



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA RURAL
CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

LEONARDO CÉSAR DA SILVA

**Produção de biogás através do bagaço de cana-de-açúcar utilizando pré-tratamento
enzimático**

RECIFE, 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA RURAL
CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

LEONARDO CÉSAR DA SILVA

**Produção de biogás através do bagaço de cana-de-açúcar utilizando pré-tratamento
enzimático**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Bacharelado em
Engenharia Ambiental da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como pré-
requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Professor Dr. André Felipe de
Melo Sales Santos

Coorientadora: Professora Dra. Tatiana
Souza Porto

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Suely Manzi – CRB-4 809

S586p Silva, Leonardo César da.
Produção de biogás através do bagaço de cana-de-açúcar utilizando pré-tratamento enzimático / Leonardo César da Silva. – Recife, 2024.
72 f.; il.

Orientador(a): André Felipe de Melo Sales Santos.

Co-orientador(a): Tatiana Souza Porto.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Engenharia Ambiental, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

1. Bagaço de cana - Indústria. 2. Resíduos como combustível. 3. Biocombustíveis. 4. Hidrólise 5. Redução de gases do efeito estufa. I. Santos, André Felipe de Melo Sales, orient. II. Porto, Tatiana Souza, coorient. III. Título

CDD 628

LEONARDO CÉSAR DA SILVA

Produção de biogás através do bagaço de cana-de-açúcar utilizando pré-tratamento enzimático

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Engenharia Ambiental da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como pré-
requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Ambiental.

COMISSÃO AVALIADORA

Prof. Dr. André Felipe de Melo Sales Santos (Orientador/Presidente da Comissão)
Departamento de Tecnologia Rural - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Jorge Vinicius Fernandes Lima Cavalcanti (Membro Titular 01)
Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Leocádia Terezinha Cordeiro Beltrame (Membro Titular 02)
Departamento de Tecnologia Rural – Universidade Federal Rural de Pernambuco



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA RURAL
CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

FOLHA DE APROVAÇÃO DE PROJETO FINAL DE CURSO

Trabalho defendido por Leonardo César da Silva às 08h30 do dia 09 de Agosto de 2024, em defesa oral presencial, nas dependências da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Engenharia Ambiental da Universidade Federal Rural de Pernambuco, intitulado “Produção de biogás através de bagaço de cana-de- açúcar utilizando pré-tratamento enzimático”, orientado por Prof. André Felipe de Melo Sales Santos (UFRPE/DTR) e Coorientado pela Profa. Tatiana Souza Porto (UFRPE/DMFA) e aprovado pela seguinte banca examinadora.

Prof. Jorge Vinicius Fernandes Lima Cavalcanti
UFPE/DEQ

Profa. Leocádia Terezinha Cordeiro Beltrame
UFRPE/DTR

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Silvana e Aureliano, por todo apoio, dedicação e amor incondicional ao longo da minha jornada. Sem vocês, esta conquista não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Silvana Regina e Aureliano Franscisco, pelo amor, apoio constante e pela incansável dedicação em me proporcionar um ensino de qualidade desde a minha infância. Sou eternamente grato por tudo que fizeram por mim ao longo dos anos. Às minhas irmãs, Maria Alice e Giovanna Letícia, por todo amor, carinho e fraternidade.

Agradeço ao meu orientador, Prof. André Felipe de Melo Sales Santos pelas orientações deste trabalho e pela primeira oportunidade no Programa de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI). Deixo também meus sinceros agradecimentos a minha coorientadora, Profa. Tatiana Souza Porto, pelo aprendizado enriquecedor ao longo dos últimos três anos no Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (LBB) do Núcleo de Biotecnologia (NUBIOTEC). Agradeço também a Liliana Andréa dos Santos por toda contribuição e ajuda nos testes de potencial bioquímico de metano (BMP) e a Guilherme Gomes de Sousa Magalhães pela ajuda durante os ensaios BMP.

A Universidade Federal de Pernambuco pelas análises cromatográficas e análises dos dados através da colaboração do Prof. Jorge Vinícius Fernandes Cavalcanti. Ademais, agradeço também aos técnicos do Laboratório de Nutrição Animal (LNA) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo suporte nas análises de fibras.

Agradeço também amigos do LBB, Joyce Gueiros Wanderley Siqueira, Camila Fernanda de Aquino Luna, Eduardo Bonora Viana e Maria Eduarda de Sousa Silva Donato, pelo apoio, conversas e risadas, sempre acompanhadas de muito café, que tornaram as manhãs e tardes mais leves e agradáveis.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e aos docentes do curso de Bacharelado em Engenharia Ambiental por todo aprendizado durante minha trajetória acadêmica.

As minhas amigas do curso de Engenharia Ambiental, Vitória e Estela, que estiveram comigo nessa caminhada árdua desde o primeiro semestre. Obrigado, amigas!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de PIBITI. Aos órgãos de fomento que financiaram as pesquisas no laboratório: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Por fim, agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a minha jornada de graduação.

RESUMO

O desenvolvimento contínuo e a crescente demanda dos produtos derivados das atividades sucroalcooleiras têm gerado desafios ambientais significativos, como a geração de resíduos agroindustriais e o consumo demasiado de combustíveis não renováveis, aumentando as emissões de gases do efeito estufa. O bagaço de cana-de-açúcar (BC) é um dos principais resíduos gerados neste setor agroindustrial, o qual pode ser aproveitado como fonte sustentável para produção de biocombustíveis como o biogás através da digestão anaeróbia. O BC é uma matéria-prima renovável composta pelos polímeros naturais de celulose, hemicelulose e lignina, que conferem ao mesmo, devido sua estrutura tridimensional complexa, uma baixa biodegradabilidade. Desse modo, devido à natureza recalcitrante do BC, é necessário a aplicação de pré-tratamento para modificar a estrutura lignocelulósica densa visando a facilitar a exposição dos polissacarídeos e açúcares fermentáveis. Os processos biológicos despontam como uma alternativa de baixo custo por meio de microrganismos e enzimas como celulasas e xilanases, que modificam a estrutura lignocelulósica através de reações bioquímicas. Sendo assim, este trabalho avaliou o pré-tratamento hidrolítico do bagaço de cana-de-açúcar utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus japonicus* URM5242 com o objetivo de melhorar a produção de biogás através do teste de potencial bioquímico de metano (BMP). Os bioprocessos aplicados para hidrólise enzimática (celulasas e xilanases) do BC foram os processos fermentativos em estado sólido (HFES), submerso (HFSm) e sequencial (HFSeq). O teste BMP ocorreu em biorreatores (batch) de 250 mL utilizando lodo anaeróbio granular como inóculo durante um período de 35 dias, sob agitação de 60 rpm em condições mesofílicas ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$). Os resultados experimentais da geração de metano (CH_4) do BC sem pré-tratamento e dos hidrolisados nas fermentações foram comparados aos modelos cinéticos de primeira ordem e Gompertz modificado para comprovar a compatibilidade dos dados experimentais da produção de metano. Os resultados experimentais mostraram que a hidrólise do BC por HFSm apresentou maior produção de CH_4 ($104,88 \text{ NmL.g}^{-1}\text{SV}$), seguido dos hidrolisados por HFES e HFSeq e o BC sem pré-tratamento, que apresentaram produções de $69,13 \text{ NmL.g}^{-1}\text{SV}$, $45,16 \text{ NmL.g}^{-1}$ e $15,51 \text{ NmL.g}^{-1}\text{SV}$, respectivamente. O biogás produzido pelos BCs pré-hidrolisados apresentou composição média de metano de 63,21%, 60,45% e 53,43% para os bioprocessos por HFSeq, HFSm e HFES, respectivamente, enquanto o BC sem pré-tratamento apresentou 14,81%. Portanto, este estudo constatou a eficiência dos diferentes processos biológicos utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus japonicus* URM5242 para o pré-tratamento enzimático do bagaço de cana-de-açúcar, visando melhorar a produção de biogás e sua concentração de metano.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; Pré-tratamento; *Aspergillus japonicus*; Hidrólise Enzimática; Potencial Bioquímico de Metano.

ABSTRACT

The continuous development and the growing demand for sugarcane derivatives have unleashed significative environmental challenges, with the generation of agro-industrial wastes and the exacerbating consumption of fossil fuels, increasing the greenhouse gas emissions. Sugarcane bagasse (SB) is one of the main residues generated in this industry, and it can be used as a sustainable source for biofuel production, such as biogas, through anaerobic digestion. SB is a renewable feedstock composed by cellulose, hemicellulose and lignin, which due to its complex three-dimensional structure, confers low biodegradability. Thus, due to the recalcitrant nature of SB, it is necessary to pretreat it to modify the lignocellulosic structure and expose the polysaccharides and fermentable sugars. The biological processes emerge as a low-cost alternative for pretreatment, using microorganisms and enzymes such as cellulases and xylanases, which modify the lignocellulosic structure through biochemical reactions. Therefore, this study evaluated the hydrolytic pretreatment of sugarcane bagasse using the filamentous fungi *Aspergillus japonicus* URM5242 aiming to improve biogas production through the biochemical methane potential (BMP) test. The bioprocesses applied for SB enzymatic hydrolysis (cellulases and xylanases) were solid-state fermentation (HSSF), submerged fermentation (HSmF), and sequential fermentation (HSeqF). The BMP tests were carried out in 250 mL bioreactors in a batch process using granular anaerobic sludge as inoculum for 35 days, under agitation of 60 rpm in mesophilic conditions ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$). The experimental results of methane (CH_4) generation from untreated and hydrolyzed SB were compared to first-order and modified Gompertz kinetic models to ensure the compatibility of the experimental data. The SB hydrolysis through HSmF led to a higher production of CH_4 (104,88 $\text{NmL.g}^{-1}\text{SV}$), followed by HSSF and HSeqF and untreated SB, which produced 69,13 $\text{NmL.g}^{-1}\text{SV}$, 45,16 NmL.g^{-1} e 15,51 $\text{NmL.g}^{-1}\text{SV}$ of methane, respectively. The biogas produced using the hydrolyzed SB had a medium composition of 63.21%, 60.45%, and 53.43% for the bioprocesses of HSeqF, HSmF, and HSSF, respectively, while the untreated SB had 14.81%. Therefore, this study confirmed the efficiency of those biological processes using the filamentous fungi *Aspergillus japonicus* URM5242 for the enzymatic pretreatment of sugarcane bagasse, aiming to improve biogas production and its methane concentration.

Keywords: Sugarcane bagasse; Pretreatment; *Aspergillus japonicus*; Enzymatic Hydrolysis; Biochemical Potential Methane.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μmol	Micromol
μ	Taxa máxima de produção de metano (NmL/d)
λ	Tempo mínimo para produção de metano (d)
Σ	Somatório
1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
ANOVA	Análise de Variância
AOI	Ácidos Orgânicos Intermediários
AT	Alcalinidade Total
Atm	Atmosfera
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
<i>B_m</i>	Potencial máximo de metano (NmL/gSTV)
BMP	Biochemical Methane Potential
<i>B(t)</i>	Potencial de metano ao longo do tempo
CaCO_3	Carbonato de Cálcio
CE	Condutividade elétrica
CH_4	Metano
CH_3COOH	Ácido acético
cm	Centímetros
CMCase	Endoglucanase
CO_2	Dióxido de Carbono
C5	Açúcar de 5 carbonos
C6	Açúcar de 6 carbonos
d	Dias
DA	Digestão Anaeróbia
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
<i>e</i>	Número de Euler
Eq.	Equação
<i>exp</i>	Exponencial

FF	2-furfuraldeído
Fpase	Celulase total
g	Gramas
GB	Grau de biodegradabilidade
GEE	Gases de Efeito Estufa
h	Horas
HMF	5-hidroxiometil-2-furfuraldeído
HFES	Hidrólise por Fermentação em Estado Sólido
HFSm	Hidrólise por Fermentação Submersa
HFSeq	Hidrólise por Fermentação Sequencial
H ₂	Gás Hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
<i>k</i>	Constante de hidrólise (d)
kcal	Kilocalorias
kg	Kilogramas
kPa	KiloPascal
L	Litros
LG	Lodo granular
M	Molaridade
m ³	Metros cúbicos
mg	Miligramas
mS	MiliSiemens
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
N ₂	Gás Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
NBR	Norma Brasileira
NmL	Volume de Biogás Normalizado
p	Nível de significância
Pa	Pascal
pH	Potencial hidrogeniônico

PIB	Produto Interno Bruto
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
p/v	Concentração peso/volume
rpm	Rotação por minuto
RSS	Soma Residual dos Quadrados
R^2	Fator de determinação
ST	Sólidos totais
STF	Sólidos totais fixos
STV	Sólidos totais voláteis
SV	Sólidos voláteis
t	Tempo
TCD	Detector de Condutibilidade Térmica
TRH	Tempo de retenção hidráulica
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
V_{AS}	Volume acumulado de metano do substrato
V_{AI}	Volume acumulado de metano do inóculo
V_{Sg}	Concentração inicial de substrato sólidos voláteis
v/v	Relação volume/volume
Z_{fi}	Valor previsto
Z_{oi}	Valor observado

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Métodos de pré-tratamentos aplicados a biomassa lignocelulósica	19
Figura 2. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	19
Figura 3. Fluxograma das etapas da digestão anaeróbia	24

CAPÍTULO 1

Figura 1. Fluxograma das etapas sequenciais da metodologia	41
Figura 2. Volume acumulado de biogás e metano durante o ensaio BMP	54
Figura 3. Potencial de geração de metano × Taxa diária de metano	55
Figura 4. Porcentagem de metano no biogás e composição média de metano do ensaio de potencial bioquímico de metano	58
Figura 5. Produção de metano com aplicação de modelos cinéticos para predição matemática da produção de metano	59

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Uso de processos fermentativos para produção de hidrolases a partir de resíduos lignocelulósicos	23
Tabela 2. Potencial de biogás e metano de diferentes substratos lignocelulósicos através do teste BMP	26

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Condições experimentais das configurações para o ensaio BMP	46
Tabela 2. Caracterização físico-química do substrato, hidrolisados e inóculo anaeróbio ...	49
Tabela 3. Quantificação de celulasas e xilanases por diferentes processos de pré-tratamento biológico	52
Tabela 4. Parâmetros cinéticos dos modelos de primeira ordem e Gompertz modificado ..	60
Tabela 5. Caracterização físico-química inicial e final do conteúdo reacional dos reatores do teste de potencial bioquímico de metano	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Resíduos lignocelulósicos	17
2.2 Bagaço de cana-de-açúcar	18
2.3 Tipos de pré-tratamento aplicados a biomassa lignocelulósica	19
2.4 Processos biológicos fermentativos e enzimáticos	21
2.5 Digestão anaeróbia	23
2.6 Potencial Bioquímico de Metano (teste BMP)	25
3. OBJETIVOS	27
4. REFERÊNCIAS	28
5. CAPÍTULO 1.....	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a busca por matérias-primas renováveis para produção de biocombustíveis tornou-se uma estratégia central para indústria energética em cenário nacional e mundial. A biomassa lignocelulósica é considerada um dos recursos mais abundantes e renováveis do mundo, desponta como uma alternativa sustentável para produção de biocombustíveis (Gomes *et al.*, 2022). Essa biomassa possui em sua composição celulose, hemicelulose e lignina, componentes que garantem uma estrutura tridimensional e resistente (Sharma *et al.*, 2022).

No Brasil, as atividades agrícolas possuem papel fundamental para a economia nacional correspondendo a cerca de um terço do Produto Interno Bruto (PIB), o que contribui diretamente com a geração de emprego e renda, fatores importantes para o desenvolvimento socioeconômico. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento Nacional (CONAB), a produção de cana-de-açúcar para a safra de 2023/24 seja de aproximadamente 677,6 milhões de toneladas, representando um crescimento de 11% comparada a safra anterior. Alinhado a este potencial brasileiro, encontram-se consequente geração de resíduos lignocelulósicos derivados da indústria sucroalcooleira, com destaque para o bagaço de cana-de-açúcar (BC).

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria de etanol de primeira geração (1G) e açúcar que apresenta potencial para produção de calor e vapor (combustão direta), biocombustíveis como etanol de segunda geração (etanol 2G) e biogás. No entanto, o grande entrave encontra-se na própria estrutura tridimensional lignocelulósica, recalcitrante e que necessita do uso de pré-tratamentos com o objetivo de modificar a estrutura química e aumentar o grau de biodegradabilidade desse resíduo e, consequentemente, melhorar a produção de biocombustíveis (Zheng *et al.*, 2014).

Os pré-tratamentos são processos unitários ou combinados que utilizam métodos químicos, físicos ou biológicos para melhorar o rendimento e a produção de biocombustíveis. Entre os métodos aplicados como pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, os processos biológicos têm despertado interesse por apresentarem baixo custo, baixa toxicidade e à ausência de necessidade (geralmente) de adição de produtos químicos (Atelge *et al.*, 2020a). Após o pré-tratamento, a estrutura lignocelulósica é modificada, tornando os polissacarídeos e monossacarídeos da estrutura mais suscetíveis a bioconversão. Esses açúcares podem ser aproveitados por tecnologias como a digestão anaeróbia para a produção de biogás (Da Silva, 2023).

A digestão anaeróbia é uma rota tecnológica oportuna para produzir biogás através de resíduos orgânicos de maneira limpa e sustentável (Millati *et al.*, 2023). Neste processo, a matéria orgânica é digerida através de reações bioquímicas por microrganismos anaeróbios, onde ocorrem as etapas de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Ali Shah *et al.*, 2014). O biogás é um biocombustível composto majoritariamente por gás metano (50 – 70%), que possui alto poder calorífico, seguido de outros componentes como dióxido de carbono (25 – 40%) e traços de outros gases (Camargo *et al.*, 2023).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes condições hidrolíticas aplicadas ao bagaço de cana-de-açúcar (BC) por meio dos processos de fermentação em estado sólido (HFES), fermentação submersa (HFSm) e fermentação sequencial (HFSeq), com o objetivo de melhorar a geração de metano (CH₄) na etapa de digestão anaeróbia avaliada através do teste de potencial bioquímico de metano (BMP).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resíduos lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos são compostos orgânicos mais abundantes no meio ambiente. A biomassa lignocelulósica possui em sua composição os polímeros de celulose, hemicelulose e lignina, componentes que garantem uma estrutura resistente a esses resíduos (Sharma *et al.*, 2022). Estes resíduos possuem alta densidade energética, neutralidade em carbono e são considerados matéria prima renovável para produção de biocombustíveis e bioprodutos (Ashokkumar *et al.*, 2024).

A celulose é o principal constituinte da biomassa e é formada por dissacarídeos de glicose que estão conectados por ligações β -1,4 glicosídicas garantindo estabilidade a estrutura molecular (Abraham *et al.*, 2020). As microfibras formadas pelas cadeias celulósicas estão associadas à elevada quantidade de hidroxilas na estrutura molecular levando a formação de ligações de hidrogênio neste polímero natural, que são fortes interações intermoleculares (Zheng *et al.*, 2014). A celulose também possui altos níveis de cristalinidade, apesar de possuir regiões amorfas (Kobayashi *et al.*, 2016).

