



PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALHA E SABUGO DE MILHO COM O FUNGO *GANODERMA LUCIDUM*

CAMILA CAMARGO GOMES; CYNTHIA BEATRIZ FURSTENBERGER; MARIA CRISTINA SOUZA; EVERSON DO PRADO BANCZEK

RESUMO

A preocupação ambiental e a busca por alternativas energéticas renováveis e sustentáveis para substituir os combustíveis fósseis tem motivado a utilização de novas matérias-primas para a produção de biocombustíveis. Materiais lignocelulósicos, que são materiais que possuem celulose, hemicelulose e lignina em sua composição, representam excelentes matérias primas para a produção de biocombustíveis e compostos de valor agregado, porém é um material complexo que o torna resistente a digestão microbiana e hidrólise enzimática, por isso é necessário fazer um pré tratamento para aumentar sua biodigestibilidade. Sabendo disto, este trabalho tem como objetivo, produzir etanol de segunda geração da palha e sabugo por meio de hidrólise enzimática com o fungo *Ganoderma lucidum*, e fermentação alcoólica com *Escherichia coli*. A hidrólise das amostras foi realizada em 2 procedimentos distintos: 1) pré tratamento em autoclave a 121 °C por 30 minutos posterior hidrólise enzimática, 2) pré-tratamento em autoclave, tratamento ácido. Resultados demonstraram que as biomassas apresentam um teor de água de 10,8 % para palha e 14,45% para sabugo. Os resultados das hidrólises realizadas demonstraram que o tratamento com ácido clorídrico a 10%(v/v) foi o mais eficiente para liberação de açúcares fermentáveis com um °Brix de 14 para palha e 21 para sabugo seguido do ácido nítrico a 8% (v/v) fornecendo um °Brix de 11,5, para palha e 12 para sabugo e o o ácido sulfúrico 6% (v/v) apresentou valores semelhantes ao ácido nítrico com 11 para palha e 12 para sabugo, sendo que sem o processo de tratamento ácido o valor de °Brix foi de 0.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica, *Escherichia coli*, Biomassa lignocelulósica, Hidrólise ácida, pré tratamento.

1 INTRODUÇÃO

A bioenergia é uma alternativa energética atraente para todas as fases de desenvolvimento por ser flexível nas diferentes formas de energias e produtos químicos que ela pode produzir, além de ter a possibilidade de fornecer energia que pode ser distribuída para equilibrar as demandas dinâmicas, com alto potencial de integração com infra-estruturas existentes podendo fornecer energia com menos emissões de gases de efeito estufa em comparação com a energia de combustível fóssil (WELFLE; THORNLEY; RÖDER, 2020).

O setor sucroenergético possui uma grande importância no cenário econômico brasileiro, pois é responsável pela produção de açúcar, álcool e energia elétrica (LOZANO et al., 2020). O Brasil na década de 1970 implementou o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), como uma iniciativa de produção e comercialização de combustíveis

alternativos. O etanol é o biocombustível mais consumido no Brasil e considerado uma alternativa à gasolina em motores do ciclo Otto (SCHIRMER; RIBEIRO, 2017).

Nesse contexto, com a preocupação ambiental, aquecimento global, aumento da demanda energética, e com a previsível escassez dos combustíveis fósseis no futuro, têm feito países a realizar pesquisa e desenvolvimento para a produção de biocombustíveis, em especial o álcool (TÁVORA, 2011).

Por isso este trabalho tem o objetivo de desenvolver um processo de obtenção de etanol de segunda geração de palha e sabugo de milho utilizando diferentes pré-tratamentos e hidrólise enzimática usando o fungo *Ganoderma lucidum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Teor de água

As amostras foram caracterizadas quanto ao teor de água utilizando balança analítica e cadinhos de cerâmica. Foi realizada a pesagem de 3,5 g do triturado de sabugo e palha para a obtenção da massa úmida, este valor foi anotado e na sequência a biomassa ficou por 4 horas em estufa a 100°C, até atingir massa constante. O peso do vegetal seco foi novamente quantificado em balança analítica, obtendo assim o valor da massa seca.

2.2. Esterilização da biomassa e pré tratamento termico

Este processo foi realizado por meio da autoclavagem da palha e sabugo por 30 minutos à 120 °C.

