

**VIABILIDADE TÉCNICA DA REMOÇÃO DE INIBIDORES DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR PROCESSO DE LAVAGEM EM BIORREFINARIAS**A. S. S. Pinto<sup>1,\*</sup>, M. P. A. Ribeiro<sup>1</sup>, R. C. Giordano<sup>1</sup>, C. S. Farinas<sup>2</sup><sup>1</sup> *Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, 13565-905, Caixa postal 676, São Carlos, SP*<sup>2</sup> *Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro 1452, 13560-970, São Carlos, SP*\* *Autor correspondente, e-mail: ariane\_sbrice@hotmail.com*

**Resumo:** A implementação do processo de conversão em larga escala da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e outros bioprodutos em biorrefinarias ainda apresenta desafios tecnológicos, especialmente aqueles relacionados ao processo de pré-tratamento, no qual inibidores das reações bioquímicas subsequentes são liberados, com destaque para os compostos fenólicos e furaldeídos. A lavagem do bagaço de cana-de-açúcar hidrotérmico pode ser utilizada como estratégia mitigadora do efeito negativo dos inibidores solúveis durante reações bioquímicas na produção de etanol de segunda geração (2G). Entretanto, ainda não há uma análise técnica das condições deste processo nesta aplicação. Neste sentido, o escopo deste trabalho foi avaliar diferentes protocolos de lavagem e seu impacto nas reações bioquímicas de conversão da celulose em bioetanol. Resultados preliminares mostraram que a lavagem sob condições brandas apresentou ganhos positivos no rendimento tanto na hidrólise enzimática quanto na fermentação. A melhora progressiva da conversão da hidrólise foi constatada a medida que houve aumento da remoção de inibidores. No entanto, condições extremas de operação, ou seja, água de lavagem ou agitação em excesso, impediram a catálise enzimática. As conclusões iniciais mostram que a avaliação técnica do processo de lavagem é crucial para o projeto do processo de lavagem na produção de etanol 2G na indústria.

**Palavras-chave:** Lavagem, Remoção de Inibidores, Compostos Fenólicos, Furaldeídos, Etanol de Segunda Geração (2G).

**TECHNICAL FEASIBILITY OF SOLUBLE INHIBITORS REMOVAL FROM THE SUGARCANE BAGASSE BY WASHING PROCESSES IN BIOREFINERIES**

**Abstract:** The implementation of large-scale conversion process of lignocellulosic biomass into biofuels and other bioproducts still presents technological challenges, especially those related to the pre-treatment process, in which inhibitors of the subsequent biochemical reactions are released, highlighting both phenolic and furaldehydes compounds. Washing the hydrothermally sugarcane bagasse could be used to mitigate the negative effect of soluble inhibitors during biochemical reactions in second generation (2G) of ethanol production. Nevertheless, an investigation of operations conditions still unclear. In this context, the scope of the present work was to evaluate different protocols of washing through their impact on conversion of cellulose to ethanol during biochemical reactions. Preliminary results elucidate that washed biomass with soft operation conditions presented positive gains in both enzymatic hydrolysis and fermentation yields. Progressive improvement of hydrolysis conversion was observed by increasing inhibitors removal during washing. However, extreme procedure conditions, in other words, high amounts of wash liquor either agitation, led to none enzyme catalysis. The initial conclusions ensure that technical evaluation of washing process is crucial for process design of washing step in 2G ethanol production for industrial sites.

**Keywords:** Washing, Inhibitors Removal, Phenolic Compounds, Furaldehydes, Ethanol of Second Generation (2G).

## 1. Introdução

Implementar o processo de conversão em larga escala da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e outros bioprodutos ainda apresenta desafios tecnológicos, principalmente aqueles relacionados à etapa de pré-tratamento. Nesta etapa, frequentemente, há a liberação de quantidades elevadas de inibidores das reações bioquímicas subsequentes, com destaque para os compostos fenólicos e furaldeídos. Em biorrefinarias, estratégias para mitigar e/ou bloquear o efeito negativo dos inibidores liberados na etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico são essenciais para a minimização dos custos atrelados à reposição de enzimas utilizadas na hidrólise dos carboidratos e à baixa eficiência da fermentação na produção do bioetanol. A reconfiguração de processos a partir da implementação de técnicas de pré-tratamento, detoxificação de inibidores solúveis ou emprego de agentes atenuadores/ bloqueadores da lignina insolúvel são alguns exemplos de estratégias sugeridas para contribuir para a viabilidade das biorrefinarias com produção de primeira e segunda geração integradas (1G-2G) (Kim, 2018).