A hemicelulose é o segundo constituinte mais abundante da biomassa lignocelulósica. É um polissacarídeo heterogêneo formado por pentoses como xilose e arabinose, hexoses como glicose e manose e ácidos como glucurônico e galacturônico, por exemplo (Camargo *et al.*, 2023). É uma estrutura de baixa cristalinidade, tornando-a mais suscetível a ataques químicos, físicos ou biológicos (Abraham *et al.*, 2020).

A lignina é um complexo aromático que preenche os espaços entre a celulose e hemicelulose, formando uma estrutura tridimensional na estrutura lignocelulósica. É formada por unidades de fenilpropano e possui característica hidrofóbica e heterogênea, que garante rigidez a estrutura protegendo a celulose e a hemicelulose de ataques microbianos e enzimáticos (Dos Santos *et al.*, 2019).

O bagaço de cana-de-açúcar é um exemplo típico de resíduo lignocelulósico e o mais abundantemente gerado na agroindústria brasileira. Possui em sua composição lignocelulósica cerca de 45% de celulose, 29% de hemicelulose e 23% de lignina, caracterizando uma estrutura rígida de baixa biodegradabilidade (Tye *et al.*, 2016).

2.2 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo gerado após processamento da cana-de-açúcar na indústria sucroalcooleira para produção de açúcar e etanol de primeira geração (1G). Este resíduo, se descartado de maneira incorreta, pode causar desequilíbrios ambientais devido a sua baixa biodegradabilidade. A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) dispõe diretrizes sobre o manejo e descarte ambientalmente adequado de resíduos sólidos, evitando que estes causem impactos ambientais se depositados incorretamente no meio ambiente (Brasil, 2010). O destino tradicional direcionado a este resíduo é a queima em caldeiras para geração de calor, vapor e energia, no entanto, não é uma rota eficiente devido ao teor de umidade do bagaço que afeta diretamente no aproveitamento energético (Bolado-Rodriguez *et al.*, 2016).

Assim, uma rota alternativa para este resíduo é o reaproveitamento como matéria-prima renovável e de baixo custo para produção biocombustíveis como etanol de segunda geração (2G) e biogás, por exemplo. O aproveitamento e a conversão da biomassa de atividades agrícolas em bioprodutos tem sido chamada de biorrefinaria lignocelulósica, também conhecida como biorrefinarias de segunda geração (Yadav *et al.*, 2023). Este conceito tem se destacado devido a capacidade de reaproveitar e valorizar energeticamente os resíduos lignocelulósicos derivados da agroindústria (Calabrò *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2016).

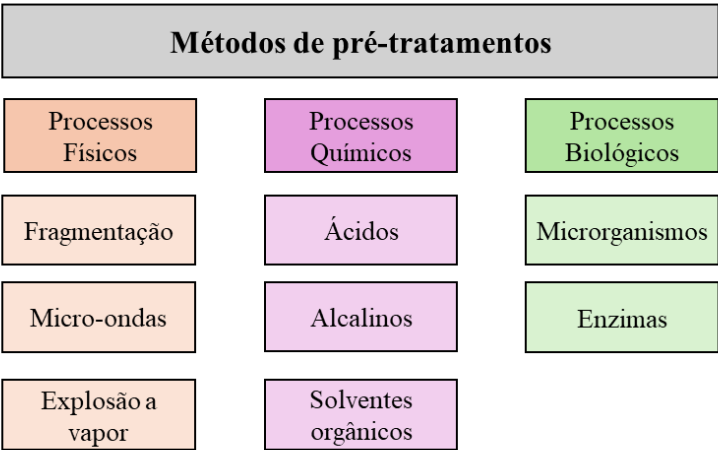
O desenvolvimento da biorrefinaria 2G pode contribuir para o avanço da bioeconomia circular, assegurando um ciclo de vida fechado e sustentável para esses resíduos, ao mesmo tempo em que gera produtos renováveis de valor agregado (Jaroenkietkajorn *et al.*, 2024; Tramontina *et al.*, 2023). As biorrefinarias empregam uma variedade de tecnologias de pré-tratamento e processamento da biomassa lignocelulósica, por meio de processos físicos,

químicos e biológicos, que serão descritos detalhadamente no item a seguir (Cambero *et al.*, 2016).

2.3 Tipos de pré-tratamento aplicados a biomassa lignocelulósica

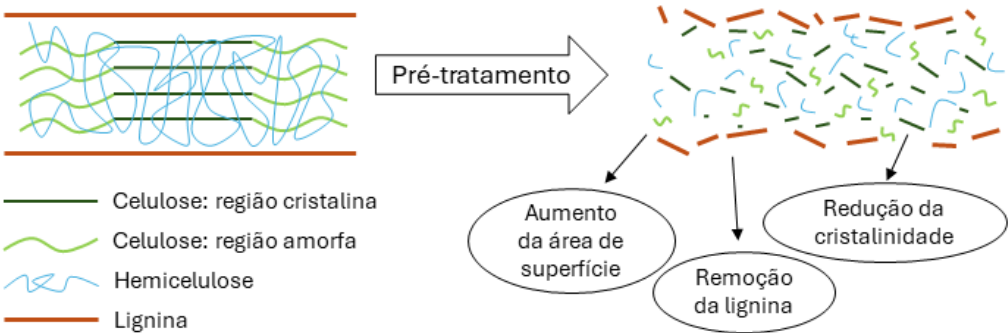
Os materiais lignocelulósicos são caracterizados pela estrutura rígida e de baixa biodegradabilidade. Sendo assim, devido às propriedades recalcitrantes, existe a necessidade de pré-tratamentos, que podem ser individuais ou combinados, através de métodos químicos, físicos ou biológicos de acordo com a Figura 1 e Tabela 1. Conforme a Figura 2, esses processos visam modificar as propriedades químicas e estruturais da biomassa lignocelulósica com o intuito de aumentar a área de contato e a disponibilidade de açúcares fermentáveis (Zheng *et al.*, 2014).

Figura 1. Métodos de pré-tratamentos aplicados a biomassa lignocelulósica.



Fonte: Autor (2024)

Figura 2. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Millat *et al.* (2020)

Os processos físicos aplicados como pré-tratamento da biomassa lignocelulósica geralmente consistem em operações unitárias que empregam técnicas mecânicas e termodinâmicas como variações de temperatura, calor e pressão. Os processos mais comuns são fragmentação (De La Rubia *et al.*, 2011), explosão a vapor (Jacquet *et al.*, 2011), processos de irradiação como micro-ondas (Jackowiak *et al.*, 2011) e pirólise (Arregi *et al.*, 2016). Apesar de apresentar rendimentos favoráveis, os custos associados aos processos físicos são relevantes para avaliar a viabilidade desses pré-tratamentos (Wang *et al.*, 2023a).

Os pré-tratamentos químicos envolvem a utilização de reagentes ácidos ou alcalinos, solventes orgânicos e tratamentos oxidativos (Camargo *et al.*, 2019; Chandra *et al.*, 2012). A utilização de ácidos inorgânicos é eficiente na hidrólise da biomassa lignocelulósica, no entanto, induz a formação de componentes inibidores para as etapas subsequentes como 2-furfuraldeído (FF) e 5-hidroxi-metil-2-furfuraldeído (HMF) (Gomes *et al.*, 2022). Além disso, existem alguns entraves para aplicação deste pré-tratamento como o custo dos reagentes, perda de monossacarídeos durante as reações oxidativas e a geração de resíduos ácidos/alcalinos que necessitam ser neutralizados devido as suas características corrosivas e tóxicas (Camargo *et al.*, 2023).

Os pré-tratamentos biológicos envolvem o uso de microrganismos em culturas puras ou consorciadas, enzimas como celulasas e xilanases produzidas por fungos filamentosos, por exemplo (Atelge *et al.*, 2020a). Esses agentes biológicos são capazes de converter e modificar bioquimicamente a estrutura da biomassa lignocelulósica (Sharmila *et al.*, 2024). Os processos biológicos têm despertado crescente interesse devido à baixa toxicidade e, sobretudo, aos aspectos econômicos quando comparados com os processos físicos e químicos (Wang *et al.*, 2023a).

As enzimas podem ser utilizadas diretamente utilizando-se dos processos fermentativos de pré-tratamentos ou obtidas comercialmente purificadas e concentradas. As enzimas comerciais geralmente apresentam custos impeditivos e que muitas vezes inviabilizam esses pré-tratamentos em escala. Estudar processos biológicos de pré-tratamento mais economicamente viáveis pode favorecer a quebra desse paradigma e viabilizar sua utilização em escala.

2.4 Processos biológicos fermentativos e enzimáticos

A utilização de resíduos agroindustriais lignocelulósicos como substrato para processos fermentativos oferece condições favoráveis para o crescimento de fungos filamentosos e a produção de enzimas durante o bioprocessamento (Leite *et al.*, 2021).

Os processos fermentativos tradicionais para produção de enzimas ocorrem através da fermentação submersa (FSm) e a fermentação em estado sólido (FES) (Boondaeng *et al.*, 2024).

A fermentação submersa é o método mais comum para produção de enzimas em escala industrial devido a sua facilidade operacional em relação a parâmetros importantes do processo como temperatura e pH, por exemplo (Catalán & Sánchez, 2020). Este processo apresenta facilidade de scale-up e possui metodologias bem estabelecidas para o controle operacional (Cunha *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2022).

Por sua vez, a fermentação em estado sólido ocorre na ausência quase total de líquido no meio, isto é, um processo em base sólida que atua como suporte físico para o crescimento dos fungos filamentosos (Alegre *et al.*, 2009; Pandey, 1992). Esta tecnologia apresenta vantagens quando comparada ao processo submerso por apresentar simplicidade operacional, baixa necessidade de energia e menor uso de água e, consequentemente, reduzindo os custos operacionais (Boondaeng *et al.*, 2024; Krishania *et al.*, 2018). Além disso, apresenta maior rendimento de produção e maior taxa de recuperação de produtos (Leite *et al.*, 2021).

Além dos processos fermentativos mencionados anteriormente, há também uma metodologia que consiste em empregar a combinação da fermentação em estado sólido e fermentação submersa, conhecida como fermentação sequencial (FSeq) (Alves *et al.*, 2020). De acordo com Cunha *et al.* (2012), este processo tem demonstrado um alto potencial para produção de enzimas como celulasas e xilanases.

As enzimas são moléculas de proteínas que possuem capacidade de catalisar reações químicas acelerando o tempo de reação sem serem consumidas. Essas biomoléculas possuem alta complexidade e podem ser sintetizadas através de microrganismos como fungos filamentosos. Estes biocatalisadores possuem ampla variedade de aplicações e possuem vantagens comparadas às catálises químicas que geram subprodutos indesejáveis (Rigo *et al.*, 2021).

Entre as enzimas mais utilizadas no meio industrial destacam-se as proteases e lipases, entretanto, as celulasas vêm se destacando e ganhando espaço no setor industrial na última década (Kapoor *et al.*, 2016).

O crescimento das celulasas pode ser explicado pela ampla aplicabilidade industrial oferecida por esta enzima, que pode atuar na indústria de alimentos, biocombustíveis e celulose (Tantayotai *et al.*, 2017).

As celulasas são enzimas hidrolíticas que atuam na hidrólise do polímero celulose. O complexo celulolítico é formado por três grupos que atuam sinergicamente sendo as endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (Sharma *et al.*, 2022).

As endoglucanases atuam na quebra das ligações glicosídicas nas regiões de baixa cristalinidade da celulose (Siqueira *et al.*, 2020). As exoglucanases hidrolisam as extremidades redutoras ou não redutoras da cadeia celulósica, gerando como produto intermediário a celobiose e as β -glucosidases degradam a celobiose em glicose (Hasunuma *et al.*, 2013; Juturu *et al.*, 2014).

As xilanases são enzimas que hidrolisam a xilana, que é um polissacarídeo e principal componente da hemicelulose em pentoses mais simples como a xilose e arabinose (Guler *et al.*, 2023). Em termos de atividade catalítica, as xilanases são enzimas versáteis e são capazes de hidrolisar até mesmo algumas ligações na estrutura da celulose através da ação das endo-1,4- β -xilanases e endo-1,3- β -xilanases (Wang *et al.*, 2019).

A produção de celulasas e xilanases é amplamente relatada em estudos e produzida comercialmente através da utilização de microrganismos como fungos e bactérias.

Os fungos se destacam na produção desses biocatalizadores quando comparadas às bactérias devido as suas enzimas apresentarem vantagens em alguns parâmetros como estabilidade térmica e pH, maior atividade enzimática e fácil recuperação (Saroj *et al.*, 2022). A Tabela 1 apresenta o uso de diferentes processos fermentativos para hidrólise de resíduos lignocelulósicos através da produção de celulasas e xilanases fúngicas.

Dentre os fungos sintetizadores do complexo hemicelulolítico, destacam-se os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* como o *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus japonicus*, por exemplo (Sales *et al.*, 2011). Dessa maneira, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica através de processos fermentativos e enzimáticos é uma alternativa para melhorar a produção de biogás por meio da digestão anaeróbia.

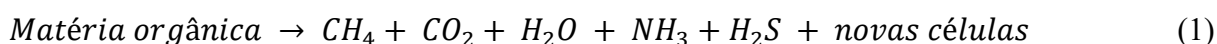
Tabela 1. Uso de processos fermentativos para produção de hidrolases a partir de resíduos lignocelulósicos.

Processo fermentativo	Microrganismo	Substrato lignocelulósico	Hidrolase	Resultados	Referência
Submerso* e sequencial**	<i>Aspergillus japonicus</i> URM5520	Bagaço de cana-de-açúcar	CMCase	0,066 U/ml*; 0,540U/ml**	Alves <i>et al.</i> (2020)
Submerso	<i>Aspergillus flavus</i> KUB2	Bagaço de cana-de-açúcar	CMCase	1,04 U/ml	Namnuch <i>et al.</i> (2020)
Sequencial	<i>Aspergillus niger</i>	Folhas de árvore	CMCase* FPase**	413,49 U/l*; 230,68 U/l**	Santos <i>et al.</i> (2022)
Cultivo líquido	<i>Aspergillus japonicus</i> <i>saito</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Xilanase	3,14 U/ml	Ferreira <i>et al.</i> (2020)
Submerso	<i>Aspergillus niger</i> A12	Bagaço de cana-de-açúcar	CMCase* e Xilanase**	432 U/l*; 714 U/l**	Cunha <i>et al.</i> (2012)
Estado sólido	<i>Aspergillus tubingensis</i> JP-1	Farelo de arroz*; Palha de trigo**	Xilanase	509 U/g*; 1,478 U/g**	Pandya e Gupte (2012)
Submerso	<i>Trichoderma reesei</i> * e <i>Aspergillus awamori</i> **	Palha de arroz pré-tratada (NaOH)	FPase	27,04 U/mg*; 15,19 U/mg**	Naher <i>et al.</i> (2021)
Estado sólido* e submerso**	<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Palha de arroz	CMCase	125 IU/g*; 94 IU/g**	Singh <i>et al.</i> (2021)

Legenda: CMCase: atividade de endoglucanase; FPase: atividade de celulase total; *: Condição respectiva.

2.5 Digestão anaeróbia

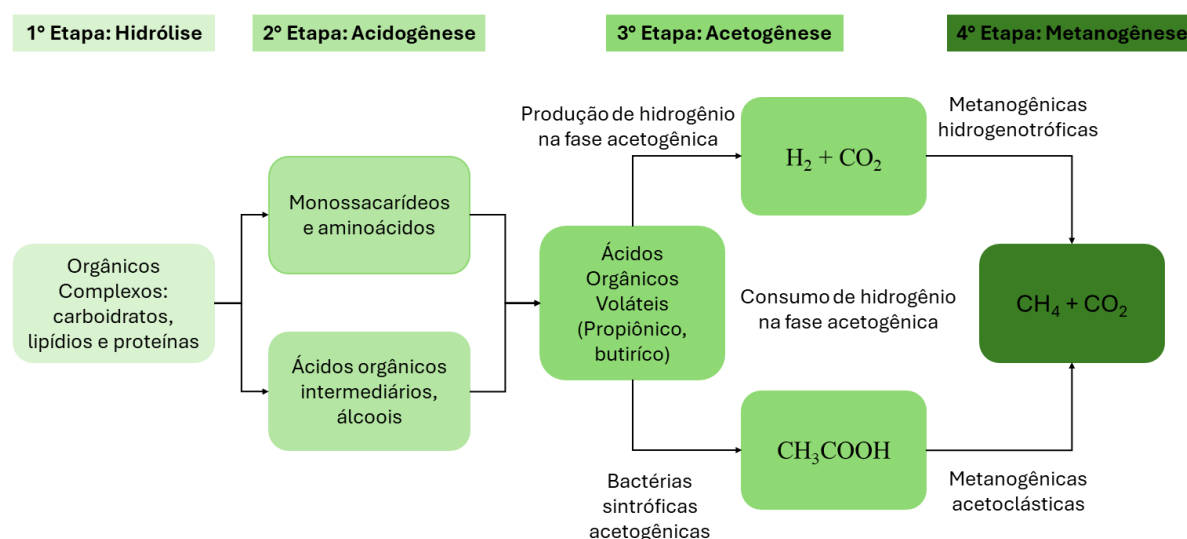
A digestão anaeróbia (DA) é um processo que envolve a oxidação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios, ou seja, ambientes ausentes de gás oxigênio (O₂), onde ocorrem os processos metabólicos de fermentação e respiração (Chernicharo, 1997), conforme a Equação global 1. Este processo pode ser direcionado para o tratamento de águas residuárias, resíduos orgânicos convencionais e não convencionais como os lignocelulósicos, por exemplo (Millati *et al.*, 2020).



A digestão anaeróbia é um processo complexo subdividido em quatro etapas bioquímicas sequenciais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese conforme a Figura 3.

Inicialmente, a etapa de hidrólise é responsável pela conversão de substratos complexos como carboidratos, lipídios e proteínas em compostos mais simples como açúcares, aminoácidos e ácidos graxos longos (Ali Shah *et al.*, 2014). Na segunda etapa, os microrganismos acidogênicos convertem os produtos derivados da hidrólise em acetato e compostos intermediários como álcool, ácidos graxos de cadeia curta (Li *et al.*, 2019).

Figura 3. Fluxograma das etapas da digestão anaeróbia.