2.3. Hidrólise Enzimática

Para a hidrólise enzimáticas a biomassa foi submetida a inoculação de ¼ de meio de cultura do fungo *Ganoderma lucidum* desenvolvido em meio de cultura sólido, as amostras foram vedadas e mantidas em estufa microbiológica no escuro 35°C até o desenvolvimento do micélio e colonização do substrato, nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias

2.4. Hidrólise ácida

Em um Béquer de 600 ml foram pesados 35 g da amostra da biomassa e acionada a solução ácida, então após o tempo de aquecimento as amostras foram filtradas medido o ° Brix e o filtrado líquido foi neutralizado com Bicarbonato de sódio e colocado para a fermentação com *E. coli* por 48 horas.

2.5. Fermentação alcoólica

Para a fermentação alcoólica são utilizados 10mL de meio líquido contendo a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 para cada 100 mL de mosto. O processo de fermentação realizado um sistema anaeróbico onde um Kitassato de 250 mL, vedado com a saída lateral ligada a um tubo com a saída dentro de um béquer com água. Este kitassato vedado foi colocado em um banho termostático por 35° C durante 48h.

2.6. Avaliação de °Brix e etanol

Para obtenção dos valores de brix foi utilizado um refratometro °Brix e para a

quantificação de etanol foi utilizado um refratometro de etanol.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teor de umidade

A tabela 1 apresenta os valores de teor de água de palha e sabugo de milho moídos, utilizado neste estudo.

Tabela 1: Teor de água da biomassa de palha e sabugo de milho.

Biomassa	Teor de água (%)
Palha	10,8% ± 0,2
Sabugo	14,45% ± 0,4

A tabela 1 mostra que as palhas de milho tiveram 10,8 % no teor de água, e os sabugos 14,45%. Vieira et al. (2012), fizeram a caracterização da farinha de palha e sabugo de milho *in natura* e constatou os para umidade os valores menores que o da tabela acima sendo 6,95% para a farinha de palha e 8,19% para a farinha de sabugo. Salazar et al. (2005) fez a análise do teor de umidade da palha de milho e verificou uma umidade próxima a deste trabalho com 12,96 %. Silva e Ataíde (2019) constataram valores a baixo dos demonstrados da tabela para sabugo de milho onde eles constataram uma umidade de 7,09%. Aguiar et al. (2020) Registrou valores bem próximos para a palha de milho com 9,9%.

É importante que o teor de umidade de uma biomassa que será usada com combustível seja reduzido pois isso reduz o manejo e custo do transporte e agrega valor ao combustível, pois uma biomassa muito úmida possui menor poder de combustão. Sendo a umidade máxima de uma biomassa em geral pode apresentar por volta de 65 – 70 % de base úmida (VALE; DANTAS; ZAMBRZYCKI, 2013).

Altos teores de umidade influenciam positivamente na recuperação dos principais componentes da biomassa, mas interfere negativamente ao porcentual de hidrólise (PITARELO et al., 2012). A umidade excessiva causa uma diminuição na atividade enzimática e influencia no processo de fermentação, no entanto uma baixa umidade prejudica o crescimento do microrganismo, e no produto final de interesse (TEIXEIRA et al., 2019).

3.2. Avaliação de °Brix após tratamento térmico mais hidrolise enzimática

Foi avaliado a capacidade de liberação de açúcares redutores do fungo no período de 7, 14, 21 e 28 dias, na palha de milho após o tratamento térmico, os resultados encontrados são apresentados na tabela 2

Tabela 2. Determinação de °Brix da palha de milho nos períodos de 7, 14,21 e 28 dias com hidrólise enzimática fúngica

Biomassa	Agente hidrolisante	Tempo (Dias)	°Brix	ETOH %
Palha	<i>G. lucidum</i>	7	0	1
Palha	<i>G. lucidum</i>	14	0	1
Palha	<i>G. lucidum</i>	21	0	1
Palha	<i>G. lucidum</i>	28	0	1

A tabela 2 demonstra que mesmo com a variação de tempo a porcentagem de liberação de açúcares redutores permaneceu zero em todas as condições. A hidrólise enzimática

apresentou uma conversão nula, o que demonstra que o fungo *Ganoderma lucidum* não teve atividade enzimática para a quebra dos polissacarídeos da palha do milho.

