

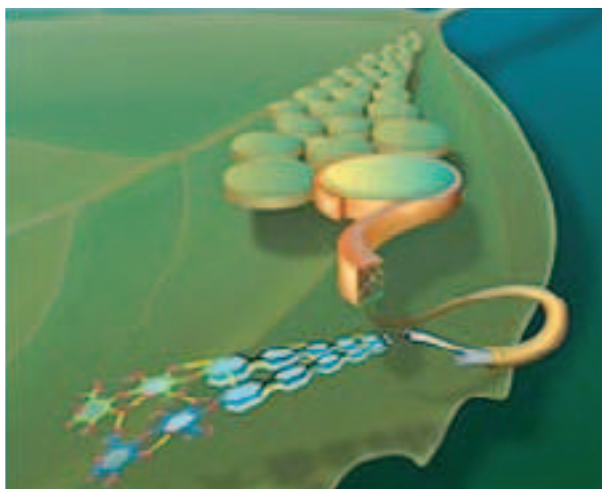
# Avaliação do potencial de produção de etanol de 2.<sup>a</sup> geração a partir dos resíduos das podas do olival

## Evaluation of the potential production of 2.<sup>nd</sup> generation ethanol from waste pruning of the olive grove

*Pedro N.<sup>1</sup>, Duarte A.<sup>2</sup>*

Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária. Castelo Branco, Portugal

[npedro@ipcb.pt](mailto:npedro@ipcb.pt)



### Abstract

Waste from pruning of olive grove is a largely agricultural residue available in Portugal. It is estimated that the quantity of material produced annually in the olive pruning may amount to 290 000 tons per year. This material without any commercial use, up to present, can be used as a raw material for the production of second generation ethanol. This process requires the completion of three sequential steps: pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation.

<sup>1</sup>ESA -IPCB – Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco

<sup>2</sup>CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior

The aim of this study is to evaluate the potential production of second generation ethanol based on the release of sugars resulting from different pretreatments and subsequent enzymatic hydrolysis. In this work, 4 pretreatments were tested: 1) with dilute sulfuric acid [temperature: 60 to 180 °C, time: 30 to 120 minutes and  $H_2SO_4$  concentration: 0,50 to 5,00% (w/w)], 2) with sodium hydroxide [temperature: 40 to 140 °C, time: 20 to 120 minutes and NaOH concentration: 0.31 to 61.9 % (w/w)], 3) with sodium hydroxide and hydrogen peroxide [time:45 minutes, temperature: 40 to 140 °C, NaOH concentration: 0.31 to 6.19% (w / w) and  $H_2O_2$  concentration: 0.31 to 6.19% (w/w)] and 4) with ammonia [temperature: 50 to 100 °C, time: 1 to 8 hours and  $NH_3$  concentration: 1.00 to 15.00% (w/w)].

Enzymatic hydrolysis experiments on pretreated solid fraction were performed at 5% (w/v) solid concentration in 50 mM citrate buffer with pH 4.8 and a BSA concentration of 60 mg/g dry biomass. The reaction mixture was incubated at 50°C for 174h in an orbital shaker with agitation at 150 rpm. Three commercial enzyme preparations from Novozymes (Denmark), NS22086 (cellulase complex – 148FPU/ml), NS22118 (b-glucosidase - 426 p-NPGU/ml) and NS22083 (Xylanase – 7498 IU/ml), were used in enzymatic hydrolysis. Two enzyme concentrations were tested: 6FPU enzyme/g of substrate, 18 p-NPGU/g of substrate, 18 IU/g substrate and 18FPU/g of substrate, 36 p-NPGU/g of substrate, 36 IU/g of substrate.

Total carbohydrate content of the initial biomass was 51.25%, in which glucose was the major constituent with 33.59%. Contents of lignin and extractable found in biomass were 24.96% and 15.84%, respectively.