Fonte: Adaptado Lettinga *et al.* (1996)

Na etapa de acetogênese, as bactérias sintróficas acetogênicas oxidam os ácidos graxos voláteis como propiônico e butírico, além de álcoois, transformando-os em acetato, dióxido de carbono e hidrogênio. Posteriormente, esses produtos são utilizados como substrato na etapa metanogênica (Millati *et al.*, 2023). O acetato pode ser produzido tanto na etapa acidogênica quanto na acetogênica, seguindo duas rotas distintas que dependem diretamente das condições ambientais. A metanogênese é etapa em que ocorre a formação de metano através das arqueas metanogênicas. Esta etapa é subdividida por duas rotas sendo a via acetoclástica e a via hidrogenotrófica.

As metanogênicas acetoclásticas são responsáveis por cerca de 70% da produção de metano. Os principais microrganismos que atuam nesta rota são do gênero *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (Chernicharo, 1997). A via acetoclástica é caracterizada por utilizar o acetato como fonte de carbono e energia gerando como produtos o CH₄ e CO₂ conforme a Equação 2.

Esta rota é preferível quando as concentrações de hidrogênio são baixas (<40 Pa) (Demirel e Scherer, 2008).



Em elevadas pressões parciais de hidrogênio (>500 Pa), a metanogênese hidrogenotrófica é favorecida (Equação 3). O hidrogênio atua como aceptor final de elétrons para formar metano através do grupo microbiano metanogênicas hidrogenotróficas (Demirel e Scherer, 2008). Os principais gêneros são *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus* (Chernicharo, 1997).



O biogás formado pela digestão anaeróbia possui em sua composição majoritariamente o metano (50 – 70%), dióxido de carbono (25 – 45%) e traços de outros gases como sulfídrico (H₂S), por exemplo (Atelge *et al.*, 2020b, Kyawt *et al.*, 2024). Trata-se de um gás incolor e inflamável, apresenta uma chama azul ao entrar em combustão. Este biogás pode ser aproveitado devido ao seu alto poder calorífico (4580 a 5495 kcal/m³) em turbinas a gás para produção de energia elétrica ou para outras finalidades energéticas (Camargo *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023b).

A produção biogás através da biomassa lignocelulósica é uma alternativa sustentável, uma vez que este biocombustível possui neutralidade em carbono e capacidade de reduzir as emissões do efeito de gases do efeito estufa (Mohanty *et al.*, 2022; Sharmila *et al.*, 2024). Para mais, este biocombustível é capaz de ser uma alternativa diante das incertezas dos recursos fósseis, bem como estar alinhado a Agenda 2030 para alcance dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), especificamente o Objetivo 7, que trata de energia limpa e sustentável (ONU, 2030).

2.6 Potencial Bioquímico de Metano (teste BMP)

Um método consolidado para avaliar o potencial de biogás da biomassa lignocelulósica é através do teste de Potencial Bioquímico de Metano ou Biochemical Methane Potential (BMP). O ensaio BMP permite avaliar através de ensaios em batelada (batch reactor) a degradação anaeróbia de substratos orgânicos (Filer *et al.*, 2019). Este teste é capaz de fornecer

informações sobre a produção de biogás e a biodegradabilidade do substrato, avaliações cinéticas de produção e efeitos inibitórios do processo. A Tabela 2 apresenta o potencial de biogás e metano de diferentes substratos lignocelulósicos.

Tabela 2. Potencial de biogás e metano de diferentes substratos lignocelulósicos através do teste BMP.

Substrato	Pré-tratamento	Condições	Resultado	Referência
Casca de laranja	-	Mesofílicas, 60 dias, lodo industrial	348,00 NmL/gSV*	Santos <i>et al.</i> (2020)
Casca de maracujá	Hidrólise enzimática por fermentação em estado sólido	Mesofílicas, 60 dias, lodo flocular	118,90 NmL*	Da Silva <i>et al.</i> (2023)
Bagaço de cana	Hidrotérmico + peróxido de hidrogênio	Lodo granular, 37°C	323,30 NmL/gSV**	Ahmad <i>et al.</i> (2020)
Casca de laranja	Hidrólise enzimática por fermentação submersa	37°C, 60 rpm, 30 dias	97,02 NmL*	Silva <i>et al.</i> (2019)
Capim Elefante	Alcalino + Biológico	30°C, 70 dias, esterco bovino	218,80 cm³/gSV**	Intasit <i>et al.</i> (2022)
Bagaço de cana	Hidrólise enzimática (Celluclast®, Viscozyme®).	37°C, 120 rpm;	240,9 NmL/gSV**	Pérez Barragán <i>et al.</i> (2024)

Legenda: NmL: volume de normalizado; SV: sólidos voláteis; rpm: rotação por minuto; *Biogás; **Metano

3. OBJETIVOS

Geral

Produzir biogás utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-hidrolisado enzimaticamente por diferentes processos fermentativos.

Específicos

- Realizar caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar e do inóculo anaeróbico;
- Produzir e quantificar hidrolases fúngicas por fermentação em estado sólido, fermentação submersa e fermentação sequencial utilizando bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Aspergillus japonicus* URM5242;
- Avaliar o potencial bioquímico de metano do bagaço de cana-de-açúcar pré-hidrolisado utilizando diferentes processos fermentativos e comparar com o processo sem pré-tratamento;
- Caracterizar o biogás produzido;
- Avaliar o comportamento cinético da produção de biogás;
- Caracterizar o subproduto gerado pela digestão anaeróbia final.

4. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, Amith; MATHEW, Anil K.; PARK, Hyojung; *et al.* RETRACTED: Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122725, 2020.
- AHMAD, Fiaz; SAKAMOTO, Isabel Kimiko; ADORNO, Maria Angela Tallarico; *et al.* Methane Production from Hydrogen Peroxide Assisted Hydrothermal Pretreatment of Solid Fraction Sugarcane Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 1, p. 31–50, 2020.
- ALEGRE, Ana Cláudia Paiva; POLIZELI, Maria De Lourdes Teixeira De Moraes; TERENCE, Héctor Francisco; *et al.* Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 612–622, 2009.
- ALI SHAH, Fayyaz; MAHMOOD, Qaisar; MAROOF SHAH, Mohammad; *et al.* Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–21, 2014.
- ALVES, R. O.; DE OLIVEIRA, R. L.; SANTOS, A. F. de M. S.; PORTO, T. S. Produção de celulases por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 por diferentes processos fermentativos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. **Revista Geama, [S. l.]**, v. 6, n. 1, p. 44–50, 2020.
- ARREGI, A.; LOPEZ, G.; AMUTIO, M.; *et al.* Hydrogen production from biomass by continuous fast pyrolysis and in-line steam reforming. **RSC Advances**, v. 6, n. 31, p. 25975–25985, 2016.
- ASHOKKUMAR, Veeramuthu; CHANDRAMUGHI, V.P.; KUMAR, Gopalakrishnan; *et al.* Advancements in lignocellulosic biomass: A critical appraisal of fourth-generation biofuels and value-added bioproduct. **Fuel**, v. 365, p. 130751, 2024.
- ATELGE, M. R.; KRISA, David; KUMAR, Gopalakrishnan; *et al.* Biogas Production from Organic Waste: Recent Progress and Perspectives. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 3, p. 1019–1040, 2020a.
- ATELGE, M.R.; ATABANI, A.E.; BANU, J. Rajesh; *et al.* A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, v. 270, p. 117494, 2020b.
- BOLADO-RODRÍGUEZ, Silvia; TOQUERO, Cristina; MARTÍN-JUÁREZ, Judit; *et al.* Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 182–190, 2016.
- BOONDAENG, Antika; KEABPIMAI, Jureeporn; TRAKUNJAE, Chanaporn; *et al.* Cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus* sp. IN5: Parameter optimization and application. **Heliyon**, v. 10, n. 5, p. e26601, 2024.
- BRASIL. LEI nº. 12.305. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 2 jan. 2010.
- CALABRÒ, P.S.; PONTONI, L.; PORQUEDDU, I.; *et al.* Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: Preliminary batch results. **Waste Management**, v. 48, p. 440–447, 2016.
- CAMARGO, Franciele P.; RABELO, Camila A.B.S.; DUARTE, Iolanda C.S.; *et al.* Biogas

from lignocellulosic feedstock: A review on the main pretreatments, inocula and operational variables involved in anaerobic reactor efficiency. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 54, p. 20613–20632, 2023.

CAMARGO, Franciele Pereira; SAKAMOTO, Isabel Kimiko; DUARTE, Iolanda Cristina Silveira; *et al.* Influence of alkaline peroxide assisted and hydrothermal pretreatment on biodegradability and bio-hydrogen formation from citrus peel waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 41, p. 22888–22903, 2019.

CAMBERO, Claudia; SOWLATI, Taraneh; PAVEL, Mihai. Economic and life cycle environmental optimization of forest-based biorefinery supply chains for bioenergy and biofuel production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 107, p. 218–235, 2016.

CATALÁN, Eva; SÁNCHEZ, Antoni. Solid-State Fermentation (SSF) versus Submerged Fermentation (SmF) for the Recovery of Cellulases from Coffee Husks: A Life Cycle Assessment (LCA) Based Comparison. **Energies**, v. 13, n. 11, p. 2685, 2020.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T.; *et al.* Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments. **Energy**, v. 43, n. 1, p. 273–282, 2012.

CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. **Reatores anaeróbicos**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1997. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 5).

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra brasileira de cana-de-açúcar: 4º levantamento da Safra 2023/2024**, abril 2024. Brasília Companhia Nacional de Abastecimento. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso: 07 jun. 2024.

CUNHA, F.M.; ESPERANÇA, M.N.; ZANGIROLAMI, T.C.; *et al.* Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270–274, 2012.

DA SILVA, Anderson Felipe Viana; SANTOS, Liliana Andréa Dos; DE MELO, Allan Henrique Félix; *et al.* Use of Cellulase Obtained from Solid-State Fermentation of Orange and Passion Fruit Peels as an Enzymatic Pre-treatment Step for Anaerobic Digestion. **BioEnergy Research**, v. 17, n. 2, p. 1288–1301, 2023.

DE LA RUBIA, M.A.; FERNÁNDEZ-CEGRÍ, V.; RAPOSO, F.; *et al.* Influence of particle size and chemical composition on the performance and kinetics of anaerobic digestion process of sunflower oil cake in batch mode. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58–59, p. 162–167, 2011.

DEMIREL, Burak; SCHERER, Paul. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 7, n. 2, p. 173–190, 2008.

DOS SANTOS, Antonio Carlos; XIMENES, Eduardo; KIM, Youngmi; *et al.* Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 518–531, 2019.

FILER, Jameson; DING, Huihuang H.; CHANG, Sheng. Biochemical Methane Potential (BMP) Assay Method for Anaerobic Digestion Research. **Water**, v. 11, n. 5, p. 921, 2019.

GOMES, Michelle Garcia; PARANHOS, Aline Gomes De Oliveira; CAMARGOS, Adonai Bruneli; *et al.* Pretreatment of sugarcane bagasse with dilute citric acid and enzymatic

hydrolysis: Use of black liquor and solid fraction for biogas production. **Renewable Energy**, v. 191, p. 428–438, 2022.

GÜLER, Fatma; ÖZÇELİK, Filiz. Screening of xylanase producing *Bacillus* species and optimization of xylanase process parameters in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 51, p. 102801, 2023.

HASUNUMA, Tomohisa; OKAZAKI, Fumiyoshi; OKAI, Naoko; *et al.* A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 513–522, 2013.

INTASIT, Rawitsara; KHUNRAE, Pongsak; MEEINKUIRT, Weeradej; *et al.* Fungal pretreatments of Napier grass and sugarcane leaves for high recovery of lignocellulosic enzymes and methane production. **Industrial Crops and Products**, v. 180, p. 114706, 2022.

JACKOWIAK, D.; BASSARD, D.; PAUSS, A.; *et al.* Optimisation of a microwave pretreatment of wheat straw for methane production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 12, p. 6750–6756, 2011.

JACQUET, N.; QUIÉVY, N.; VANDERGHEM, C.; *et al.* Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 9, p. 1582–1588, 2011.

JAROENKIETKAJORN, Ukrit; GHEEWALA, Shabbir H.; MUNGKUNG, Rattanawan; *et al.* Challenges and Opportunities of Bio-Circular-Green Economy for Agriculture. **Circular Economy and Sustainability**, 2024.

JUTURU, Veeresh; WU, Jin Chuan. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KAPOOR, M.; PANWAR, D.; KAIRA, G.S. Bioprocesses for Enzyme Production Using Agro-Industrial Wastes. *In: Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production*. [s.l.]: Elsevier, 2016, p. 61–93.

KOBAYASHI, Hirokazu; KAIKI, Hiroyuki; SHROTRI, Abhijit; *et al.* Hydrolysis of woody biomass by a biomass-derived reusable heterogeneous catalyst. **Chemical Science**, v. 7, n. 1, p. 692–696, 2016.

KRISHANIA, Meena; SINDHU, Raveendran; BINOD, Parameswaran; *et al.* Design of Bioreactors in Solid-State Fermentation. *In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. [s.l.]: Elsevier, 2018, p. 83–96.

KYAWT, Yin Yin; AUNG, Min; XU, Yao; *et al.* Methane production and lignocellulosic degradation of wastes from rice, corn and sugarcane by natural anaerobic fungi-methanogens co-culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 4, p. 109, 2024.

LEITE, Paulina; SOUSA, Daniel; FERNANDES, Helena; *et al.* Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 27, p. 100407, 2021.

Lettinga, G. Sustainable integrated biological wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 3, 1996.

LI, Yue; CHEN, Yinguang; WU, Jiang. Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. **Applied Energy**, v. 240, p. 120–137, 2019.

MILLATI, Ria; WIKANDARI, Rachma; ARIYANTO, Teguh; *et al.* Anaerobic digestion biorefinery for circular bioeconomy development. **Bioresource Technology Reports**, v. 21,

p. 101315, 2023.

MILLATI, Ria; WIKANDARI, Rachma; ARIYANTO, Teguh; *et al.* Pretreatment technologies for anaerobic digestion of lignocelluloses and toxic feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 304, p. 122998, 2020.

MOHANTY, Anee; MANKOTI, Megha; ROUT, Prangya Ranjan; *et al.* Sustainable utilization of food waste for bioenergy production: A step towards circular bioeconomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 365, p. 109538, 2022.

NAHER, Laila; FATIN, Siti Noor; SHEIKH, Md Abdul Halim; *et al.* Cellulase Enzyme Production from Filamentous Fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in Submerged Fermentation with Rice Straw. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 868, 2021.

NAMNUCH, Nattida; THAMMASITTIRONG, Anon; THAMMASITTIRONG, Sutticha Naranong. Lignocellulose hydrolytic enzymes production by *Aspergillus flavus* KUB2 using submerged fermentation of sugarcane bagasse waste. **Mycology**, v. 12, n. 2, p. 119–127, 2021.

ONU. Organização das Nações Unidas. **Objetivos do Desenvolvimento Sustentável**. 2018. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br>. Acesso: 02 jul. 2024.

PANDEY, Ashok. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 109–117, 1992.

PANDYA, Jagruti J.; GUPTE, Akshaya. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 5, p. 769–779, 2012.

PÉREZ-BARRAGÁN, Jacobo; GARCÍA-DEPRAECT, Octavio; MAYA-YESCAS, Rafael; *et al.* Solid and liquid fractionation of sugarcane and Agave bagasse during ozonolysis and enzymatic hydrolysis: Impact on biohydrogen and biogas production. **Industrial Crops and Products**, v. 210, p. 118175, 2024.

RIBEIRO SALES, Marilia; DE MOURA, Rosemary Batista; DA SILVA, Milena Fernandes; *et al.* Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* species. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 917–924, 2011.

RIGO, Diane; GAYESKI, Luana; TRES, Gabriela Albuquerque; *et al.* PRODUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ENZIMAS: UMA REVISÃO/MICROBIOLOGICAL PRODUCTION OF ENZYMES: A REVIEW. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9232–9254, 2021.

SANTOS, Gislaine Brito; DE SOUSA FRANCISCO FILHO, Álvaro; RÊGO DA SILVA RODRIGUES, Jacqueline; *et al.* Cellulase production by *Aspergillus niger* using urban lignocellulosic waste as substrate: Evaluation of different cultivation strategies. **Journal of Environmental Management**, v. 305, p. 114431, 2022.

SANTOS, Liliana Andréa Dos; VALENÇA, Rebeca Beltrão; SILVA, Leandro César Santos Da; *et al.* Methane generation potential through anaerobic digestion of fruit waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 256, p. 120389, 2020.

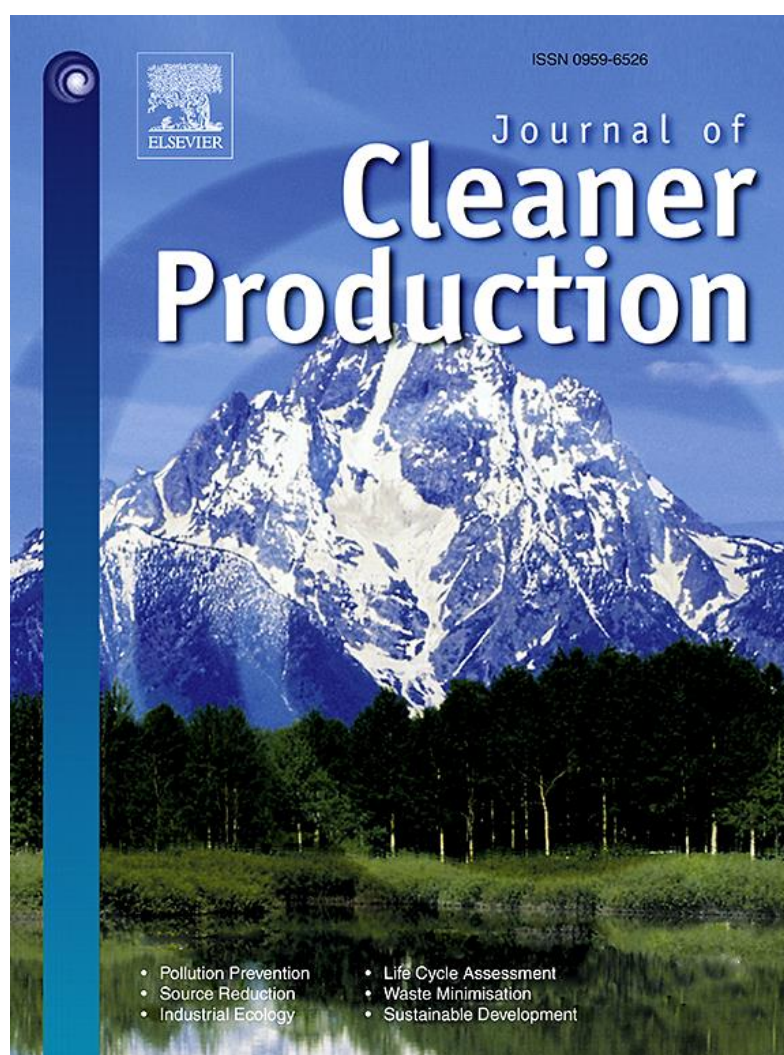
SAROJ, Paramjeet; P, Manasa; NARASIMHULU, Korrapati. Biochemical Characterization of Thermostable Carboxymethyl Cellulase and β -Glucosidase from *Aspergillus fumigatus* JCM 10253. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 6, p. 2503–2527, 2022.