A remoção de inibidores solúveis presentes na biomassa por lavagem, por exemplo, é uma estratégia para mitigar o efeito de inibição nas enzimas e também na levedura *S. cerevisiae* durante a hidrólise enzimática e fermentação alcoólica, respectivamente. Atuar na preparação da biomassa inserindo a etapa de lavagem a quente ( $80^{\circ}\text{C} < \text{Temperatura} < 90^{\circ}\text{C}$ ) do material lignocelulósico após o pré-tratamento resultou no dobro de eficiência da sacarificação na hidrólise enzimática em estudos realizados por Kim *et al.* (2009). A mesma estratégia levou à alta solubilização de inibidores, como os fenólicos e furaldeídos, no licor da lavagem a quente da biomassa pré-tratada por explosão a vapor (Kim *et al.*, 2013). Apesar de haver diferentes opções de rotas de processo para solucionar o efeito negativo da presença de inibidores nos bioprocessos envolvidos na produção do etanol 2G (Li e Zheng; Kim, 2018), ainda não há estudos que forneçam métricas para discriminar quais rotas de processo seriam mais adequadas do ponto de vista técnico do processo de lavagem no âmbito industrial.

Neste sentido, a avaliação da viabilidade técnica de diferentes condições de operação do processo de lavagem torna-se crucial para a futura aplicação na indústria desta etapa durante a produção de etanol 2G. A fim de estabelecer a condição de operação da lavagem responsável pelo maior aumento na eficiência das reações bioquímicas durante a produção de etanol 2G, dois processos de lavagem foram comparados. O impacto nos rendimentos de hidrólise enzimática e fermentação devido à remoção da lignina solúvel da biomassa foi avaliado para condições de lavagem brandas e severas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Processos da Produção de Etanol 2G

#### 2.1.1. Pré-tratamento e Lavagem

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (Ipiranga Agroindustrial, Unidade Descalvado - SP, Brasil) foi seco até, aproximadamente, 10% de umidade ( $T \sim 30^{\circ}\text{C}$ ), moído no moinho de facas e, em seguida, peneirada, resultando em partículas com diâmetro inferior a 2 mm (peneira de 10 Mesh). O pré-tratamento hidrotérmico do bagaço foi realizado no reator de 5L da *Parr Instruments* (Modelo 4580) por 10 minutos, a  $195^{\circ}\text{C}$  e 15% de sólidos de bagaço de cana-de-açúcar seco (m:m). Ao final, a fração líquida foi separada por filtração simples.

A biomassa foi lavada em bateladas a  $90^{\circ}\text{C}$  após o processo de filtração. Condições extremas de lavagem foram consideradas no primeiro protocolo (LAV.<sup>1</sup>): cada estágio durou 10 minutos sob agitação de 10.000 rpm, totalizando 7 etapas com 3% de sólidos por etapa, garantindo a estabilização do pH do filtrado. Já para o segundo protocolo (LAV.<sup>2</sup>), consideraram-se condições de lavagem amenas: homogeneização por tempo inferior a 1 minuto, 10% sólidos em cada um dos 3 estágios de lavagem. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 2.1.2. Hidrólise Enzimática

Na etapa de hidrólise foram testados a celulose comercial (Solka Floc<sup>®</sup>), o bagaço tratado

hidrotermicamente e o bagaço tratado e lavado. Triplicatas de experimentos foram conduzidas em agitador orbital por 24h a 200 rpm, 50°C, 15% sólidos (m:m) e 10 FPU de Cellic<sup>®</sup> CTec2 (Novozymes) por grama de bagaço seco no tampão citrato de sódio (50 mM, pH=5,0). A atividade do extrato enzimático comercial utilizado foi de 230 FPU/ mL (Ghose, 1987; Sluiter *et al.*, 2008).

### 2.1.3. Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica foi realizada a 34°C, 250 rpm e 10 g/L (base seca) de levedura *S. cerevisiae* em erlenmeyers com 45 mL de meio reacional (Fleischmann<sup>®</sup>, Brasil) (Sonogo *et al.*, 2014).