Santos-Rocha et al. (2017) também apresentou uma conversão baixa de açúcares fazendo a conversão enzimática de palha e sabugo de milho tendo uma produção de etanol de palha a 3,3 % e 5,5 para o sabugo, e uma produção de açúcares redutores a 7,4 para palha e 12,4 para sabugo mesmo, sobre condições de hidrólise enzimática com extrato enzimático Accellerase®1500, e fermentações com *Saccharomyces cerevisiae*. A principal espécie utilizada para realizar a fermentação alcoólica (MENEZES; DE CASTRO; ROCHA, 2022).

3.3. Avaliação de °Brix e teor de etanol no ensaio da hidrólise ácida com palha de milho

A tabela 3 mostra os valores de açúcares redutores (ART) após o ensaio da hidrólise ácida da palha de milho.

Tabela 3: Avaliação de °Brix do filtrado após hidrólise ácida da palha de milho com ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido nítrico (HNO₃), ácido clorídrico (HCl) e ácido fosfórico (H₃PO₄)

Biomassa	Agente hidrolisante	Tempo (Minutos)	Temperatura (°C)	°Brix final	EtoH%
Palha	H ₂ SO ₄ - 6%	90	90	11	25,6 ± 0,4
Palha	HNO ₃ - 8%	90	90	11,5	29 ± 1
Palha	HCl - 10 %	90	90	14	38,3 ± 0,7
Palha	H ₃ PO ₄ – 6%	90	90	8	26

Os maiores valores de ART e etanol foram determinados com o ácido clorídrico 10% com um °Brix final de 14 e etanol 38,3%, seguido do ácido nítrico com °Brix de 11,5 e etanol 29% e ácido sulfúrico o qual teve resultados semelhantes com um °Brix de 11 e etanol 25,6% e por último o ácido fosfórico com um °Brix final de 8 porém o valor de etanol foi próximo aos outros ácidos com 26%.

Santos et al. (2015) fizeram o tratamento da palha de milho com ácido sulfúrico e obteve a maior extração de ART com ácido sulfúrico a 2 % num período de tempo de 7 minutos a 110 °C conseguindo a extração de 59,4 % de ART valores bem superiores deste trabalho. O autor observou também que concentrações do ácido inferiores a 0,5% não apresentaram resultados efetivos e concentrações acima de 3,5% tem um gasto muito grande de material e grande geração de resíduos ácidos.

Bevilaqua (2010) realizou a hidrólise ácida de casca de arroz HCl e H₂SO₄ e observou que o HCl é um melhor catalisador apesar do H₂SO₄ ser um ácido mais forte as condições de tempo e temperatura fez com que o H₂SO₄ degradasse parte da matéria orgânica.

3.4. Avaliação de °Brix no ensaio da hidrólise ácida com sabugo de milho

A tabela 4 mostra os valores de açúcares redutores (ART) após o ensaio da hidrólise ácida do sabugo de milho.

Tabela 4: Avaliação de °Brix após hidrólise ácida do sabugo de milho com ácido sulfúrico

(H₂SO₄), ácido nítrico (HNO₃), ácido clorídrico (HCl) e ácido fosfórico (H₃PO₄)

Biomassa	Agente hidrolisante	Tempo (Minutos)	Temperatura (°C)	°Brix final
Sabugo	H ₂ SO ₄ - 6%	90	90	12
Sabugo	HNO ₃ - 8%	90	90	12
Sabugo	HCl – 10 %	90	90	21
Sabugo	H ₃ PO ₄ – 6%	90	90	8

A tabela 4 mostra os valores de açúcares redutores (ART) após o ensaio da hidrólise ácida, obtendo os maiores valores de ART com o ácido clorídrico 10% com um brix final de 21, seguido dos ácidos sulfúrico e nítrico que tiveram um valor de 12 e o de menor resultado o com o ácido fosfórico com um brix final de 8.

Santos et al. (2015) fez o tratamento do sabugo de milho com ácido sulfúrico e obteve a maior extração de ART com ácido sulfúrico a 0,5% num período de tempo de 15 minutos a 120 °C conseguindo a extração de 42,6 % de ART valores bem superiores deste trabalho, o autor também constatou que ocorria uma diminuição nos valores de ART quando a concentração de ácido era maior. Obtendo os melhores resultados em menores concentração de ácido e elevadas temperaturas.