SHARMA, Gaurav; KAUR, Baljit; RAHEJA, Yashika; *et al.* Lignocellulolytic enzymes from *Aspergillus allahabadii* for efficient bioconversion of rice straw into fermentable sugars and biogas. **Bioresource Technology**, v. 360, p. 127507, 2022.

- SHARMILA, V. Godvin; SHANMUGAVEL, Surya Prakash; BANU, J. Rajesh. A review on emerging technologies and machine learning approaches for sustainable production of biofuel from biomass waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 180, p. 106997, 2024.
- SILVA, A.F.V.; SANTOS, L.A.; VALENÇA, R.B.; *et al.* Cellulase production to obtain biogas from passion fruit (*Passiflora edulis*) peel waste hydrolysate. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 6, p. 103510, 2019.
- SINGH, Anita; BAJAR, Somvir; DEVI, Arti; *et al.* Evaluation of cellulase production from *Aspergillus niger* and *Aspergillus heteromorphus* under submerged and solid-state fermentation. **Environmental Sustainability**, v. 4, n. 2, p. 437–442, 2021.
- SIQUEIRA, Joyce Gueiros Wanderley; RODRIGUES, Cristine; VANDENBERGHE, Luciana Porto De Souza; *et al.* Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105419, 2020.
- SU, Haifeng; TAN, Furong; XU, Yuanjian. Enhancement of biogas and methanization of citrus waste via biodegradation pretreatment and subsequent optimized fermentation. **Fuel**, v. 181, p. 843–851, 2016.
- TANTAYOTAI, Prapakorn; PORNWONGTHONG, Peerapong; MUENMUANG, Chotika; *et al.* Effect of Cellulase-producing Microbial Consortium on Biogas Production from Lignocellulosic Biomass. **Energy Procedia**, v. 141, p. 180–183, 2017.
- TRAMONTINA, Robson; SCOPEL, Eupídio; BRENELLI, Livia; *et al.* Applying biorefinery concepts for sugarcane straw upcycling using alkaline and enzymatic treatments to produce value-added compounds and bioenergy. **Biomass and Bioenergy**, v. 178, p. 106972, 2023.
- TYE, Ying Ying; LEE, Keat Teong; WAN ABDULLAH, Wan Nadiyah; *et al.* The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 155–172, 2016.
- WANG, Jing; MA, Dongmei; LOU, Yu; *et al.* Optimization of biogas production from straw wastes by different pretreatments: Progress, challenges, and prospects. **Science of The Total Environment**, v. 905, p. 166992, 2023a.
- WANG, Kui; CAO, Ruoting; WANG, Meiling; *et al.* A novel thermostable GH10 xylanase with activities on a wide variety of cellulosic substrates from a xylanolytic *Bacillus* strain exhibiting significant synergy with commercial Celluclast 1.5 L in pretreated corn stover hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 48, 2019.
- WANG, Quanliang; XIA, Changlei; ALAGUMALAI, Krishnapandi; *et al.* Biogas generation from biomass as a cleaner alternative towards a circular bioeconomy: Artificial intelligence, challenges, and future insights. **Fuel**, v. 333, p. 126456, 2023b.
- YADAV, Aditya; SHARMA, Vishal; TSAI, Mei-Ling; *et al.* Development of lignocellulosic biorefineries for the sustainable production of biofuels: Towards circular bioeconomy. **Bioresource Technology**, v. 381, p. 129145, 2023.
- ZHENG, Yi; ZHAO, Jia; XU, Fuqing; *et al.* Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35–53, 2014.

5. CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COMO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE METANO



CiteScore: 20.4 / Impact Factor: 9.7

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COMO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE METANO

Leonardo César da Silva ^a; Liliana Andréa dos Santos ^b; Jorge Vinicius Fernandes Lima
Cavalcanti ^c; Guilherme Gomes de Sousa Magalhães ^a; André Felipe de Melo Sales Santos ^a;
Tatiana Souza Porto ^b

^a *Departamento de Tecnologia Rural, Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE.
Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52.171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^b *Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco/UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco,
Brasil.*

^c *Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco/UFPE. Av. dos
Economistas, s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.*

**Autor correspondente:*

Endereço de e-mail: tatiana.porto@ufrpe.br

Resumo

A utilização da hidrólise enzimática como pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma alternativa promissora e sustentável para melhorar produção de biocombustíveis a partir dessa fonte renovável. Sendo assim, este estudo avaliou diferentes condições biológicas de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (BC) por meio dos processos de fermentação em estado sólido (FES), fermentação submersa (FSm) e fermentação sequencial (FSeq), utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus japonicus* URM5242, com o objetivo de melhorar a geração de metano (CH_4). A produção de metano foi avaliada através do teste de potencial bioquímico de metano (BMP), utilizando lodo granular como inóculo anaeróbio para as configurações hidrolisadas (HFES, HFESm, HFSeq) e não hidrolisada (BC), durante um período de 35 dias. Para a modelar a produção experimental de CH_4 , foram utilizados os modelos cinéticos de primeira ordem e Gompertz modificado. Os resultados experimentais mostraram que a maior produção de metano foi obtida com o BC hidrolisado por HFESm ($104,88 \text{ NmL.g}^{-1}\text{SV}$), seguido das configurações hidrolisadas por HFES, HFSeq e BC sem pré-tratamento, que apresentaram produções de $69,13 \text{ NmL.g}^{-1}\text{SV}$, $45,16 \text{ NmL.g}^{-1}\text{SV}$ e $15,51 \text{ NmL.g}^{-1}\text{SV}$, respectivamente. O modelo cinético de Gompertz modificado demonstrou um desempenho superior comparado ao modelo de primeira ordem em termos de coeficiente de determinação (R^2) variando entre 0,98 e 0,99, além de quadrados residuais minimizados (RSS). O biogás produzido pelas configurações pré-hidrolisadas e sem pré-tratamento apresentaram teores médios de metano de 63,21%, 60,45%, 53,43% e 14,81% para as configurações HFSeq, HFESm, HFES e BC, respectivamente. De modo geral, este estudo constatou a eficiência dos diferentes bioprocessos como pré-tratamento hidrolítico-enzimático do bagaço de cana-de-açúcar para incrementar a produção de metano. Os resultados obtidos contribuem para o desenvolvimento de novos estudos para produção de biogás, com o objetivo de alcançar metas na produção descentralizada de energia, na diversificação da matriz energética, na bioeconomia circular e transição energética e no alcance de 21 metas de alcance de Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS).

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; *Aspergillus japonicus* URM5242; Hidrólise Enzimática; Potencial Bioquímico de Metano; Biogás.

Abstract

The use of enzymatic hydrolysis as pretreatment of lignocellulosic biomass is a promising and sustainable alternative to improve the biofuel production using this renewable source. Therefore, this study evaluated several biological conditions to hydrolyze sugarcane bagasse (SB) through solid state fermentation (SSF), submerged fermentation (SmF) and sequential fermentation (SeqF) using *Aspergillus japonicus* URM5242, aiming to improve the methane generation (CH_4). The methane production was evaluated through biochemical methane potential (BMP), using granular sludge as anaerobic inoculum for the hydrolyzed biomass (HSSF, HSmF, HSeqF) and non-hydrolyzed biomass, for 35 days. To model the experimental production of CH_4 , the first order and modified Gompertz kinetic models were used. The experimental results showed that the higher methane production was achieved with sugarcane bagasse hydrolyzed through HSmF (104,88 $\text{NmL.g}^{-1}\text{SV}$), followed by HSSF, HSeqF and untreated SB, which achieved productions of 69,13 $\text{NmL.g}^{-1}\text{SV}$, 45,16 $\text{NmL.g}^{-1}\text{SV}$ e 15,51 $\text{NmL.g}^{-1}\text{SV}$, respectively. The Gompertz modified kinetic model represented better the biogas production than the first order model, which was demonstrated by the determination coefficient (R^2) varying between 0.98 and 0.99, as well as minimized residual squares (RSS). The biogas produced using the hydrolyzed and non-hydrolyzed SB had average methane contents of 63.21%, 60.45%, 53.43% and 14.81% for HSeqF, HSmF and SB, respectively. Overall, this study confirmed the efficiency of the several bioprocesses as enzymatic treatment of sugarcane bagasse to increase methane production. The achieved results contribute to the development of new studies for biogas production, aiming to reach goals in decentralized energy production, energy matrix diversification, circular bioeconomy and energy transition, and Sustainable Development Goals (SDGs).

Keywords: Sugarcane bagasse; *Aspergillus japonicus*; Enzymatic Hydrolysis; Biochemical Potential Methane; Biogas.

1 Introdução

O crescimento da população e o desenvolvimento agroindustrial resultam em uma série de impactos para o meio ambiente, tais como a geração e acúmulo de resíduos sólidos, emissões de gases do efeito estufa (GEE) e a intensificação da exploração dos recursos naturais. Entre os resíduos sólidos gerados neste setor, destacam-se os resíduos lignocelulósicos (Camargo et al., 2023). As emissões de GEE derivados dessas atividades são provenientes da queima de combustíveis fósseis e estão estreitamente ligadas à deterioração da qualidade do ar, afetando diretamente a saúde humana e o equilíbrio ambiental (Prasad et al., 2024).

A busca por alternativas sustentáveis para substituir os combustíveis fósseis tem destaque no setor energético global devido às crescentes preocupações com os impactos das mudanças climáticas (Ambaye et al., 2021). Os biocombustíveis surgem como uma alternativa sustentável, pois possuem neutralidade em carbono e a capacidade de reduzir as emissões de GEE (Mohanty et al., 2022; Ranjithkumar et al., 2022; Sharmila et al., 2024). Além disso, são capazes de garantir eficiência e segurança energética global (Ambaye et al., 2021), especialmente diante das incertezas associadas aos recursos fósseis.

Os biocombustíveis podem ser produzidos de diversas fontes, tais como biomassa lignocelulósica (Dussán et al., 2019), resíduos agrícolas (Shahi et al., 2020), resíduos de desperdício de alimentos (Deena et al., 2022) e resíduos de gordura animal ou vegetal (He et al., 2020). O aproveitamento e a conversão da biomassa derivada de atividades agrícolas em bioprodutos e biocombustíveis tem sido chamada de biorrefinaria lignocelulósica (Yadav et al., 2023). As biorrefinarias operam com uma variedade de tecnologias que abrangem processos físicos, químicos, bioquímicos e termoquímicos (Cambero et al., 2016).

Dessa maneira, o conceito de biorrefinaria de segunda geração tem se destacado devido a capacidade de reaproveitar e valorizar energeticamente os resíduos lignocelulósicos gerados na

agroindústria como o bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo (Calabrò et al., 2016; Su et al., 2016), que geralmente não tem destinação ambientalmente adequada e legislação específica para aproveitamento energético (Camargo et al., 2023).

Nesse contexto, o Brasil é um país que se destaca no cenário agroindustrial, sendo um dos principais produtores e exportadores de commodities agrícolas como café, soja, milho e, principalmente, cana-de-açúcar (Tramontina et al., 2023). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção de cana-de-açúcar deve crescer aproximadamente 11% para a safra de 2023/24 e atingir 677,6 milhões de toneladas. Durante o processamento da cana-de-açúcar na indústria sucroalcooleira, uma quantidade significativa de resíduo sólido é gerada na forma de bagaço, totalizando aproximadamente 280 kg por tonelada de matéria-prima processada (Cavalcante et al., 2018). O bagaço de cana-de-açúcar é uma matéria-prima renovável composta pelos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina que garantem uma estrutura tridimensional rígida e de baixa biodegradabilidade (Sharma et al., 2022).

Assim, devido às propriedades recalcitrantes do bagaço de cana-de-açúcar, existe a necessidade de processos de pré-tratamentos que visam modificar as propriedades químicas e estruturais da biomassa lignocelulósica, com o intuito de aumentar a biodisponibilidade de açúcares fermentáveis. Estes tratamentos podem ser individuais ou combinados, através de métodos químicos, físicos ou biológicos (Zheng et al., 2014; Camargo et al., 2019). Os pré-tratamentos biológicos envolvem o uso de micro-organismos em culturas puras ou consorciadas, enzimas como celulasas, xilanases e lacases produzidas por fungos filamentosos (Atelge et al., 2020a). Esses agentes biológicos são capazes de converter e modificar bioquimicamente a estrutura da biomassa lignocelulósica (Sharmila et al., 2024).

Os processos biológicos têm despertado crescente interesse devido à baixa toxicidade e, sobretudo, aos aspectos econômicos quando comparados com os processos físicos e químicos

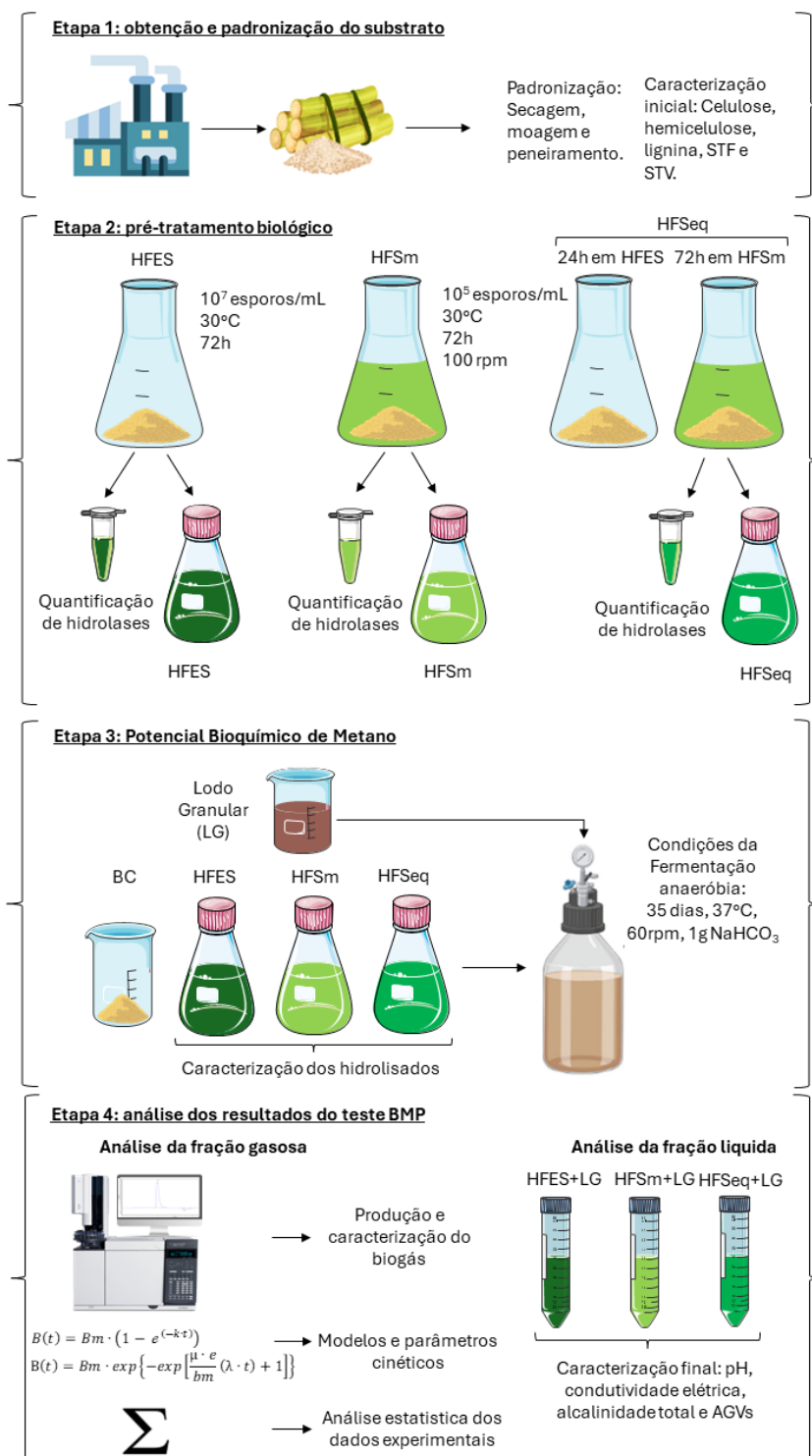
(Wang et al., 2023). Processos biológicos com o objetivo de hidrolisar enzimaticamente e sacarificar a biomassa em uma única etapa geram um produto hidrolisado que pode ser utilizado para produção de biocombustíveis como biogás, por exemplo, através da digestão anaeróbia (Silva et al., 2019; Da Silva et al., 2023).

A digestão anaeróbia é uma rota tecnológica consolidada para produção de biogás (Millati et al., 2020). É um processo bioquímico complexo dividido em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Hosseini Koupaie et al., 2019). O biogás gerado por este processo é formado por metano (CH_4) (50 – 70%), dióxido de carbono (CO_2) (25 – 40%) e traços de outros gases (Atelge et al., 2020b; Kyawt et al., 2024). O biogás pode ser aproveitado devido ao seu alto poder calorífico em turbinas a gás para produção de energia elétrica e outros fins energéticos de maneira limpa e sustentável (Camargo et al., 2023).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes processos biológicos como pré-tratamento utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato para hidrólise enzimática, sacarificação da biomassa lignocelulósica e estimar o potencial bioquímico de metano da biomassa pré-hidrolisada.

2 Materiais e métodos

A Figura 1 apresenta o fluxograma das etapas metodológicas sequenciais de obtenção e padronização do substrato, pré-tratamento biológico da biomassa lignocelulósica, ensaio de Potencial Bioquímico de Metano (BMP), análise dos dados experimentais e modelos cinéticos aplicados para produção de biogás.



Legenda: HFES: hidrólise por fermentação em estado sólido; HFSm: hidrólise por fermentação submersa; HFSeq: hidrólise por Fermentação sequencial; STF: sólidos totais fixos; STV: sólidos totais voláteis. Fonte: Autores (2024).

Figura 1. Fluxograma das etapas sequenciais da metodologia.

2.1 Etapa 1: Obtenção e padronização do substrato

O bagaço de cana-de-açúcar (BC) foi obtido de uma indústria sucroalcooleira localizada no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil. O BC foi seco em estufa de secagem a 65°C, por 48 horas. Após secagem, o bagaço foi moído em um moinho de facas do tipo Willye (TE-650/1) e, posteriormente, padronizado em peneiras granulométricas entre 0,5 e 2,0 mm.