A performance da produção de etanol a partir das biomassas lavadas foram comparadas com a não lavada calculando-se a produtividade volumétrica (P) pela razão entre a concentração final de etanol (g/L) e o tempo total (h).

## 2.2. Caracterização da Fração Líquida

Após filtração (0,20µm), os açúcares redutores totais (ART) foram quantificados pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). A quantificação de lignina solúvel em pH ácido (LSA) baseou-se no protocolo do “National Renewable Energy Laboratory (USA)” com absorbância medida no comprimento de onda de 240 nm (Espectrofotômetro *Thermo Fisher Scientific*, modelo Genesys 10-S) e absortividade padrão ( $\epsilon$ ) igual a 25 L/(g.cm) (Sluiter *et al.*, 2008). A quantificação de glicose (GLI) e etanol (EtOH) foram realizadas por HPLC-RID ( Sluiter *et al.*, 2008). Utilizou-se a coluna Rezex<sup>™</sup> ROA-Organic Acid (H<sup>+</sup> 8%) (Phenomenex<sup>®</sup>, 300 cm x 7,8 mm) na temperatura de 60 °C com detector de índice de refração (Refractive Index Detector, RID). Fase móvel isocrática de ácido sulfúrico 5mM. O tempo de retenção considerado foi de 35 minutos. A vazão da coluna foi mantida constante em 0,6 mL/min. Após a aquisição dos dados, considerou-se o equilíbrio de 10 min. Os componentes químicos utilizados como padrões foram comprados da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

## 3. Resultados e Discussão

Ambos os protocolos de lavagem foram eficientes na remoção de inibidores solúveis do bagaço hidrotérmico. A remoção dos inibidores totais, representado pela lignina solúvel (LSA), e dos açúcares redutores totais (ART) está apresentada nos balanços de massa de cada etapa de lavagem da Figura 1.

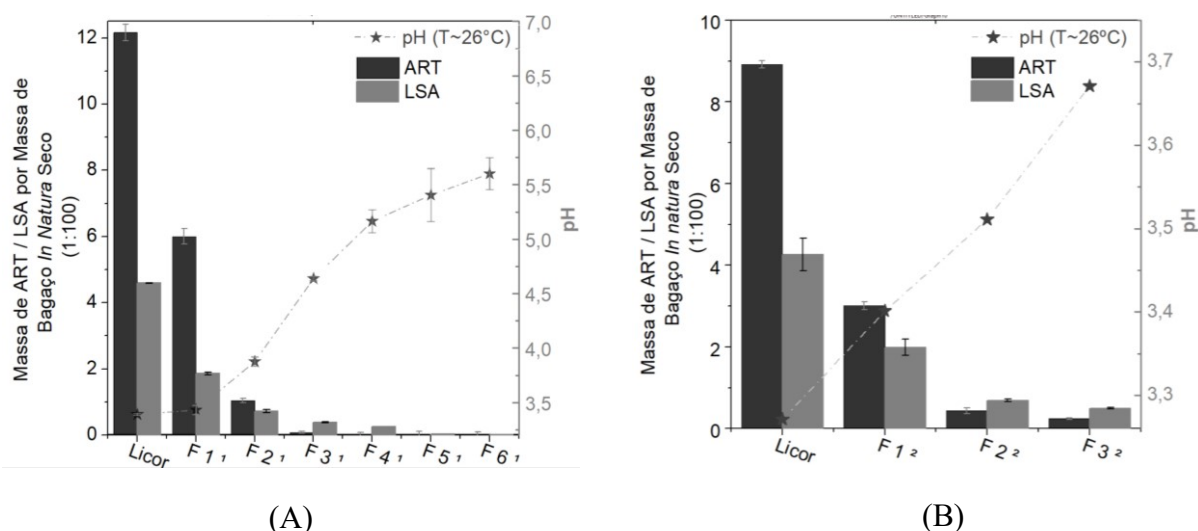


Figura 1. Composição mássica dos filtrados (F<sub>i</sub> LAV. “1” ou “2”) nas etapas (i) de lavagem na abordagem 1 (A) e 2 (B)

(Base de Cálculo: g: 100 g de bagaço in natura no início do processo).