The pre-treatment carried out with sulfuric acid with a  $H_2SO_4$  concentration of 4.09% (w/w) for 102 minutes at a temperature of 156 °C, performed with 18FPU/g of substrate, 36 p-NPGU/g substrate and 36 IU/g of substrate, has presented a enzymatic hydrolysis yield of 84%. In these conditions, 90% of sugars were available for fermentation, corresponding this value to the sum of the sugars released into the hydrolyzate during the pre-treatment with the sugars released during enzymatic hydrolysis.

**Keywords:** Pruning of olive groves, 2nd generation ethanol, pretreatment, enzymatic hydrolysis

## Resumo

As fontes de energia renováveis caracterizam-se, em termos gerais, pela sua disponibilidade descentralizada, por apresentarem uma capacidade de se auto-regenerarem em curtos períodos de tempo e pelos reduzidos im-

pactes ambientais decorrentes da sua utilização. A procura pelos recursos energéticos endógenos poderá dar um importante contributo para a redução do consumo de energia fóssil, com reflexos directos sobre os preocupantes impactes ambientais a si associados, permitindo assim, a melhoria da qualidade do ar, da saúde das populações, bem como, a redução/controlo da importante e crescente poluição industrial e urbana, com respectivas implicações para o aquecimento global. A promoção das energias renováveis permite, para além da redução da dependência energética também a diversificação geográfica da energia primária, ou seja, a possibilidade desta ser produzida numa geografia mais alargada (redução da dependência estratégica). Neste último ponto é usual ouvir falar de produção de energia descentralizada, quer isto dizer que a sua produção é realizada de acordo com a distribuição do recurso, gerando por isso, um desenvolvimento alargado a todo o território, e não apenas às regiões mais industrializadas. Este facto pode assim, tornar esta energia determinante na promoção da economia e na criação de emprego em regiões rurais.

Em 2011 o sector dos transportes representava em Portugal 35,8 % do consumo final de energia (DGEG, 2013). Esta importante percentagem é partilhada pela maioria das sociedades desenvolvidas criando uma dependência energética com consequências ambientais difíceis de contornar. Actualmente, os EUA e o Brasil são os maiores produtores de bioetanol utilizando respectivamente para a sua produção Milho e Cana-de-açúcar (OECD-FAO, 2011). Sem surpresas, a crescente procura energética e em particular de biocombustíveis exigirá no futuro um acréscimo exponencial nas quantidades de matéria primas requeridas, provocando um grande desequilíbrio no mercado alimentar, seja por substituição do destino do produto (cereais), seja pela conversão de terras de criação de gado em plantações de Cana-de-Açúcar. Eticamente não é aceitável a utilização de alimentos para a produção de combustíveis para os transportes, em detrimento da alimentação humana e animal. Com vista a corrigir esta situação, a União Europeia a partir de 2006 faz a distinção entre bioetanol de primeira geração, como aquele onde a matéria-prima provém do sector alimentar, e o bioetanol de segunda geração, aquele que se obtém utilizando matérias-primas que não provêm desse sector (UE, 2006). Todavia, os processos de obtenção de bioetanol de segunda geração são mais complexos envolvendo tecnologias e processos em desenvolvimento, sendo no presente, mais onerosa a sua produção. No entanto, os avanços que se esperam obter em termos laboratoriais sugerem que num futuro próximo a produção de biocombustíveis de segunda geração possa ser competitiva.

A produção de etanol por métodos bioquímicos baseia-se na aplicação de um conjunto de processos de extracção, separação e de conversão biológica dos componentes elementares da biomassa como meio de produzir biocombustíveis, bioprodutos e bioenergia. Os processos utilizados na plataforma bioquímica têm o objectivo de extrair os açúcares simples existentes nos componentes principais dos materiais lenhocelulósicos (celulose, hemiceluloses e lenhina) através da quebra das estruturas polimerizadas da celulose e da hemicelulose seguida do posterior processo fermentativo, no qual através da acção de alguns microorganismos o açúcar é convertido em etanol (Figura 1).