O BC sem pré-tratamento foi caracterizado em relação aos parâmetros de potencial hidrogeniônico (pH) conforme NBR 10.006 (ABNT, 2004), condutividade elétrica (CE), umidade, sólidos voláteis e sólidos (SV) e sólidos fixos (SF) de acordo com Who (1978). Além disso foi analisado o teor de fibras para determinação de celulose, hemicelulose e lignina conforme descrito por Senger *et al.* (2008).

2.2 Etapa 2: pré-tratamento biológico

2.2.1 Fungo filamentoso

O fungo utilizado foi o *Aspergillus japonicus* URM5242 oriundo da coleção de culturas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O meio de cultura utilizado para esporulação do fungo filamentoso foi Czapek-ágar conforme (Klich, 2002). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm de pressão durante 20 minutos. As amostras foram incubadas a 30°C, por 7 dias. Após esporulação completa, os esporos foram coletados com a adição de 10 mL de solução de NaCl (0,9% p/v) e Tween 80 (0,01% v/v) previamente esterilizados. O fungo foi selecionado devido à sua comprovada atividade celulolítica em substratos lignocelulósicos (Silva *et al.*, 2019; Da Silva *et al.*, 2023).

2.2.2 Hidrólise por Fermentação em Estado Sólido (HFES)

Foram utilizados 3 gramas do BC padronizado (0,5 – 2 mm) em Erlenmeyer de 125 mL, previamente esterilizados em autoclave. A solução nutritiva utilizada foi descrita por Stenberg e Mendels (1980) e foi suplementada com 30 g/L de glicose. Para determinar o volume de

esporos foi necessário realizar a contagem de esporos utilizando câmara de Neubauer em microscópio óptico. Foi determinado uma concentração de 10^7 esporos para garantir um crescimento eficiente do microrganismo sobre o substrato sólido. O processo biológico foi conduzido por 72 horas à 30°C em incubadora bacteriológica.

O extrato enzimático foi obtido através da adição de 7,5 mL de tampão acetato (0,05M; pH 5,0) por grama de substrato. Após adição, as amostras foram levadas a incubadora orbital sob rotação de 100 rpm à 30°C durante 90 minutos. O fermentado foi filtrado em bomba a vácuo para obtenção da fração sólida e líquida. A fração sólida foi denominada biomassa hidrolisada por HSSF e a fração líquida de extrato enzimático. O extrato enzimático foi centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm e ambas as frações foram armazenadas sob congelamento (-20°C).

2.2.3 Hidrólise por Fermentação Submersa (HFSm)

A HFSm foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL utilizando 3 gramas de bagaço de cana-de-açúcar com granulometria inferior à 0,5 mm. O volume de esporos foi obtido através da contagem em câmara de Neubauer para uma concentração de 10^5 . A concentração de esporos da HFSm foi inferior comparada a HFES devido a maior disponibilidade de nutrientes no meio líquido que são mais acessíveis e distribuídos uniformemente. A solução nutritiva descrita por Stenberg e Mendels (1980) foi suplementada com 10 g/L de glicose. Foram utilizados 40 mL de solução nutritiva por grama de substrato. A HFSm ocorreu em 72 horas em incubadora orbital sob agitação de 100 rpm à 30°C. O fermentado foi filtrado a vácuo para separar biomassa sólida hidrolisada e a fração líquida da fermentação. Em seguida, a fração líquida foi submetida a centrifugação por 5 minutos a 4000 rpm. Posteriormente, ambas as frações foram armazenadas sob congelamento (-20 °C).

2.2.4 Hidrólise por Fermentação Sequencial (HFSeq)

A HFSeq foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL utilizando 3 gramas de substrato padronizado. Inicialmente, o processo biológico foi conduzido sob cultivo em HFES e,

posteriormente, o processo foi convertido em HFSm após adição de solução nutritiva ao cultivo com o substrato sólido. O processo em HFES teve umidade ajustada para 70% e foi mantido durante 24 horas em estufa bacteriológica. Após este período, foram adicionados 40 mL de solução nutritiva por grama de substrato sólido para transformar o processo em HFSm. O processo submerso foi conduzido por 72 horas em incubadora orbital sob agitação de 100 rpm a 30°C. A fração sólida e líquida foram obtidas de acordo com os métodos descritos anteriormente na HFSm.

2.2.5 Quantificação de hidrolases (celulases e xilanases)

A atividade celulolítica foi determinada segundo Ghose (1987), sendo divididas em duas atividades sendo: atividade de celulase total em papel (FPase) e endoglucanase (CMCase). Para determinação da atividade de FPase, foi utilizado como substrato o papel de filtro (Whatman nº1), cortado em tiras de 1 x 6 cm (50 mg). O substrato foi colocado em tubos de ensaio e foram adicionados 0,5 mL de tampão citrato (0,05M, pH 4,8) e 0,5 mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C durante 60 minutos. Em seguida, a quantidade de glicose liberada foi determinada pela reação com ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme Miller (1959).

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi realizada utilizando como substrato a carboximetilcelulose de sódio a 1% em tampão citrato 0,05 M (pH 4,8). Foram adicionados 0,5 mL de e 0,5 mL de extrato enzimático substrato em tubos de ensaio. A reação enzimática ocorreu a 50°C durante 30 minutos. Em seguida, a quantidade de glicose foi dosada pela reação com DNS. Em ambas as atividades foram utilizados controles da reação colorimétrica (branco do extrato enzimático) e do substrato (branco da reação). As absorbâncias foram convertidas em glicose, mediante reta padrão estabelecida. Uma unidade (U) foi considerada equivalente a 1 µmol de glicose liberada por minuto.

A atividade hemicelulolítica foi realizada através da xilanase de acordo com a metodologia descrita por Bailey (1992), utilizando xilana 1% em tampão citrato 0,05M (pH 5,3) como

substrato para reação enzimática. Foram adicionados 0,450 mL de substrato e 0,050 mL de extrato enzimático sob reação a 50°C durante 5 minutos. A reação foi controlada através do branco do substrato e extrato enzimático como descrito anteriormente. As absorbâncias foram convertidas em concentração de xilose utilizando uma curva de calibração para este mesmo açúcar. A quantidade de xilose liberada pela reação foi quantificada pela reação com DNS. Uma unidade (U) foi considerada equivalente a 1 μmol de xilose liberada por minuto.

2.3 Etapa 3: Teste de Potencial Bioquímico de Metano (BMP)

O inóculo anaeróbio utilizado para o teste BMP foi lodo granular industrial (LG) derivado de um reator Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) de 1000 m³ aplicado para o tratamento de vinhaça bruta da mesma indústria sucroalcooleira. O lodo coletado foi armazenado em bombonas de polipropileno e refrigerados a 8°C antes dos ensaios de BMP.

Inicialmente, o BC hidrolisado obtido do pré-tratamento biológico e o inóculo anaeróbio foram caracterizados através das análises de potencial hidrogeniônico (pH) conforme NBR 10.006 (ABNT, 2004), condutividade elétrica (CE), umidade, sólidos voláteis e sólidos (SV) e sólidos fixos (SF) de acordo com Who (1978).

O teste BMP seguiu a metodologia adaptada por Hansen et al (2004) e Angelidaki (2009). Os biorreatores utilizados no teste BMP funcionam em regime batelada e consistem em frascos de borossilicato de 250 mL, dotados de tampa de nylon rosqueável com anéis de vedação. A tampa do frasco contém três válvulas agulhas acopladas, sendo uma para inserção de gás de nitrogênio para expulsar o gás oxigênio antes do ensaio.

A segunda válvula tem como intuito para aliviar a pressão interna do biorreator e coletar amostra do gás gerado no sistema. A terceira válvula possui um manômetro de 200 kPa, que tem como intuito monitorar a pressão do biogás.

Foram utilizados 3 gramas de substrato e 50 mL de inóculo anaeróbio com adição de 1 g bicarbonato de sódio para assegurar a manutenção das condições de pH no meio na faixa da neutralidade (6,5 – 7,5) (Chernicharo, 1997). A Tabela 1 mostra as configurações testadas e as condições experimentais. Os experimentos foram realizados em triplicatas, considerando um branco onde foram adicionados água destilada, inóculo e bicarbonato de sódio (NaHCO₃). A montagem ocorreu diretamente no frasco do biorreator seguindo as etapas: (1) adição do inóculo; (2) adição de 1 g de bicarbonato de sódio; (3) mistura manual do meio reacional, (4) fechamento do biorreator e válvulas e (5) envolvimento do frasco com papel alumínio para evitar interferência da luz externa.

Tabela 1. Condições experimentais das configurações para o ensaio BMP.

Tratamento	Configuração	Substrato seco (g)	Inóculo (g)	Água (mL)	NaHCO ₃ (g)
BC sem tratamento com adição do lodo granular	BC+LG	3,00	50,00	146,00	1,00
BC hidrolisado por fermentação submersa com adição do lodo granular	HFSm+LG	3,00	50,00	146,00	1,00
BC hidrolisado por fermentação sequencial com adição do lodo granular	HFSeq+LG	3,00	50,00	146,00	1,00
BC hidrolisado por fermentação em estado sólido com adição do lodo granular	HFES+LG	3,00	50,00	146,00	1,00
Lodo granular	LG	-	50,00	149,00	1,00

Legenda: BC: Bagaço de cana de açúcar sem tratamento; HFSm: BC hidrolisado por fermentação submersa; HFSeq: BC hidrolisado por fermentação sequencial; HFES: BC hidrolisado por fermentação em estado sólido; LG: lodo granular.

Finalizado a etapa anterior, as válvulas de inserção e de alívio foram abertas para recirculação de gás nitrogênio por 2 minutos com o objetivo de retirar o oxigênio existente no

interior do biorreator para proporcionar condições de anaerobiose para biodegradação do substrato. Os biorreatores foram conduzidos para uma incubadora com controle de temperatura e agitação orbital sob temperatura de 37°C e 60 rpm durante 35 dias.

2. 4 Análise dos resultados do teste BMP

2.4.1 Produção e caracterização do biogás

O volume de biogás acumulado foi analisado indiretamente através da medição da pressão acumulada de biogás obtida no monitoramento diário conforme a metodologia descrita de Ivanova et al. (2008). O monitoramento da pressão dos biorreatores ocorreu durante 35 dias. A composição do biogás (CH₄, CO₂) foi realizada a partir do 7º dia de experimento, mantendo o headspace dos biorreatores nos últimos dias, antes da medição, sem descarte para aumentar o volume de biogás disponível para injeção no cromatógrafo a gás.

Para avaliar a composição do biogás (CH₄, CO₂) foi utilizado um cromatógrafo a gás (HP 5890) com detector de condutibilidade térmica (TCD) com uma coluna Poparak “N”, que utiliza o N₂ como gás de arraste a uma temperatura do forno de 88°C. Foi utilizado o gás padrão de composição (69,73 de CH₄ e 30,06 de CO₂) para construir a curva analítica.

A fração líquida foi utilizada para avaliação das concentrações de ácidos graxos voláteis (AGVs) nos conteúdos reacionais finais do teste BMP, utilizou-se um cromatógrafo à gás (HP 5890) com detector de ionização de chama, sob temperatura de 135°C e que utiliza gás hidrogênio como gás de arraste, a uma vazão de 2 mL/min com separação analítica em uma coluna capilar J&W carbowax 60 mm, 0,25 mm (diâmetro interno) e 0,25 mm de espessura de fase estacionária. Os padrões utilizados como referência para os AGVs foram os ácidos acético, propiônico e butírico, cada um em uma concentração de 20 mM. O conteúdo líquido foi caracterizado em relação a pH, condutividade elétrica e alcalinidade total conforme metodologias citadas no item anterior.

Os dados cromatográficos referentes ao biogás e ácidos graxos voláteis foram analisados através do software N2000 *Chromatostation*.

2.4.2 Análise do potencial de biogás e modelos cinéticos aplicados a produção de biogás

O potencial de biogás foi determinado utilizando a Equação 1, onde B_m representa o potencial de metano (NmL/gSV), V_{A_s} é o volume acumulado de metano do substrato (NmL), V_{A_i} é o volume acumulado do inóculo (NmL.), V_{S_g} concentração inicial de substrato sólidos voláteis (gSV).

$$B_m = \frac{V_{A_s} - V_{A_i}}{V_{S_g}} \quad (1)$$

A cinética da produção de metano foi modelada por meio do modelo cinético de Gompertz modificado (Equação 2) e do modelo de primeira ordem (Equação 3) (Ibrahim, Abu-Reesh, 2014; Edwiges et al., 2018; Moraes et al., 2021). A cinética foi determinada utilizando o software OriginPro8.0, a partir da curva exponencial e regressão não linear, ajustando cada configuração experimental realizada.

Nas Equações (2) e (3), B_t representa o potencial de CH_4 ao longo do tempo, B_m a potencial máximo de metano, k a constante de hidrólise, μ a taxa máxima de produção de CH_4 , λ tempo mínimo para produção de metano, e o número de Euler (2,718252) e t o tempo.

$$B(t) = B_m \cdot (1 - e^{(-k \cdot t)}) \quad (2)$$

$$B(t) = B_m \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu \cdot e}{B_m} (\lambda \cdot t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

2.4.3 Análise estatística dos dados experimentais

O desempenho dos modelos cinéticos de primeira ordem e Gompertz modificado foi comparado com resultados experimentais e previsto. Diante disso, foram calculados a soma residual dos quadrados (RSS) (Equação 4) e o fator de determinação (R^2) (Equação 5), onde $Z_{\hat{i}}$ é o valor previsto e Z_{oi} é o valor observado.

$$R^2 = \left(\frac{\sum (Z_{fi} - \overline{Z_{fi}})(Z_{oi} - \overline{Z_{oi}})}{\sqrt{\sum (Z_{fi} - \overline{Z_{fi}})^2 \sum (Z_{oi} - \overline{Z_{oi}})^2}} \right)^2 \quad (4)$$

$$RSS = \sum_{i=1}^N (Z_{fi} - Z_{oi})^2 \quad (5)$$

Os resultados obtidos no teste BMP foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) utilizando o programa OriginPro 2021.

3 Resultados e discussão

3.1 Caracterização do BC, hidrolisados e inóculos

Os resultados obtidos da caracterização físico-química do BC sem pré-tratamento, e BCs pré-hidrolisados e do lodo granular estão apresentados na Tabela 2.

O substrato BC sem tratamento e os hidrolisados por tratamentos biológicos apresentaram pH ácido variando de 2,76 a 4,87. O pH ácido é prejudicial para digestão anaeróbia, pois favorece o acúmulo de ácidos orgânicos intermediários (AOI). O inóculo anaeróbio LG apresentou pH próximo a neutralidade, que são características típicas de lodos derivados de biorreatores anaeróbios (Carvalho et al. 2019). Vários autores reportam valor similar de pH (7,49 e 7,7) para lodos granulares anaeróbios (Dos Santos Filho., 2018; Valença et al., 2021; Santos et al., 2022). Os microrganismos anaeróbios que atuam neste processo são sensíveis a mudanças ambientais no biorreator, como temperatura, pH e o acúmulo de AGVs, que afetam a atividade microbiana (Singh et al. 2024).

Tabela 2. Caracterização físico-química do bagaço de cana de açúcar (BC), BC hidrolisados e inóculo anaeróbio (LG).

Parâmetro	BC	HFES	HFSm	HFSeq	LG
pH	3,85	4,87	4,61	2,76	7,80
Umidade (%)	35,79 ± 1,05	79,72 ± 0,32	83,83 ± 0,29	88,88 ± 0,60	85,08 ± 0,22
Condutividade Elétrica (mS/cm25°C)	892,3	4,70	5,85	4,84	7,44
Sólidos Fixos (%)	2,08 ± 0,40	2,95 ± 0,13	9,49 ± 0,18	3,83 ± 0,21	35,76 ± 0,35
Sólidos Voláteis (%)	97,91 ± 0,41 ^a	97,04 ± 0,013 ^b	90,50 ± 0,18 ^d	96,16 ± 0,21 ^c	64,23 ± 0,35
Celulose (C) (%)	45,81 ± 2,16 ^a	46,03 ± 0,42 ^a	41,66 ± 0,94 ^a	42,20 ± 2,08 ^a	-
Hemicelulose (H) (%)	21,01 ± 0,97 ^a	20,71 ± 0,18 ^a	16,18 ± 0,19 ^b	20,32 ± 0,54 ^a	-
Lignina (L) (%)	20,53 ± 1,87 ^a	22,89 ± 0,67 ^a	19,03 ± 0,43 ^a	21,44 ± 1,67 ^a	-
Grau de biodegradabilidade (GB)	3,29 ^a	2,92 ^a	3,04 ^a	2,94 ^a	-

Legenda: BC: BC sem tratamento; HFSm: BC hidrolisado por fermentação submersa; HFSeq: BC hidrolisado por fermentação sequencial; HFES: BC hidrolisado por fermentação em estado sólido; LG: lodo granular; GB=(C+H)/L. Valores marcados com as mesmas letras na mesma linha não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O substrato BC apresentou teor de umidade de 35,79%, situando-se dentro da faixa ideal (35 e 65%) para a digestão anaeróbia (Alkaabi et al. 2009; Patil et al., 2017; Aromolaran et al., 2023). O teor de umidade da biomassa hidrolisada (HFES, HFSm, HFSeq) foi superior ao substrato BC, variando de 79,72 a 88,88%. A umidade é essencial para digestão anaeróbia, pois atua na dissolução e transporte de nutrientes para os micro-organismos assimilarem, além de auxiliar na manutenção do pH no sistema e atuar nas quatro etapas da digestão anaeróbia (Lay et al., 1997; Avinash e Mishra, 2023). Os substratos hidrolisados apresentaram umidade superior ao recomendado pela literatura devido aos processos de hidrólise utilizados como pré-tratamento, que aumentaram significativamente a umidade em relação ao BC. A condutividade elétrica está relacionada a quantidade de íons presentes no substrato. O excesso de íons pode ser um fator de inibição para os microrganismos anaeróbios as etapas da digestão anaeróbia e, portanto, diminuindo a produção de biogás.

O BC e os hidrolisados apresentaram um percentual de sólidos voláteis acima de 90%, indicando que maior parte constituinte no substrato lignocelulósico é de natureza orgânica. A quantidade de SV do substrato é uma estimativa de matéria orgânica que compõe o substrato. Singh et al. (2024), obtiveram um percentual de SV de 98,98% para o bagaço de cana-de-açúcar, enquanto Paranhos et al. (2020) relataram valor inferior de 81,00%. O inóculo anaeróbio obteve 64,23% em teor de SV, corroborando com os valores reportados por Dos Santos Filho et al. (2018).

Em relação a composição de fibras do substrato, o BC apresentou 45,81% em teor de celulose, 21,01% em hemicelulose e 20,53% em lignina, indicando ser um substrato lignocelulósico de difícil degradação pela elevada composição de lignina. Quanto a composição fibrosa do BC, resultados similares foram relatados por Paranhos et al. (2020) e Yamakawa et al. (2023) para celulose (38,5%-44,2%), hemicelulose (23,6%-25,10%) e lignina (25,8%-28,3%), respectivamente.