Após o processo de lavagem a biomassa foi hidrolisada por enzimas para liberação dos açúcares solúveis. Embora a LAV.<sup>1</sup> tenha removido a totalidade de inibidores ao final do sexto estágio (Figura 1 –A), este processo levou ao bloqueio da catálise enzimática mesmo em condições de hidrólise sob menor carga de sólidos e/ou maior concentração de enzimas. A causa deste efeito pode estar relacionada com mudanças na morfologia da biomassa durante a lavagem (Espírito Santo *et al.*, 2018).

Já o segundo protocolo de lavagem (LAV.<sup>2</sup>) além de remover os inibidores, impactou positivamente na hidrólise enzimática. Os perfis temporais da concentração de glicose e etanol foram aferidos para o hidrolisado advindo da lavagem do bagaço de cana-de-açúcar com máxima remoção de inibidores solúveis (LAV.<sup>2</sup> com 3 estágios). Os resultados foram apresentados na Figura 2.

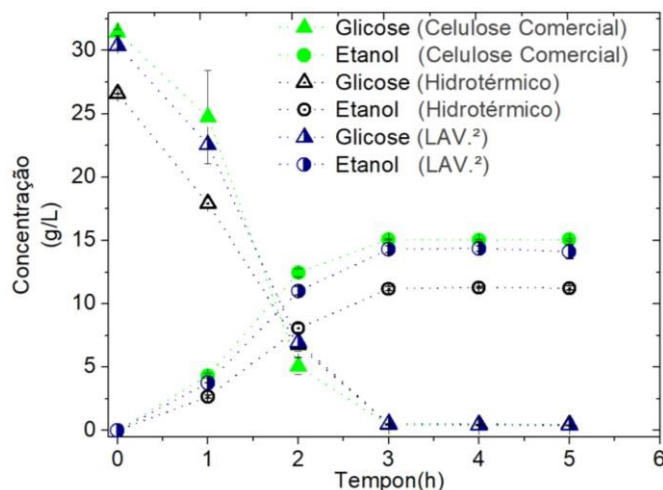


Figura 2. Perfil temporal do consumo de glicose e formação de etanol na fermentação com *S. cerevisiae* para o hidrolisado da celulose comercial, bem como do bagaço hidrotérmico lavado (LAV.<sup>2</sup> com 3 estágios) e não lavado.

Já a taxa de produção de etanol teve um aumento ainda mais significativo, chegando a ~22% ao considerar o bagaço lavado sob condições amenas (LAV.<sup>2</sup>,  $P=2,82$  g/L.h) em relação ao não lavado ( $P=2,20$  g/L.h). O aumento de 22% na produtividade foi consequência direta do ganho na conversão de hidrólise do bagaço lavado. Este efeito pode ser decisivo na viabilidade econômica da biorrefinaria integrada para produção de etanol de primeira e segunda geração (1G-2G) (Longati *et al.*, 2018). Assim sendo, o processo de lavagem da biomassa torna-se uma opção de rota factível tecnicamente com impacto positivo notável na produção do bioetanol.

#### 4. Conclusões

A otimização da produção de etanol 2G a partir das condições de operação adequadas do processo de lavagem é crucial para viabilizar a remoção eficaz de inibidores solúveis com ganho nas conversões de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica, visto que estas podem impactar positiva ou negativamente na conversão global do processo em biorrefinarias 1G-2G.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (PPGEQ-UFSCar), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (processo 2017/21173-1), e também pelo apoio financeiro das agências de fomento FAPESP (processo temático 2016/10636-8, BIOEN), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, código de financiamento 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 140906/2017-7).

**Referências**

- ESPIRITO SANTO, M. et al. Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 64-74, 2018/03/01/ 2018. ISSN 0926-6690. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669018300153> >.
- KIM, D. Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 309, 2018. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/2/309> >.
- KIM, Y. et al. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. **Bioresour Technol**, v. 135, 2013// 2013.
- LI, X.; ZHENG, Y. Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. n. 1873-1899 (Electronic),
- LONGATI, A. A. et al. Defining research & development process targets through retro-techno-economic analysis: The sugarcane biorefinery case. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 1-9, 2018/09/01/ 2018. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418306254> >.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959/03/01 1959. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/ac60147a030> >.
- SLUITER, A. et al. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass** National Renewable Energy Laboratory. USA. 2008