J. Native Cellulose: Structure, Characterization and Thermal Properties. **Materials**, v. 7, n. 9, p. 6105–6119, 2014.

PROCENTESE, A. et al. Deep eutectic solvent pretreatment and subsequent saccharification of corncob. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 31–36, 2015.

RAHIKAINEN, J. et al. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 12, p. 2823–2834, 1 dez. 2011.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. **Centro de Pesquisa em Química Aplicada**, p. 11, 2000.

RODRIGUES, R. DE C. L. B. **Influência da Disponibilidade de O2 no Processo Descontínuo de Obtenção de Xilitol em Hidrolisado de Bagaço de Cana**. [s.l: s.n.].

SAMUEL, R. et al. Structural Characterization and Comparison of Switchgrass Ball-milled Lignin Before and After Dilute Acid Pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 62–74, 2010.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SENTURK-OZER, S.; GEVGILILI, H.; KALYON, D. M. Biomass pretreatment strategies via control of rheological behavior of biomass suspensions and reactive twin screw extrusion processing. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9068–9075, 2011.

SHELDON, R. A. The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. **Green Chem.**, v. 19, n. 1, p. 18–43, 2017.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess engineering: basic concepts. **Prentice Hall**, v. 2, p. 155–184, 2002.

SILVA, S. S. et al. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, v. 8, n. 2, p. 25–33, 1998.

SINGH, A.; BAJAR, S.; BISHNOI, N. R. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by Saccharomyces cerevisiae, Scheffersomyces stipitis and their co-culture. **Fuel**, v. 116, n. September, p. 699–702, 2014.

SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, n. October, p. 624–631, 2015.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry, fundamentals and applications**. p. 283, 1993.

SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory analytical procedure**. p. 1-16, 2008.

SU, Y. K.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by Spathaspora passalidarum NRRL Y-27907 and Scheffersomyces stipitis NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 457–469, 2015.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant potential of corncob extracts for stabilization of corn oil subjected to microwave heating. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 997–1005, 2007.

TESTOVA, L. et al. Cellulose degradation in alkaline media upon acidic pretreatment and stabilisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 100, n. August, p. 179–184, 2014.

THÁLYTA, A.; PACHECO, F. A Importância da Produção de Etanol. 2011.

UPPUGUNDLA, N. et al. A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX^{TM} pretreated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2014.

VOM STEIN, T. et al. From biomass to feedstock: one-step fractionation of lignocellulose components by the selective organic acid-catalyzed depolymerization of hemicellulose in a biphasic system. **Green Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1772, 2011.

WEI, N. et al. Simultaneous Utilization of Cellobiose, Xylose, and Acetic Acid from Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production by an Engineered Yeast Platform. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 6, p. 707–713, 19 jun. 2015.

WIJAYA, Y. P. et al. Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 221–231, 2014.

ZHANG, B. et al. The effects of screw configuration on the screw fill degree and special mechanical energy in twin-screw extruder for high-moisture texturised defatted soybean meal. **Journal of Food Engineering**, v. 157, p. 77–83, 2015.

ZHANG, S. et al. Alkali combined extrusion pretreatment of corn stover to enhance enzyme saccharification. **Industrial Crops & Products**, v. 37, p. 352–357, 2012.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. **Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysisApplied Microbiology and Biotechnology**, 2009.

ZHENG, J.; CHOO, K.; REHMANN, L. Xylose removal from lignocellulosic biomass via a twin-screw extruder: The effects of screw configurations and operating conditions. **Biomass and Bioenergy**, v. 88, p. 10–16, maio 2016.

ZHENG, J.; REHMANN, L.; CLARK, J. H. Extrusion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Int. J. Mol. Sci**, v. 15, p. 18967–18984, 2014.

ZHENG, Y. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, n. 1, p. 35–53, 2014.