A composição de fibras dos substratos hidrolisados (HFES, HF_{Sm} e HF_{Seq}) não apresentaram diferença estatística significativa em termos de celulose e lignina quando comparada com o substrato sem pré-tratamento (BC). Isso pode ser explicado pela elevada composição da lignina, componente que atua como barreira física protegendo a cadeia celulósica de ataques microbianos e enzimáticos, dificultando a conversão deste polímero em açúcares mais simples (Huang et al., 2022). Apenas a fração hemicelulósica do bagaço hidrolisado por HF_{Sm} apresentou diferença significativa comparada ao BC, ou seja, as xilanases fúngicas produzidas durante o processo fermentativo submerso apresentaram maior atividade sobre a hemicelulose, reduzindo significativamente o teor de hemicelulose do substrato (16,18%), representando uma redução de 22,98%.

O BC sem pré-tratamento e os hidrolisados obtiveram baixo grau de biodegradabilidade, indicando ser um substrato recalcitrante mesmo após processo fermentativo de hidrólise

enzimática, devido a sua composição de fibras, principalmente a lignina. O grau GB indica se o resíduo é mais facilmente ou dificilmente degradável (Bareither et al., 2012). É importante enfatizar que a composição de fibras do bagaço varia de acordo com o processo ao qual a cana-de-açúcar foi submetida na indústria sucroalcooleira, além de ser influenciada por fatores como sazonalidade, condições climáticas e fertilidade do solo durante o plantio da monocultura.

3.2 Presença de hidrolases no pré-tratamento biológico

A Tabela 3 mostra a presença de hidrolases quantificadas através das atividades de endoglucanase (CMCase) e celulase total (FPase), e xilanases sob os diferentes pré-tratamentos biológicos (HFES, HFSm e HFSeq) por *Aspergillus japonicus* URM5242 utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

Tabela 3. Quantificação de celulasas e xilanases por diferentes processos de pré-tratamento biológico.

Tratamentos biológicos	CMCase (U/ml)	FPase (U/ml)	Xilanase (U/ml)
HFES	0,392 ± 0,013 ^a	0,189 ± 0,010 ^a	13,133 ± 0,303 ^b
HFSm	0,129 ± 0,008 ^c	0,020 ± 0,004 ^b	16,765 ± 0,015 ^a
HFSeq	0,209 ± 0,022 ^b	0,034 ± 0,022 ^b	5,231 ± 0,106 ^c

Legenda: HFES: hidrólise por fermentação em estado sólido; HFSm: hidrólise por fermentação submersa; HFSeq: hidrólise por Fermentação sequencial. Valores marcados com as mesmas letras na mesma coluna não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O tratamento biológico por HFES apresentou as maiores atividades enzimáticas em termos de atividade celulolítica, com valores de 0,392 U/mL para CMCase, 0,189 U/mL para FPase. Em comparação, os tratamentos por HFSeq e HFSm mostraram diferença significativa apenas na atividade de CMCase, apresentando 0,209 U/mL e 0,129 U/mL, respectivamente. Isso significa que os microrganismos filamentosos utilizaram o BC como principal fonte de carbono durante os processos biológicos, resultando na maior secreção de enzimas extracelulares como as

CMCase, que atuam na hidrólise das ligações β -1,4 glicosídicas internas da celulose de forma aleatória, possibilitando a degradação da biomassa lignocelulósica (Siqueira et al., 2020). Utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato e *Aspergillus japonicus* URM 5520 em processos fermentativos, Alves et al (2020) relataram atividade de CMCase de 0,066 U/mL e 0,540 U/mL para fermentação submersa e sequencial sob 72 horas de processo, respectivamente. Em relação à atividade de FPase, os mesmos autores identificaram uma atividade inferior em comparação com a CMCase, com valores de 0,003 U/mL para o processo fermentativo submerso e 0,190 U/mL na fermentação sequencial. Em cultivo submerso, utilizando BC e *Aspergillus flavus* KUB2, Namnuch et al. (2021) relataram atividade de 1,04 U/mL para CMCase e 0,21 U/mL para FPase. Geralmente, a quantificação da atividade de celulase total (FPase) é inferior quando comparada a CMCase devido a maior complexidade do substrato (papel filtro) utilizado na reação enzimática. O papel de filtro é um substrato semelhante ao polímero de celulose, apresentando características de alta cristalinidade, exigindo maior sinergia das enzimas do complexo celulolítico.

Microrganismos do gênero *Aspergillus* são comumente utilizados em bioprocessos em cultivos sólidos e submersos para produção de enzimas hidrolíticas como celulasas e xilanases em diferentes tipos de substratos lignocelulósicos (Cunha et al., 2012; Lin et al. 2017). Em contraste com a atividade celulolítica, a HFSm apresentou os melhores rendimentos em atividade de xilanase em comparação com a HFES e HFSeq, alcançando 16,765 U/mL. A diferença na atividade de xilanase foi significativa em todos os processos biológicos, indicando que parâmetros do cultivo submerso como tempo, aeração e granulometria do substrato influenciou na maior atividade de enzimas hemicelulolíticas. As xilanases hidrolisam a xilana, principal constituinte da hemicelulose, convertendo este polissacarídeo em açúcares C5 como a xilose e arabinose (Guler et al., 2023). Devido a elevada composição de hemicelulose (20 – 30%), o bagaço de cana-de-açúcar é um substrato interessante para produção de enzimas

hemicelulolíticas. Ferreira et al. (2018) obteve atividade de xilanase de 3,14 U/mL em cultivo líquido usando *Aspergillus japonicus* Saito. Sob cultivo submerso com BC, Cunha et al (2012) obteve 432 U/l (0,432 U/mL) e 714 U/l (0,714 U/mL) para atividade de endoglucanase e xilanase, respectivamente, através da cepa de *Aspergillus niger* A12. Ressalta-se que o objetivo do presente estudo foi a degradação do BC através de enzimas hidrolíticas (celulases e xilanases) secretadas pelo fungo filamentoso durante o pré-tratamento biológico, e não a produção de hidrolases, como nos estudos mencionados anteriormente.

3.3 Produção de biogás e metano

Em relação a produção de biogás e metano é possível observar na Figura 2 (a) que o BC apresentou maior volume acumulado de biogás (377 NmL) entre todas as configurações pré-tratadas, entretanto em termos de volume acumulado de CH₄ (44,4 NmL) foi a que apresentou pior resultado.

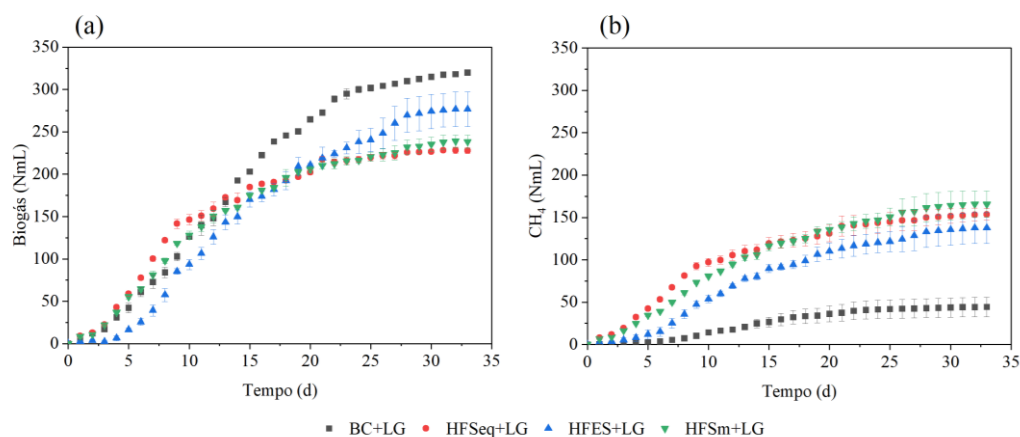


Figura 2. Volume acumulado de biogás (a) e metano (b) durante o ensaio BMP. BC: BC sem tratamento; HFSm: BC hidrolisado por fermentação submersa; HFSeq: BC hidrolisado por fermentação sequencial; HFES: BC hidrolisado por fermentação em estado sólido; LG: lodo granular.

A configuração HFSm+LG obteve o maior volume acumulado de CH₄ (166 NmL), seguido das configurações HFSeq+LG (154 NmL) e HFES+LG (138 NmL). O pré-tratamento biológico do bagaço de cana através das hidrólises em estado sólido, submersa e sequencial aumentaram

o volume de CH₄ (Figura 2b) devido provavelmente a produção de enzimas hidrolíticas como celulasas e xilanases, que atuam na etapa de hidrólise da celulose e hemicelulose, respectivamente, gerando açúcares simples C5 e C6 como xilose e glicose, por exemplo, que são facilmente convertidos a metano durante a digestão anaeróbia. Além disso, o pré-tratamento biológico proporciona a modificação da estrutura química do substrato, aumentando atividade microbiana devido a maior acessibilidade e biodegradabilidade do material (Da Silva et al., 2023).

3.4 Potencial de geração e taxa diária de geração de metano

Inicialmente, o processo de digestão anaeróbia ocorre através da degradação de compostos como carboidratos, proteínas e lipídios, assim, a taxa de produção de biogás é maior nas primeiras semanas de processo. Componentes de baixa biodegradabilidade como substratos lignocelulósicos são as últimas preferências para os micro-organismos. Dessa maneira, para degradação completa de compostos recalcitrantes é necessário maior tempo de biodegradação (Atelge et al., 2020a). As Fig. 3a, 3b, 3c e 3d mostram as configurações BC+LG, HF_{Sm}+LG, HF_{ES}+LG e HF_{Sm}+LG, respectivamente, o potencial de geração e a taxa diária de metano das diferentes configurações do teste BMP.

Nos gráficos da Figura 3 é possível verificar de forma mais clara a forte influência dos pré-tratamentos nas produções acumuladas de metano e nas taxas de geração diárias. O BC+LG apresentou o menor potencial de geração de metano (15 NmL/gSv) e baixa taxa de produção diária quando comparada aos BCs hidrolisados.

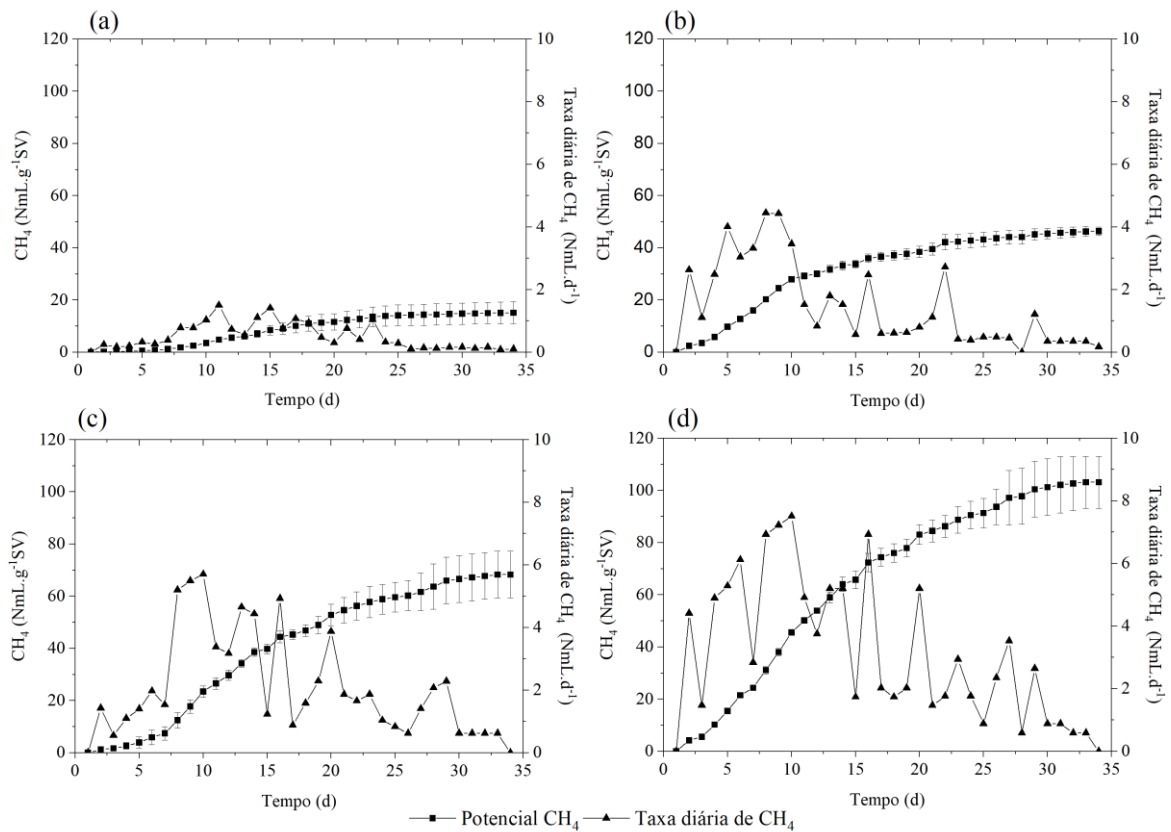


Figura 3. Potencial de geração de metano × Taxa diária de metano. (a) BC+LG, (b) HFSeq+LG, (c) HFES+LG e (d) HFESm+LG. BC: BC sem tratamento; HFESm: BC hidrolisado por fermentação submersa; HFSeq: BC hidrolisado por fermentação sequencial; HFES: BC hidrolisado por fermentação em estado sólido; LG: lodo granular.

Em termos de taxa diária, é possível observar na Figura 3 que as configurações hidrolisadas exibiram comportamento semelhantes nos picos de produção máxima de CH_4 , com destaque para HFESm, que apresentou 7,5 NmL/d no décimo dia de ensaio (Figura 3d).

A produção de biogás através da digestão anaeróbia de resíduos lignocelulósicos como o bagaço de cana, por exemplo, é dificultada devido as características recalcitrantes do substrato, sendo a etapa de hidrólise o fator limitante da digestão anaeróbia e, consequentemente, afetando diretamente ao potencial de geração de CH_4 (Atelge et al. 2020b; Edwiges et al., 2018). Resultados superiores de potencial geração de metano (32 NmL/ gSV) foram obtidos por Sumardiono et al (2017) ao estudarem a digestão de BC utilizando fluido ruminal bovino como inóculo durante um período de 80 dias em condições mesofílicas. Vats et al (2019) avaliaram a digestão do bagaço de cana com adição de resíduos de lodo ativado (inóculo) e obtiveram

potencial de metano de 34,7 NmL/gSV durante um tempo de retenção hidráulica de 30 dias. Esses valores superiores mencionados anteriormente podem estar relacionados ao tipo de inóculo utilizado na digestão anaeróbia, tempo de retenção hidráulica, bem como às características físico-química do bagaço de cana-de-açúcar.

O aumento significativo de 586,66% no potencial de geração metano (103,09 NmL.g⁻¹SV) ao utilizar o hidrolisado de bagaço de cana por HF_{Sm} com adição de LG pode ser atribuído à menor granulometria do substrato (<0,5 mm) utilizado no processo de hidrólise. A granulometria reduzida facilita o acesso dos microrganismos com o substrato e a homogeneização do meio, otimizando a degradação e, conseqüentemente, aumentando a produção de metano. Além disso, a maior presença de enzimas hemicelulolíticas neste processo biológico potencializam o aumento da biodisponibilidade de pentoses derivadas da hidrólise de polissacarídeos que compõem a hemicelulose, facilitando sua conversão na digestão anaeróbia. As outras configurações testadas, que utilizaram o BC hidrolisado por HF_{ES} e HF_{Seq} com adição de inóculo (LG), aumentaram o potencial de metano em 353,33% e 206,66%, respectivamente, em comparação com a configuração BC sem pré-tratamento. Apesar da maior atividade de CMCase (0,392 U/ml e 0,209 U/mL) e Fpase (0,189 U/mL e 0,034 U/mL) a partir bagaço de cana hidrolisado por HF_{ES} e HF_{Seq}, a granulometria maior do substrato pode ter dificultado o contato dos microrganismos com o substrato, limitando a área de superfície disponível para a ação microbiana (Singh et al., 2024), resultando em menor potencial de metano. Pérez-Barragán et al. (2024) também observaram um aumento de 106,07% no potencial de geração de metano (240,9 NmL/gSV) utilizando BC hidrolisado por enzimas comerciais (Celluclast®, Viscozyme®) em comparação ao BC sem tratamento (116,9 NmL/gSV), em testes BMP sob condições mesofílicas.

Vários estudos utilizam o BC hidrolisado por meio de tratamento biológico, como processos semissólidos, cultivos submersos e sequenciais para produção de enzimas como

celulases, xilanases, pectinases e biocombustíveis como etanol 2G. No entanto, não existem estudos que visem aumentar a produção de metano do BC por meio da digestão anaeróbia desses resíduos hidrolisados provenientes de pré-tratamentos biológicos.

A Figura 4 mostra a porcentagem de metano no biogás para cada configuração avaliada (BC+LG, HFES+LG, HFSm+LG, HFSeq+LG) ao longo de quatro medições distribuídas nos 35 dias de monitoramento.

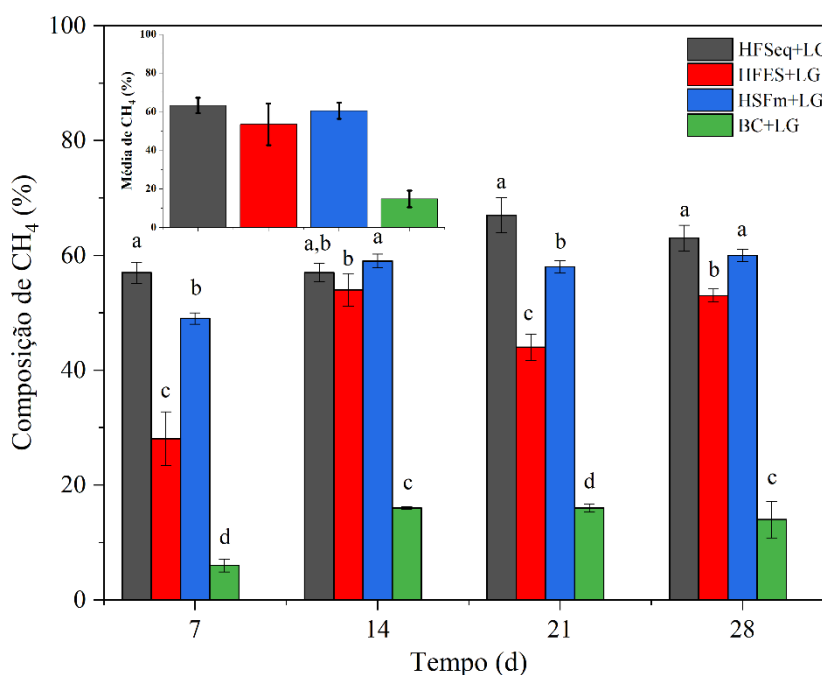


Figura 4. Porcentagem de metano no biogás e composição média de metano do ensaio de potencial bioquímico de metano. BC: BC sem tratamento; HFSm: BC hidrolisado por fermentação submersa; HFSeq: BC hidrolisado por fermentação sequencial; HFES: BC hidrolisado por fermentação em estado sólido; LG: lodo granular. Valores marcados com as mesmas letras não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Em termos de composição do biogás produzido pelo teste BMP, os substratos hidrolisados por HFSeq, HFSm e HFES com adição do inóculo LG apresentaram 63,21%, 60,45% 53,43, respectivamente, em relação a composição média de CH₄, comprovando a eficiência dos processos biológicos como pré-tratamento e sua influência na composição do biogás quando comparado com o BC que apresentou apenas 14,81% em metano (apesar da grande produção volumétrica de biogás).