**Figura 1** – Etapas na produção de etanol de 2ª geração  
(Fonte: Oak Ridge National Laboratory, 2013)

Como os açúcares nos materiais lenhocelulósicos não se encontram acessíveis ao tratamento enzimático, é necessária a realização prévia de um pré-tratamento, podendo este ser efectuado por métodos químicos, térmicos ou biológicos (Pu et al., 2008). A escolha do método de pré-tratamento, bem como a severidade dos factores utilizados, deve ser realizada tendo em conta que os materiais lenhocelulósicos apresentam diferenças significativas na sua constituição e estrutura. Estas diferenças fazem-se sentir nas diferentes

partes da planta (tronco, ramos e folhas) variando também, dentro destas, em função da idade, do estágio de desenvolvimento e de outras condições (Kumar et al., 2009). Se o pré-tratamento não for suficientemente severo o resíduo sólido resultante não será facilmente hidrolisado enzimaticamente, se porventura for demasiado severo conduzirá a formação de produtos de degradação que inibirão os microorganismos fermentativos (Balat, 2011; Mosier et al., 2005). Após o pré-tratamento, na etapa de hidrólise enzimática a quebra das estruturas polimerizadas da celulose e hemicelulose passa a ser realizada por intermédio de carbohidrolases, convertendo-se aquelas moléculas em açúcares simples passíveis de serem digeridos pelos organismos fermentativos (Gupta, 2008; Jørgensen et al., 2007).

Na etapa de fermentação são por norma utilizadas leveduras, geneticamente modificadas, de forma a aumentar a quantidade de hidratos de carbono que são convertidos em etanol (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

A produção de etanol a partir da utilização dos resíduos das podas do olival permitirá valorizar um resíduo agrícola, comum nos países da orla da bacia do mediterrâneo, sem qualquer utilização comercial, numa matéria-prima passível de ser utilizada na produção de etanol de 2ª geração. A viabilidade prática dos projectos de produção de etanol a partir de material lenhocelulósico pode ainda ser melhorada se, para além do etanol, existir o aproveitamento dos compostos intermédios que são gerados na sua produção aplicando um conceito de biorrefinaria.

O objectivo principal deste trabalho consistiu em analisar o potencial de produção de etanol de 2ª geração a partir dos resíduos das podas do olival (O1). Esse potencial foi avaliado com base na libertação de açúcares disponíveis para fermentação resultantes de diferentes pré-tratamentos e da hidrólise enzimática subsequente. Mais especificamente pretendeu-se: otimizar as condições processuais dos pré-tratamentos (O2), analisar a influência dos pré-tratamentos na digestão enzimática (O3), estudar a influência da carga enzimática no rendimento da hidrólise enzimática (O4) e analisar as interacções entre celulasas, beta-glucosidades e xilanases (O5).

Neste trabalho foram testados quatro pré-tratamentos: 1) com ácido sulfúrico diluído [temperatura: 60 a 180 °C, tempo: 30 a 120 minutos e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0,50 a 5,00% (w/w)], 2) com hidróxido de sódio [temperatura: 40 a 140 °C, tempo: 20 a 120 minutos e concentração de NaOH: 0,31 a 61,9 % (w/w)], 3) com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio [tempo de 45 minutos, temperatura: 40 a 140 °C, concentração de

NaOH: 0,31 a 6,19% (w / w) e concentração de  $H_2O_2$ : 0,31 a 6,19% (w/w) e 4) com amoníaco [temperatura: 50 a 100 ° C, tempo: 60 a 480 minutos e concentração de  $NH_3$ : 1,00 a 15,00% (w/w)].

Os ensaios de hidrólise enzimática nos resíduos sólidos dos pré-tratados foram realizados com uma concentração de sólidos de 5% (w/v), em tampão citrato 50mM com pH de 4,8 e com uma concentração de BSA de 60mg/g de biomassa seca. A mistura de reacção foi incubada a 50°C, durante 174h, num agitador orbital com agitação de 150rpm. Para a hidrólise enzimática foram utilizados três complexos enzimáticos gentilmente cedidos pela Novozymes (Dinamarca), NS22086 (complexo de celulasas – 148FPU/ml), NS22118 (b-glucosidase - 426 p-NPGU/ml) e NS22083 (Xilanase – 7498 IU/ml) tendo sido testadas duas cargas enzimáticas 6FPU/g de substrato, 18 p-NPGU/g de substrato, 18 IU/g de substrato e 18FPU/g de substrato, 36 p-NPGU/g de substrato, 36 IU/g de substrato.