Silva (2018) realizou o tratamento com ácido sulfúrico em diferentes concentrações (2,5, 5,0, 7,5 e 10,0%) em tempo de 15 e 30 min a 120 °C de sabugo de milho e obteve a maior de valores com a concentração 2,5% de ácido por 30 min alcançando 30,79 g/L de ART.

Gehlen (2013) realizou a hidrólise ácido em bagaço de cana-de-açúcar com ácido clorídrico em diferentes concentrações e apresentou o maior resultado de conversão de açúcares redutores com 94,14% com a concentração de ácido clorídrico 0,05% em uma temperatura de 120 °C por 60 minutos.

Lorencini (2013) obteve os resultados no pré tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com os ácidos clorídrico e fosfórico, obtendo os melhores resultados na extração de ART 13,88 g/L com ácido clorídrico 6% na temperatura de 90 °C em 360 minutos e para ácido fosfórico o maior ART foi de 4,98 g/L a 90 °C e 360 minutos.

Dias et al (2019) realizaram a hidrólise ácida de sorgo granífero com HCl ,H₂SO₄ e H₃PO₄. Sendo o ácido que apresentou uma maior concentração de glicose e sacarose foi o HCl devido poder oxidante/corrosivo ser menor que H₂SO₄.

4 CONCLUSÃO

A produção de etanol de palha e sabugo de milho é uma fonte alternativa de biomassa lignocelulosa.. O pré-tramento ácido com HCl 10 % (v/v) demonstra ser o com maior rendimento isso devido a seu menor poder corrosivo. Apesar dos baixos resultados obtidos o processo de hidrólise pode ser otimizado e elevar os valores de etanol produzido e com isso apresentar uma alternativa para aumentar a demanda de etanol combustível no mercado e com vantagens econômicas.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, N. V. V. et al. Extraction and Characterization of Lignin from Corn Straw (*Zea mays L.*). **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, p. 1441–1452, 2020.

LOZANO, E. DO V. et al. Híbridos de Milho Afetam a Quantidade de Etanol Produzida no Cerrado do Centro- Oeste Paulista. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and**

Environmental Science, v. 9, n. 1, p. 424–438, 5 mar. 2020.

MENEZES, L. H. Q.; DE CASTRO, R. B. R.; ROCHA, E. M. F. Identificação de leveduras selvagens de um fermento de levedo industrial durante a produção de bioetanol – um biocombustível renovável / Identification of wild yeasts from an industrial yeast during the production of bioethanol - a renewable biofuel. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 12, p. 122102–122109, 19 jan. 2022.

PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502–1509, 2012.

SALAZAR, R. F. S. et al. **Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos**. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 2005.

SANTOS, M. S. R. Avaliação do pré-tratamento ácido do sabugo de Milho visando a produção de etanol 2G. **Anais do XX CONGRESSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**. 2015

SANTOS-ROCHA, M. S. R. DOS et al. Pré-tratamento hidrotérmico de resíduos do milho visando à produção de etanol de segunda geração. **Scientia Plena**, v. 13, n. 3, 9 jun. 2017.

SCHIRMER, W. N.; RIBEIRO, C. B. Panorama dos combustíveis e biocombustíveis no Brasil e as emissões gasosas decorrentes do uso da gasolina/etanol. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 2, n. 2, p. 16, 10 ago. 2017.

SILVA, A. C. R.; ATAÍDE, C. H. **Caracterização do sabugo de milho e composição do bioóleo produzido no processo de pirólise rápida em reator de leito fluidizado borbulhante**. In: XXXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS ENEMP 2019

TÁVORAS, F. L. **História e Economia dos Biocombustíveis no Brasil**. Textos para discussão. Senado Federal. 2011.

TEIXEIRA, M. D. et al. Automação de reator de fermentação em estado sólido para síntese de enzimas. **Revista UniVap**, 17 dez. 2019.

VALE, A. T.; DANTAS, V. F. S.; ZAMBRZYCKI, G. C. Potencial energético dos resíduos da cultura do milho (*Zea mays*). **Evidência**, Joaçaba v. 13 n. 2, p. 153-164, jul./dez. 2013.

VIEIRA, R. C. et al. **Caracterização físico-química da palha e sabugo de milho**. 5º Encontro Nacional de Tecnologia Química 2012.