Durante a segunda semana do teste BMP, as configurações HFSm+LG e HFSeq+LG não tiveram efeito significativo ($p < 0,05$) na composição de CH₄. O pico máximo de metano ocorreu na terceira semana de ensaio com a configuração HFSeq atingindo 69%, indicando uma maior atividade metanogênica provavelmente devido ao acúmulo de substratos derivados de etapas anteriores, que são convertidos em CH₄ na fase de metanogênese. Esse resultado representou um aumento de aproximadamente 319% em relação ao BC no mesmo período. Ghai et al (2023), realizaram sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar por meio de fermentação aeróbia utilizando *Burkholderia* sp. ISTR5, e relataram também uma maior concentração de metano ($\pm 80\%$) durante a terceira semana de digestão anaeróbia.

3.5 Modelos cinéticos

A Figura 5 mostra as curvas experimentais e previstas do potencial de metano aos modelos cinéticos de primeira ordem e Gompertz modificado. Entre os modelos cinéticos aplicados, o de primeira ordem considera a reação de hidrólise como fator limitante. Por outro lado, o modelo de Gompertz modificado considera a taxa de crescimento microbiano durante o processo até sua inibição total (Martin Juarez et al., 2018). Foi observado que o modelo de Gompertz obteve os melhores ajustes com os dados experimentais em todas as configurações experimentais testadas.

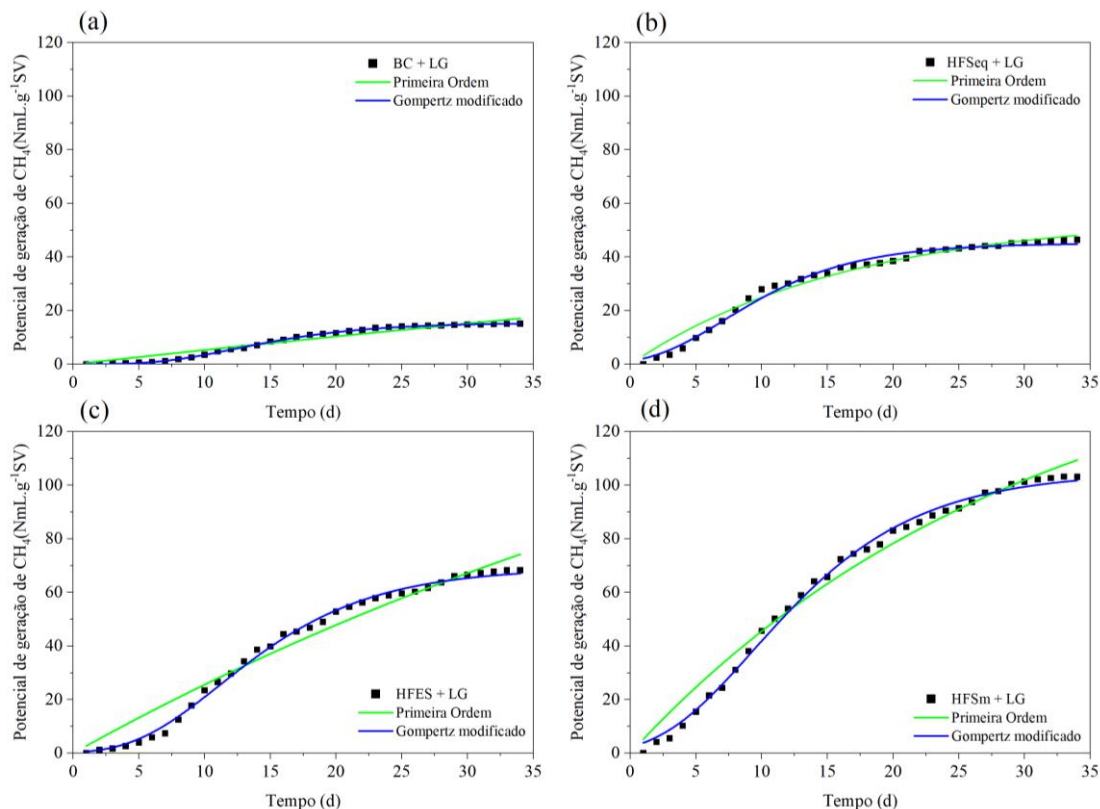


Figura 5. Produção de metano com aplicação de modelos cinéticos para predição matemática da produção de metano. BC: BC sem tratamento; HFESm: BC hidrolisado por fermentação submersa; HFSeq: BC hidrolisado por fermentação sequencial; HFES: BC hidrolisado por fermentação em estado sólido; LG: lodo granular.

A Tabela 4 apresenta que os valores do coeficiente de determinação (R^2) para as curvas do modelo de Gompertz modificado (0,98 a 0,99) foram maiores para todas as configurações experimentais. Além disso, os valores da soma residual dos quadrados (RSS) e os potenciais de metano (Bm) previstos foram menores e próximos aos dados experimentais, mostrando que, esse modelo foi o mais adequado para ajustar as curvas de potencial de metano para as condições estudadas. Os valores Bm previstos do modelo de primeira ordem apresentaram disparidade em comparação aos dados experimentais de BC+LG, HFES+LG e HFESm+LG.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos dos modelos de primeira ordem e Gompertz modificado.

Configuração	Modelo	<i>Bm</i> (NmL/gSV)	μ (NmL/d)	<i>k</i> (d ⁻¹)	λ (d)	RSS (NmL/gSV)	R ²
BC+LG	Experimental	15,00	-	-	-	-	-
	Primeira Ordem	121,78	-	0,004	-	69,48	0,93
	Gompertz	15,51	0,99	-	6,54	0,97	0,99
HFSeq+LG	Experimental	46,00	-	-	-	-	-
	Primeira Ordem	55,18	-	0,06	-	183,56	0,97
	Gompertz	45,16	2,99	-	1,66	70,77	0,98
HFES+LG	Experimental	68,00	-	-	-	-	-
	Primeira Ordem	19,38	-	0,01	-	780,95	0,95
	Gompertz	69,13	3,87	-	4,60	71,36	0,99
HFSm+LG	Experimental	103,00	-	-	-	-	-
	Primeira Ordem	162,67	-	0,03	-	766,33	0,97
	Gompertz	104,88	5,47	-	2,36	136,29	0,99

Legenda: BC: BC sem tratamento; HFSm: BC hidrolisado por fermentação submersa; HFSeq: BC hidrolisado por fermentação sequencial; HFES: BC hidrolisado por fermentação em estado sólido; LG: lodo granular; Bm: potencial de metano (NmL/gSV); *k*: constante de hidrólise (d⁻¹); μ : taxa máxima de produção de metano (NmL/d); λ : fase lag (d); RSS: soma residual dos quadrados; R²: coeficiente de determinação.

A constante de hidrólise (*k*) variou de 0,004 a 0,060 d⁻¹ para o modelo de primeira ordem. Observou-se que o *k* foi mais rápido nas configurações que continha o BC hidrolisado pelas fermentações HFSeq (0,060 d⁻¹) HFSm (0,032 d⁻¹) e HFES (0,013 d⁻¹) com adição do inóculo LG, mostrando que o pré-tratamento fúngico foi eficiente, acelerando a etapa de hidrólise em 155, 3,25 e 8 vezes, respectivamente.

Pode-se observar que fase lag foi reduzida do teste BMP que continha o BC hidrolisado por HFES, HFSm e HFSeq, ou seja, o tempo de adaptação dos microrganismos anaeróbios foi mais curto, favorecendo o aumento da taxa diária máxima de produção de metano (Tabela 3). O λ variou de 1,667 a 6,548 d para o modelo Gompertz modificado. Desta forma, a configuração HFSeq+LG apresentou a menor λ (1,667 d), ou seja, a produção de metano iniciou mais rápido, reduzindo o tempo para atingir a fase exponencial durante o processo (Morais et al., 2021).

Pérez-Barragan *et al.* (2024) reportam λ (0,3 d) mais rápido para BC hidrolisado por enzimas comerciais (Celluclast®, Viscozyme®). Em contraste, outros autores reportaram fase λ (17 a 18 d) mais lenta para digestão anaeróbia da mistura do bagaço de cana de açúcar, palha de arroz e palha de trigo com adição de esterco bovino (relação substrato inóculo 1,5) utilizando o modelo de Gompertz modificado (Meraj *et al.*, 2021).

A taxa diária máxima de produção de metano (μ) variou de 0,992 a 5,478 NmL/d para o modelo Gompertz modificado. As maiores taxa μ foram observadas nas configurações HFSm+LG (5,478 NmL/d) e HFES+LG (3,878 NmL/d), respectivamente, resultando em um maior volume acumulado de metano.

3.6 Caracterização inicial e final dos Teste BMP

A Tabela 5 mostra a caracterização inicial e final dos conteúdos reacionais do ensaio BMP das configurações estudadas. Os valores iniciais e finais médios de pH da maioria das configurações encontraram-se dentro da faixa ideal (6,4 a 7,5) para produção de metano (Deublein; Steinhauser, 2008). Paranhos *et al.* (2020) obtiveram pH inicial alcalino (9,02 a 9,06) e final neutro (7,6 -7,7) ao estudarem a digestão anaeróbia de BC utilizando esterco de aves (inóculo) testando diferentes relações de substrato/inóculo (0,5 a 4,0).

A condutividade elétrica (CE) em todas as configurações aumentou da condição inicial para final nos testes BMP, indicando que BC e os hidrolisados (HFSeq, HFES, HFSm) com adição do inóculo (LG) foram degradados por microrganismos anaeróbios (Santos *et al.*, 2022). Além disso, a CE final (5,87-6,53 mS/cm) dos testes BMP manteve-se dentro da faixa (2,9 a 7,7 mS/cm) recomendada por Alcantara (2007) para manutenção da etapa da metanogênese.

Tabela 5. Caracterização físico-química inicial e final do conteúdo reacional dos reatores do teste de potencial bioquímico de metano.

Parâmetro	LG	BC+LG	HFES+LG	HFSm+LG	HFSeq+LG
pH inicial	7,93 ± 0,02	7,67 ± 0,01	7,90 ± 0,02	7,50 ± 0,21	7,52 ± 0,01
pH final	7,60 ± 0,0	6,91 ± 0,07 ^a	6,81 ± 0,08 ^a	6,81 ± 0,03 ^a	6,83 ± 0,04 ^a
Condutividade inicial (mS/cm)	5,19 ± 0,22	5,24 ± 0,06	4,57 ± 0,19	2,52 ± 1,54	5,07 ± 0,57
Condutividade final (mS/cm)	6,53 ± 0,06	5,87 ± 0,37 ^a	6,34 ± 0,00 ^a	6,35 ± 0,02 ^a	6,22 ± 0,03 ^a
Alcalinidade total final (mgCaCO ₃ /L)	1787 ± 9,43	1245,4 ± 11,93 ^c	1870 ± 24,49 ^b	2030 ± 8,16 ^a	1840 ± 16,33 ^b
Ácido acético (mg/L) final*	44,32 ± 8,05	19,86 ± 7,28 ^d	112,46 ± 4,78 ^b	100,46 ± 2,91 ^c	230,67 ± 2,81 ^a
Ácido propiônico (mg/L) final*	113,19 ± 10,64	19,20 ± 2,82 ^d	70,30 ± 4,47 ^b	56,42 ± 0,70 ^c	143,75 ± 3,87 ^a
Ácido butírico (mg/L) final*	19,60 ± 9,83	4,35 ± 0,44 ^d	48,68 ± 3,09 ^b	48,91 ± 3,01 ^c	116,60 ± 2,04 ^a
AGV total (mg/L) *	177,11	43,41	231,44	205,79	491,02
AGV total*/AT	0,1	0,03	0,12	0,10	0,26

Legenda: BC: BC sem tratamento; HFSm: BC hidrolisado por fermentação submersa; HFSeq: BC hidrolisado por fermentação sequencial; HFES: BC hidrolisado por fermentação em estado sólido; LG: lodo granular. *: AGV total = Soma dos ácidos graxos voláteis. Valores marcados com as mesmas letras na mesma linha não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A alcalinidade total no sistema anaeróbio indica a capacidade de neutralização dos ácidos formados durante o processo, evitando a variação de pH e possível acidificação do conteúdo no biorreator. A alcalinidade total do BC sem tratamento, hidrolisados e inóculo LG variou de 1245,4 a 2030 mgCaCO₃/L estando dentro da faixa (1000 a 5000 mgCaCO₃/L) reportada por Tchobanoglous; Heisen e Vigil (1993) e Bajpai et al. (2017).

Entre as configurações hidrolisadas, a configuração HFSm+LG apresentou maior alcalinidade (2030 mgCaCO₃/L), que é de maior importância para a digestão anaeróbia, pois interfere diretamente na produção de metano. As demais configurações HFES+LG e

HFSeq+LG não apresentaram diferenças estatisticamente significativas e, em paralelo, obtiveram menor rendimento na produção de metano.

Em relação a composição final dos AGVS nos conteúdos reacionais ao final do ensaio BMP, foi possível observar que os principais AGVs como ácido acético, propiônico e butirico de todas as configurações testadas tiveram concentrações inferiores a 1g/L, valor ideal para fermentação anaeróbia de acordo com Guneratman et al (2017). As baixas concentrações ao final do teste indicam uma eficiente digestão anaeróbia até a etapa de metanogênese, sem acúmulo de ácidos graxos gerados nas etapas intermediárias. Entre os AGVs, o ácido acético é o principal produto intermediário da digestão anaeróbia. Este ácido é utilizado como substrato pelas arqueas metanogênicas acetoclásticas para produção de CH₄ na etapa de metanogênese (Sitthikitpanya et al. 2024). Sua baixa concentração é um bom indicativo que a etapa metanogênica não teve inibição, comum em resíduos lignocelulósicos, que por vezes têm o meio reacional acidificado.

As baixas concentrações dos ácidos propiônico e, principalmente, o ácido butirico, indicam que a digestão anaeróbia ocorreu com eficiência, visto que o acúmulo desses componentes é prejudicial para atividade metanogênica. A configuração BC+LG apresentou baixas concentrações de AGV, no entanto, o potencial bioquímico também foi o menor encontrado no teste BMP, devido a recalcitrância do substrato lignocelulósico, que dificultou as etapas da digestão anaeróbia como a hidrólise e, assim, menor concentração de produtos intermediários formados no processo como os AGVs. Substratos com estruturas mais complexas como resíduos lignocelulósicos são dificilmente degradadas devido ao alto teor lignina (Atelge et al., 2020b), que atua como uma barreira contra agentes hidrolíticos. Esses substratos com baixa biodegradabilidade interferem diretamente no potencial bioquímico de metano (Edwiges et al., 2018).

Sitthikitpanya et al. (2024) realizaram pré-hidrólise de palha de cana-de-açúcar (celulose 34,5%; hemicelulose 24,3%; lignina 20,1%) utilizando um consórcio microbiano para sacarificação do substrato lignocelulósico e aumentar a produção de metano. Sob tempo de retenção hidráulica de 40 dias, os autores relataram um comportamento similar em relação aos AGVs observado no presente trabalho, com concentrações de 410 mg/L, 110 mg/L e 20 mg/L para ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente.

A razão AGV/AT é uma indicação da capacidade de tamponamento que ocorre no sistema durante o processo de digestão anaeróbia. De acordo com Dareioti et al (2022), o valor máximo para essa razão é 0,6 para não ocorrer o acúmulo de AGVs e, conseqüentemente, a acidificação do processo. As configurações hidrolisadas HFES+LG e HFSm+LG, obtiveram a menor relação AGV/AT, apresentando 0,12 e 0,10, respectivamente, indicando estabilidade durante o processo de fermentação anaeróbia. Alinhado com esses resultados, as mesmas configurações obtiveram os maiores rendimentos do potencial de geração de metano comprovando uma maior eficiência da digestão anaeróbia.

4. Conclusão

Este estudo apresentou a influência de diferentes processos fermentativos utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus japonicus* URM5242 utilizado para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para melhoria da produção de metano verificada através do ensaio de potencial bioquímico de metano. A hidrólise por fermentação submersa (HFSm) otimizou em 586,66% o potencial de geração de metano em comparação com o BC sem tratamento. Os demais processos biológicos por hidrólise por fermentação em estado sólido (HFES) e fermentação sequencial (HFSeq) utilizados como pré-tratamento também otimizaram o potencial de metano, apresentando 353,33 e 206,66% respectivamente, comprovando a eficiência das hidrolases fúngicas produzidas pelo fungo na degradação da biomassa durante o

pré-tratamento. Além disso, os bioprocessos por HFSeq, HFSm e HFES melhoraram significativamente a composição média de biogás, alcançando concentrações de 63,21%, 60,45% e 53,23, respectivamente, em termos de metano, quando comparado a baixa concentração obtida no BC (14,81%).

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) (processo no. APQ-1560-5.03/22) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Brasil pelo apoio financeiro. Também agradecemos à Universidade Federal Rural de Pernambuco e à Universidade Federal de Pernambuco pela infraestrutura laboratorial.

Conflitos de interesses

Os autores não possuem interesses financeiros ou não financeiros a declarar.

Referências

ABNT, NBR 10.006. Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004.

ALCÂNTARA, P.B. Avaliação da Influência da Composição de Resíduos Sólidos Urbanos no Comportamento de Aterros Simulados. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Pernambuco. UFPE. Recife. 2007.

ALKAABI, Salem; VAN GEEL, Paul J.; WARITH, Mostafa A. Effect of saline water and sludge addition on biodegradation of municipal solid waste in bioreactor landfills. **Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy**, v. 27, n. 1, p. 59–69, 2009

ALVES, R. O.; DE OLIVEIRA, R. L.; SANTOS, A. F. de M. S.; PORTO, T. S. Produção de celulases por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 por diferentes processos fermentativos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. **Revista Geama**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 44–50, 2020.