(O1 – análise do potencial de produção de etanol de 2ª geração):

O trabalho realizado mostrou que os resíduos das podas do olival, com um teor de açúcares na sua constituição de 51,15% do seu peso seco, podem adquirir um papel relevante na produção de etanol de 2ª geração, transformando um desperdício da manutenção do olival numa matéria-prima susceptível de gerar riqueza e emprego. A viabilidade prática dos projectos de produção de etanol a partir dos resíduos das podas do olival pode ainda ser melhorada se, para além do etanol, existir o aproveitamento dos compostos intermédios que são gerados na sua produção aplicando um conceito de biorrefinaria.

(O2 - optimização das condições processuais dos pré-tratamentos):

Neste trabalho conseguiu-se modelar com precisão os compostos solubilizados no pré-tratamento ácido, glucose ( $R^2 = 0,9591$ ), xilose ( $R^2 = 0,9066$ ), arabinose ( $R^2 = 0,9909$ ) e a formação de produtos de degradação ( $R^2 = 0,9813$ ), bem como a constituição do resíduo sólido resultante, peso do resíduo sólido ( $R^2 = 0,9742$ ), lenhina ( $R^2 = 0,9453$ ), glucose ( $R^2 = 0,8674$ ), xilose ( $R^2 = 0,9266$ ), arabinose ( $R^2 = 0,9962$ ). Nos pré-tratamentos alcalinos conseguiu-se modelar com precisão as quantidades de lenhina dissolvida ( $LD_{NaOH}$   $R^2 = 0,9421$ ;  $LD_{NaOH + H_2O_2}$   $R^2 = 0,9809$  e  $LD_{NH_3}$   $R^2 = 0,8003$ )

(O3 - análise da influência dos pré-tratamentos na digestão enzimática):

De todos os pré-tratamentos efectuados, o pré-tratamento com ácido sulfúrico foi aquele que apresentou melhores resultados. Neste pré-tratamento

obteve-se um rendimento de 84% na hidrólise enzimática, realizada com 18FPU/g de substrato, 36 p-NPGU/g de substrato e 36 IU/g de substrato, dos pré-tratados provenientes de pré-tratamentos efectuados com uma concentração de 4,09% (w/w), durante 102 minutos e com uma temperatura de 156°C. Nestas condições atingiu-se a maior taxa de açúcares disponíveis para fermentação, correspondendo a soma dos açúcares libertados para o hidrolisado durante o pré-tratamento, com os açúcares libertados durante a hidrólise enzimática, a 90% dos açúcares existentes na biomassa.

Ao contrário do indicado por diversos autores, não verificámos na hidrólise enzimática uma estabilização na quantificação dos açúcares libertados após as 72h. Neste trabalho observou-se em todos os pré-tratados, em especial nos realizados a 180°C e a 156°C, com uma concentração de ácido de 4,09%, um aumento da taxa de açúcares libertados até ao término do período de hidrólise (174h). Este facto mostra, em particular para concentrações de enzima mais baixas, que os complexos enzimáticos utilizados continuam a actuar sobre o substrato, especialmente se este se encontrar mais acessível pelo pré-tratamento.

Nos pré-tratamentos alcalinos atingiu-se um valor máximo de 64,7% na taxa de libertação de açúcares, após 174h de hidrólise enzimática, nos pré-tratados resultantes de pré-tratamentos realizados com temperatura de 120°C, durante 40 minutos e com uma concentração de NaOH de 15,0%. Nestes pré-tratamentos, não se verificou uma relação directa entre as taxas de remoção de lenhina e o rendimento da hidrólise, o que nos leva a equacionar que no pré-tratamento alcalino, o sucesso da hidrólise enzimática possa não se encontrar somente dependente das taxas de remoção de lenhina obtidas.

Não se provaram neste trabalho acréscimos significativos nas taxas de libertação de açúcares, durante a hidrólise enzimática, dos pré-tratados que sofreram adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relativamente aos pré-tratados resultantes de pré-tratamentos realizados apenas com NaOH.

Nos pré-tratamentos com NH<sub>3</sub> foi conseguida uma taxa de libertação de açúcares de 40,5%, após 174h de hidrólise enzimática, em pré-tratados com apenas 2,83% de concentração de NH<sub>3</sub>. Este facto leva-nos a equacionar, em trabalhos futuros, a possibilidade de realizarmos pré-tratamentos alcalinos com menores valores de temperatura e concentração de base, mas com tempos de duração mais elevados.

(O4 - estudo da influência da carga enzimática no rendimento da hidrólise enzimática):

O aumento da carga enzimática, de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU para 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato, promoveu acréscimos



médios no rendimento da hidrólise enzimática de 75% nos pré-tratados com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 62% nos pré-tratados com elevada concentração de NaOH, 42% nos pré-tratados com baixa concentração NaOH, 39% nos pré-tratados com NaOH e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 38% nos pré-tratados com  $\text{NH}_3$

(O5 – análise das interações entre os complexos enzimáticos):

Nos resultados da determinação das interações entre os complexos enzimáticos, a concentração de celulasas foi considerada o principal factor limitante no desenvolvimento da hidrólise enzimática, tendo sido observada para baixas concentrações de celulasas uma estabilização na libertação de açúcares mesmo aumentando a quantidade de substrato disponível.

Na determinação das interações entre os complexos enzimáticos podemos observar que a aplicação de baixas concentrações de beta-glucosidade e xilanase não limitou o rendimento da hidrólise enzimática. Uma explicação para esta constatação, resulta das beta-glucosidades e xilanasas actuarem respectivamente sobre substratos solúveis ou amorfos, possuindo como tal, velocidades de hidrólise mais elevadas que as das celulasas que actuam sobre substratos com regiões cristalinas. Neste trabalho, ao contrário do que é sugerido pela bibliografia consultada, pensamos que a relação entre celulasas e estes complexos enzimáticos (beta-glucosidade e xilanase) pode ser de 3 para 1, em vez de 1:2. A redução nas quantidades de beta-glucosidade e xilanase utilizadas na realização do processo de hidrólise enzimática poderá assim representar uma poupança económica.

## Bibliografia

- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* 52, 858-875.
- DGEG 2013. Consumo de energia final por sector em 2011 (%). [consultado 18-06-2013]. Disponível em: <http://www.dgeg.pt/>.
- Gupta, R. 2008. Alkaline pretreatment of biomass for ethanol production and understanding the factors influencing the cellulose hydrolysis. Tese de Doutoramento. Auburn University.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. and Gorwa-Grauslund, M. 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 937-953.
- Jørgensen, H., Kristensen, J.B. and Felby, C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1- 2, 119-134.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. and Stroeve, P. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. In *Ind. Eng. Chem. Res.* pp. 3713-3729.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96, 673-686.



- Oak Ridge National Laboratory 2013. Cellulosic Biofuel Production Steps and Biological Research Challenges. [consultado 21-07-2013]. Disponível em: <http://bioenergycenter.org/besc/resources/images/gtlgallery.cfm>
- OECD-FAO 2011. Agricultural Outlook 2011-2020, OECD-FAO, ed., pp. 77-93.
- Pu, Y.Q., Zhang, D.C., Singh, P.M. and Ragauskas, A.J. 2008. The new forestry biofuels sector. In Biofuels Bioprod. Biorefining. pp. 58-73.
- UE 2006. Estratégia da União Europeia no domínio dos biocombustíveis (UE). Jornal Oficial da União Europeia.