AMBAYE, Teklit Gebregiorgis; VACCARI, Mentore; BONILLA-PETRICIOLET, Adrián; *et al.* Emerging technologies for biofuel production: A critical review on recent progress,

challenges and perspectives. **Journal of Environmental Management**, v. 290, p. 112627, 2021.

American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater. APWA; AWWA; 19° edition, Washington.

ANGELIDAKI, I.; ALVES, M.; BOLZONELLA, D.; *et al.* Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 5, p. 927–934, 2009.

AROMOLARAN, Adewale; SARTAJ, Majid. Enhancing biogas production from municipal solid waste through recirculation of blended leachate in simulated bioreactor landfills. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 4, p. 2797–2812, 2023.

ATELGE, M.R.; ATABANI, A.E.; BANU, J. Rajesh; *et al.* A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, v. 270, p. 117494, 2020a.

ATELGE, M. R.; KRISA, David; KUMAR, Gopalakrishnan; *et al.* Biogas Production from Organic Waste: Recent Progress and Perspectives. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 3, p. 1019–1040, 2020b.

AVINASH, Lagudu S.; MISHRA, Anumita. Enhancing biogas production in anaerobic digestion of MSW with addition of bio-solids and various moisture sources. **Fuel**, v. 354, p. 129414, 2023.

BAILEY, Michael J.; BIELY, Peter; POUTANEN, Kaisa. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BAJPAI, Pratima. Basics of Anaerobic Digestion Process. In: BAJPAI, Pratima (Ed.). **Anaerobic Technology in Pulp and Paper Industry**. Singapore: Springer Singapore, 2017, p. 7–12.

BAREITHER, Christopher A.; BENSON, Craig H.; EDIL, Tuncer B. Effects of Waste Composition and Decomposition on the Shear Strength of Municipal Solid Waste. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v. 138, n. 10, p. 1161–1174, 2012.

CALABRÒ, P.S.; PONTONI, L.; PORQUEDDU, I.; *et al.* Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: Preliminary batch results. **Waste Management**, v. 48, p. 440–447, 2016.

CAMARGO, Franciele P.; RABELO, Camila A.B.S.; DUARTE, Iolanda C.S.; *et al.* Biogas from lignocellulosic feedstock: A review on the main pretreatments, inocula and operational variables involved in anaerobic reactor efficiency. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 54, p. 20613–20632, 2023.

CAMARGO, Franciele Pereira; SAKAMOTO, Isabel Kimiko; DUARTE, Iolanda Cristina Silveira; *et al.* Influence of alkaline peroxide assisted and hydrothermal pretreatment on biodegradability and bio-hydrogen formation from citrus peel waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 41, p. 22888–22903, 2019.

CAMBERO, Claudia; SOWLATI, Taraneh; PAVEL, Mihai. Economic and life cycle environmental optimization of forest-based biorefinery supply chains for bioenergy and biofuel production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 107, p. 218–235, 2016.

CARVALHO, A.; FRAGOSO, R.; GOMINHO, J.; *et al.* Effect of Minimizing d-Limonene Compound on Anaerobic Co-digestion Feeding Mixtures to Improve Methane Yield. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 1, p. 75–83, 2019.

CAVALCANTE, Paula Acioly Wanderley; COÊLHO, Diego Freitas; SILVA, Cristina Ferraz; *et al.* Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulasas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, 2018.

CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. **Reatores anaeróbicos**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1997. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 5).

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra brasileira de cana-de-açúcar: 4º levantamento da Safra 2023/2024**, abril 2024. Brasília Companhia Nacional de Abastecimento. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso: 07 jun. 2024.

CUNHA, F.M.; ESPERANÇA, M.N.; ZANGIROLAMI, T.C.; *et al.* Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270–274, 2012.

DA SILVA, Anderson Felipe Viana; SANTOS, Liliana Andréa Dos; DE MELO, Allan Henrique Félix; *et al.* Use of Cellulase Obtained from Solid-State Fermentation of Orange and Passion Fruit Peels as an Enzymatic Pre-treatment Step for Anaerobic Digestion. **BioEnergy Research**, 2023.

DAREIOTI, Margarita A.; TSIGKOU, Konstantina; VAVOURAKI, Aikaterini I.; *et al.* Hydrogen and Methane Production from Anaerobic Co-Digestion of Sorghum and Cow Manure: Effect of pH and Hydraulic Retention Time. **Fermentation**, v. 8, n. 7, p. 304, 2022.

DEENA, Santhana Raj; VICKRAM, A.S.; MANIKANDAN, S.; *et al.* Enhanced biogas production from food waste and activated sludge using advanced techniques – A review. **Bioresource Technology**, v. 355, p. 127234, 2022.

DEUBLEIN, Dieter; STEINHAUSER, Angelika (Orgs.). **Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction**. 1. ed. [s.l.]: Wiley, 2008.

DOS SANTOS FILHO, Derovil Antonio; OLIVEIRA, Laís Roberta Galdino De; SCHIRMER, Waldir Nagel; *et al.* AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DA CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS SÓLIDOS ORGÂNICOS E GLICERINA RESIDUAL. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 3, n. 2, p. 260, 2018.

DUSSÁN, Kelly J.; JUSTO, Oselys Rodriguez; PEREZ, Victor Haber; *et al.* Bioethanol Production From Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate by Immobilized *S. shehatae* in a Fluidized Bed Fermenter Under Magnetic Field. **BioEnergy Research**, v. 12, n. 2, p. 338–346, 2019.

EDWIGES, Thiago; FRARE, Laercio; MAYER, Bruna; *et al.* Influence of chemical composition on biochemical methane potential of fruit and vegetable waste. **Waste Management**, v. 71, p. 618–625, 2018.

FERREIRA, Flaviane Lopes; DALL’ANTONIA, Cesar Barretta; SHIGA, Emerson Andrade; *et al.* Sugarcane bagasse as a source of carbon for enzyme production by filamentous fungi1. **Hoehnea**, v. 45, n. 1, p. 134–142, 2018.

GHAH, Manan Kaur; KHATRI, Annu; THAKUR, Indu Shekhar. Utilization of *Burkholderia* sp. ISTR5 for enhanced saccharification and fermentation of agricultural waste for production

and upgradation of biogas by calcite-based bio-composite materials. **Bioresource Technology Reports**, v. 24, p. 101608, 2023.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268.

GOUVEIA, Ester Ribeiro; NASCIMENTO, Renata Trajano Do; SOUTO-MAIOR, Ana Maria; *et al.* Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

GÜLER, Fatma; ÖZÇELİK, Filiz. Screening of xylanase producing *Bacillus* species and optimization of xylanase process parameters in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 51, p. 102801, 2023.

GUNERATNAM, Amita Jacob; XIA, Ao; MURPHY, Jerry D. Comparative study of single- and two-stage fermentation of the brown seaweed *Laminaria digitata*. **Energy Conversion and Management**, v. 148, p. 405–412, 2017.

HANSEN, Trine L.; SCHMIDT, Jens Ejbye; ANGELIDAKI, Irini; *et al.* Method for determination of methane potentials of solid organic waste. **Waste Management**, v. 24, n. 4, p. 393–400, 2004.

HE, Yongjin; ZHANG, Bingbing; GUO, Shuai; *et al.* Sustainable biodiesel production from the green microalgae *Nannochloropsis*: Novel integrated processes from cultivation to enzyme-assisted extraction and ethanolysis of lipids. **Energy Conversion and Management**, v. 209, p. 112618, 2020.

HOSSEINI KOUPEAE, E.; DAHADHA, S.; BAZYAR LAKEH, A.A.; *et al.* Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. **Journal of Environmental Management**, v. 233, p. 774–784, 2019.

HUANG, L. Z. *et al.* “Recent Developments and Applications of Hemicellulose From Wheat Straw: A Review”. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, p. 440, 2021.

IBRAHIM, M. Abu-Reesh. Kinetics of anaerobic digestion of labaneh whey in a batch reactor. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 16, p. 1745–1755, 2014.

IVANOVA, L. K.; RICHARDS, D. J.; SMALLMAN, D. J. The long-term settlement of landfill waste. **Proceedings of the Institution of Civil Engineers - Waste and Resource Management**, v. 161, n. 3, p. 121–133, 2008.

KLICH, M. A. **Identification of common Aspergillus species**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 116p. 2002.

KYAWT, Yin Yin; AUNG, Min; XU, Yao; *et al.* Methane production and lignocellulosic degradation of wastes from rice, corn and sugarcane by natural anaerobic fungi-methanogens co-culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 4, p. 109, 2024.

LAY, Jiunn-Jyi; LI, Yu-You; NOIKE, Tatsuya. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. **Water Research**, v. 31, n. 6, p. 1518–1524, 1997.

LIN, Chaoyang; SHEN, Zhicheng; QIN, Wensheng. Characterization of Xylanase and Cellulase Produced by a Newly Isolated *Aspergillus fumigatus* N2 and Its Efficient Saccharification of Barley Straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 2, p. 559–569, 2017.

- MARTÍN JUÁREZ, Judit; RIOL PASTOR, Elena; FERNÁNDEZ SEVILLA, José M.; *et al.* Effect of pretreatments on biogas production from microalgae biomass grown in pig manure treatment plants. **Bioresource Technology**, v. 257, p. 30–38, 2018.
- MERAJ, Saadia; LIAQUAT, Rabia; RAZA NAQVI, Salman; *et al.* Enhanced Methane Production from Anaerobic Co-Digestion of Wheat Straw Rice Straw and Sugarcane Bagasse: A Kinetic Analysis. **Applied Sciences**, v. 11, n. 13, p. 6069, 2021.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MOHANTY, Anee; MANKOTI, Megha; ROUT, Prangya Ranjan *et al.* Sustainable utilization of food waste for bioenergy production: A step towards circular bioeconomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 365, p. 109538, 2022.
- MORAIS, Naassom Wagner Sales; COELHO, Milena Maciel Holanda; SILVA, Amanda De Sousa E; *et al.* Biochemical potential evaluation and kinetic modeling of methane production from six agro-industrial wastewaters in mixed culture. **Environmental Pollution**, v. 280, p. 116876, 2021.
- NAMNUCH, Nattida; THAMMASITTIRONG, Anon; THAMMASITTIRONG, Sutticha Naranong. Lignocellulose hydrolytic enzymes production by *Aspergillus flavus* KUB2 using submerged fermentation of sugarcane bagasse waste. **Mycology**, v. 12, n. 2, p. 119–127, 2021.
- PARANHOS, Aline Gomes De Oliveira; ADARME, Oscar Fernando Herrera; BARRETO, Gabriela Fernandes; *et al.* Methane production by co-digestion of poultry manure and lignocellulosic biomass: Kinetic and energy assessment. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122588, 2020.
- PATIL, Bhagwan Shamrao; C, Agnes Anto; SINGH, Devendra Narain. Simulation of municipal solid waste degradation in aerobic and anaerobic bioreactor landfills. **Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy**, v. 35, n. 3, p. 301–312, 2017.
- PÉREZ-BARRAGÁN, Jacobo; GARCÍA-DEPRAECT, Octavio; MAYA-YESCAS, Rafael; *et al.* Solid and liquid fractionation of sugarcane and Agave bagasse during ozonolysis and enzymatic hydrolysis: Impact on biohydrogen and biogas production. **Industrial Crops and Products**, v. 210, p. 118175, 2024.
- PRASAD, Shiv; YADAV, Krishna Kumar; KUMAR, Sandeep; *et al.* Review on biofuel production: Sustainable development scenario, environment, and climate change perspectives – A sustainable approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, n. 2, p. 111996, 2024.
- RANJITHKUMAR, Moorthy; UTHANDI, Sivakumar; SENTHIL KUMAR, P.; *et al.* Highly crystalline cotton spinning wastes utilization: Pretreatment, optimized hydrolysis and fermentation using *Pleurotus florida* for bioethanol production. **Fuel**, v. 308, p. 122052, 2022.
- SANTOS, Liliana Andréa Dos; SILVA, Thayná Habeck Lúcio; OLIVEIRA, Carolinni Roberta De Melo; *et al.* Silage as a pre-treatment of orange bagasse waste to increase the potential for methane generation. **Science of The Total Environment**, v. 823, p. 153613, 2022.
- SANTOS, Liliana Andréa Dos; VALENÇA, Rebeca Beltrão; SILVA, Leandro César Santos Da; *et al.* Methane generation potential through anaerobic digestion of fruit waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 256, p. 120389, 2020.

- SENGER, Clóvis C.D.; KOZLOSKI, Gilberto V.; BONNECARRÈRE SANCHEZ, Luis M.; *et al.* Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, n. 1–2, p. 169–174, 2008.
- SHAHI, Taher; BEHESHTI, Babak; ZENOUI, Ali; *et al.* Bio-oil production from residual biomass of microalgae after lipid extraction: The case of *Dunaliella* Sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101494, 2020.
- SHARMA, Gaurav; KAUR, Baljit; RAHEJA, Yashika; *et al.* Lignocellulolytic enzymes from *Aspergillus allahabadii* for efficient bioconversion of rice straw into fermentable sugars and biogas. **Bioresource Technology**, v. 360, p. 127507, 2022.
- SHARMILA, V. Godvin; SHANMUGAVEL, Surya Prakash; BANU, J. Rajesh. A review on emerging technologies and machine learning approaches for sustainable production of biofuel from biomass waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 180, p. 106997, 2024.
- SILVA, A.F.V.; SANTOS, L.A.; VALENÇA, R.B.; *et al.* Cellulase production to obtain biogas from passion fruit (*Passiflora edulis*) peel waste hydrolysate. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 6, p. 103510, 2019.
- SINGH, Prakash; DOGRA, Pallavi; KALAMDHAD, Ajay S. Sugarcane bagasse and cow dung pelletization in varied food-to-microorganism ratios for biogas generation. **Industrial Crops and Products**, v. 210, p. 118120, 2024.
- SIQUEIRA, Joyce Gueiros Wanderley; RODRIGUES, Cristine; VANDENBERGHE, Luciana Porto De Souza; *et al.* Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105419, 2020.
- SITTHIKITPANYA, Napapat; PONUANSRI, Chaweewan; JOMNONKHAOW, Umarin; *et al.* Unlocking the potential of sugarcane leaf waste for sustainable methane production: Insights from microbial pre-hydrolysis and reactor optimization. **Heliyon**, v. 10, n. 3, p. e25787, 2024.
- STERNBERG, D; MANDELS, G R. Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose: induction of cellulase and repression of beta-glucosidase. **Journal of Bacteriology**, v. 144, n. 3, p. 1197–1199, 1980.
- SU, Haifeng; TAN, Furong; XU, Yuanjian. Enhancement of biogas and methanization of citrus waste via biodegradation pretreatment and subsequent optimized fermentation. **Fuel**, v. 181, p. 843–851, 2016.
- SUMARDIONO, Siswo; BUDI RIYANTA, Aldi; HAWALI ABDUL MATIN, Hashfi; *et al.* Increasing biogas production from sugar cane bagasse by anaerobic co-digestion with animal manure. **MATEC Web of Conferences**, v. 101, p. 02014, 2017.
- TRAMONTINA, Robson; SCOPEL, Eupídio; BRENELLI, Lívia; *et al.* Applying biorefinery concepts for sugarcane straw upcycling using alkaline and enzymatic treatments to produce value-added compounds and bioenergy. **Biomass and Bioenergy**, v. 178, p. 106972, 2023.
- TCHOBANOGLIOUS, George; THEISEN, Hilary; VIGIL, Samuel (Ed.). **Integrated solid waste management: engineering principles and management issues**. 1993.
- VALENÇA, Rebeca Beltrão; SANTOS, Liliana Andréa Dos; FIRMO, Alessandra Lee Barbosa; *et al.* Influence of sodium bicarbonate (NaHCO_3) on the methane generation potential of organic food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 317, p. 128390, 2021.

VATS, Neelam; KHAN, Abid Ali; AHMAD, Kafeel. Effect of substrate ratio on biogas yield for anaerobic co-digestion of fruit vegetable waste & sugarcane bagasse. **Environmental Technology & Innovation**, v. 13, p. 331–339, 2019.

WANG, Jing; MA, Dongmei; LOU, Yu; *et al.* Optimization of biogas production from straw wastes by different pretreatments: Progress, challenges, and prospects. **Science of The Total Environment**, v. 905, p. 166992, 2023.

WHO (1978). International reference center for waste disposal. Methods of Analysis of sewage sludge solid wastes compost Switzerland.

YADAV, Aditya; SHARMA, Vishal; TSAI, Mei-Ling; *et al.* Development of lignocellulosic biorefineries for the sustainable production of biofuels: Towards circular bioeconomy. **Bioresource Technology**, v. 381, p. 129145, 2023.

YAMAKAWA, Celina K.; ROJAS, Sebastian T.; HERRERA, William E.; *et al.* Recovery and characterization of cellulosic ethanol from fermentation of sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 196, p. 568–576, 2023.

ZHANG, Yingdi; ZHANG, Lei; YU, Najiaowa; *et al.* Enhancing the resistance to H₂S toxicity during anaerobic digestion of low-strength wastewater through granular activated carbon (GAC) addition. **Journal of Hazardous Materials**, v. 430, p. 128473, 2022.

ZHENG, Yi; ZHAO, Jia; XU, Fuqing; *et al.* Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35–53, 2014.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho avaliou a eficiência dos diferentes processos biológicos utilizados como pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para otimizar a produção de metano. O uso do fungo filamentoso *Aspergillus japonicus* URM5242 através dos bioprocessos em estado sólido, submerso e sequencial resultou em aumentos percentuais significativos na produção de metano, apresentando 586,66% (103 NmL), 353,33% (68 NmL) e 206,66% (46 NmL), respectivamente, em relação ao bagaço sem pré-tratamento (15 NmL).

Além disso, constatou a importância da atuação das celulasas e xilanases fúngicas como biocatalisadores da biomassa lignocelulósica. Essas enzimas tornam os polissacarídeos da estrutura lignocelulósica mais suscetíveis a digestão anaeróbica e, consequentemente, otimizando a produção de biogás com maior teor de metano. O biogás produzido pelo bagaço hidrolisado por fermentação sequencial apresentou composição média de metano de 63,21%, seguido das fermentações submersa e estado sólido, que apresentaram 60,45% e 53,43%, respectivamente, enquanto o bagaço sem pré-tratamento resultou em apenas 14,81%.

Sendo assim, os resultados obtidos contribuem para o desenvolvimento de novos trabalhos para produção de biogás utilizando pré-tratamento biológico, uma vez que ainda são escassas as pesquisas sobre esta rota tecnológica. Ademais, ressalta-se a importância do progresso de novas tecnologias e metodologias para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para produção de biocombustíveis, através de patentes verdes e artigos científicos, desponta como uma alternativa promissora para enfrentar a demanda energética global. Esse progresso tem potencial para conduzir a indústria sucroalcooleira em direção a bioeconomia circular e a transição energética de baixo carbono.