

## MITIGAÇÃO DO IMPACTO NEGATIVO DE INIBIDORES NA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO EM BIORREFINARIAS POR PROCESSO DE LAVAGEM CONCOMITANTE COM A ADIÇÃO DE PROTEÍNA DE SOJA

A. S. S. Pinto<sup>1,\*</sup>, M. G. Brondi<sup>1</sup>, J. V. de Freitas<sup>2</sup>, M. P. A. Ribeiro<sup>1</sup>, R. C. Giordano<sup>1</sup>,  
C. S. Farinas<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, 13565-905, CP 676, São Carlos, SP

<sup>2</sup> Instituto Federal de São Paulo – Campus São Carlos, Estrada Municipal Paulo Eduardo de Almeida Prado, 13565-820, São Carlos - SP, - São Carlos, SP

<sup>3</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 ou adição de proteínas de sacrifício são exemplos de estratégias implementadas para mitigar o efeito negativo de inibidores solúveis e da pseudo-lignina nas reações bioquímicas envolvidas na produção de etanol de segunda geração (2G). Todavia, ainda não há uma análise técnica que contemple a configuração dos processos utilizando a lavagem concomitantemente com proteínas de sacrifício. Neste sentido, o escopo deste trabalho foi avaliar o impacto nas reações bioquímicas de conversão da celulose em glicose com esses diferentes protocolos de mitigação de inibidores solúveis e insolúveis. Os resultados mostraram que tanto a adição de proteína de soja como a lavagem apresentaram ganhos positivos paralelos no rendimento da hidrólise quando analisados separadamente. Os impactos positivos da mitigação no rendimento de glicose foram somados, chegando a ganhos de, aproximadamente, 50%, quando a lavagem do bagaço hidrotérmico foi associada à adição de proteína de soja na hidrólise enzimática.

**Palavras-chave:** Lavagem do Bagaço, Remoção de Inibidores Solúveis, Proteína de Soja, Pseudo-lignina, Etanol de Segunda Geração (2G).

### **MITIGATION OF THE NEGATIVE IMPACT OF INHIBITORS ON THE PRODUCTION OF CELLULOSIC ETHANOL IN BIORFINERIES BY WASHING PROCESS ASSOCIATED WITH THE ADDITION OF SOYBEAN PROTEIN**

**Abstract:** The implementation of the 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 hydrothermal sugarcane bagasse or soybean protein addition in enzymatic hydrolysis could be used to mitigate the negative effect of soluble inhibitors and insoluble pseudo-lignin during biochemical reactions in the second generation (2G) of ethanol production. However, up to now, there is none study of the technical viability of association of washing process and sacrificial protein addition in enzymatic hydrolysis. Then, the main scope of this work was to investigate different protocols of soluble inhibitors and insoluble pseudo-lignin mitigation and their impact on cellulose conversion to glucose in enzymatic hydrolysis. The glucose produced after bagasse washing was the same for the hydrothermal bagasse in buffer with protein. This means that either bagasse wash and soybean protein addition promotes parallel impact on final yields of glucose. Impressively, washing hydrothermal sugarcane bagasse associated with soybean protein addition resulted in glucose yields improvements around 50% with a supplement of both mitigation effects.

**Keywords:** Wash of Bagasse, Soluble Inhibitors Removal, Soybean Protein, Pseudo-lignin, 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 ( $80\text{ °C} < \text{Temperatura} < 90\text{ °C}$ ) 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). Por outro lado, de acordo com a literatura, a utilização da proteína de soja resultou em ganhos na conversão da celulose durante a hidrólise de, no mínimo, 33%, quando o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a diferentes condições de hidrólise e de pré-tratamento (BRONDI *et al.*, 2019; FLORENCIO *et al.*, 2019). Ademais, Florencio *et al.* (2019) reportaram um ganho máximo de aproximadamente 76% quando 12% (m/m) de proteína de soja foi empregada durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana hidrotérmico, utilizando 5 FPU/g do coquetel enzimático comercial Cellic CTec2<sup>®</sup>. 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 (KIM, 2018; LI e ZHENG, 2017), ainda não há estudos que comparem a mitigação de inibidores solúveis e insolúveis no processo de produção do etanol celulósico.

Assim, a avaliação da viabilidade técnica da aplicação da lavagem concomitante com a adição de proteínas de sacrifício torna-se crucial para a futura aplicação na indústria de produção de etanol 2G. Além do efeito sinérgico dos processos de mitigação, o impacto do processo de lavagem a quente e da adição de proteína de soja na hidrólise enzimática nos rendimentos de glicose foram comparados com solubilização do bagaço hidrotérmico sem nenhum pós-processamento.

## 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 ( $T \sim 30\text{ °C}$ ), 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 inglês, *Liquid Hot Water*) do bagaço foi realizado no reator de 5L da *Parr Instruments* (Modelo 4580) por 10 minutos, a  $195\text{ °C}$  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 hidrotérmica (LHW) foi lavada em bateladas a  $90\text{ °C}$  após o processo de filtração. Na lavagem consideraram-se a mistura da biomassa à água com homogeneização por tempo inferior a 1 minuto, 10% sólidos para 3 estágios de lavagem (PINTO *et al.*, 2019). Os experimentos de pré-tratamento e lavagem foram realizados em triplicata.

### 2.1.2. Hidrólise Enzimática e Adição de Proteína de Sacrifício

Na etapa de hidrólise foram testados a celulose comercial (Solka Flock<sup>®</sup>), o bagaço hidrotérmico e o bagaço hidrotérmico lavado. Triplicatas de experimentos foram conduzidas em agitador orbital por 48h 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).

Utilizou-se a concentração de 12% de proteína de soja por grama de bagaço pré-tratado (m/m) (proteína isolada com teor proteico  $\geq 90\%$ , Bremil<sup>®</sup>, Brasil) de acordo com a metodologia descrita por (FLORENCIO *et al.*, 2019).

## 2.2 Impacto na Hidrólise Enzimática com os Processos de Mitigação de Inibidores

### 2.2.1. Quantificação de Glicose

A quantificação de glicose no hidrolisado foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de acordo com o protocolo do “National Renewable Energy Laboratory (USA)” {Sluiter, 2008, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass ;Pinto, 2019, Viabilidade técnica da remoção de inibidores do bagaço de cana-de-açúcar por processo de lavagem em biorrefinarias.}.

### 2.2.2. Ganho no Rendimento de Hidrólise

A fim avaliar o impacto dos processos de mitigação na hidrólise enzimática, calculou-se o ganho de hidrólise. Este parâmetro refere-se ao aumento percentual do rendimento de glicose observado para cada processo de mitigação em relação ao bagaço hidrotérmico não lavado.

## 3. Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra o perfil temporal de glicose (g/L) durante a hidrólise enzimática para a produção de etanol 2G, sendo o bagaço hidrotérmico o controle dos tratamentos. Os resultados mostram que há ganhos significativos com a mitigação de inibidores solúveis e insolúveis.

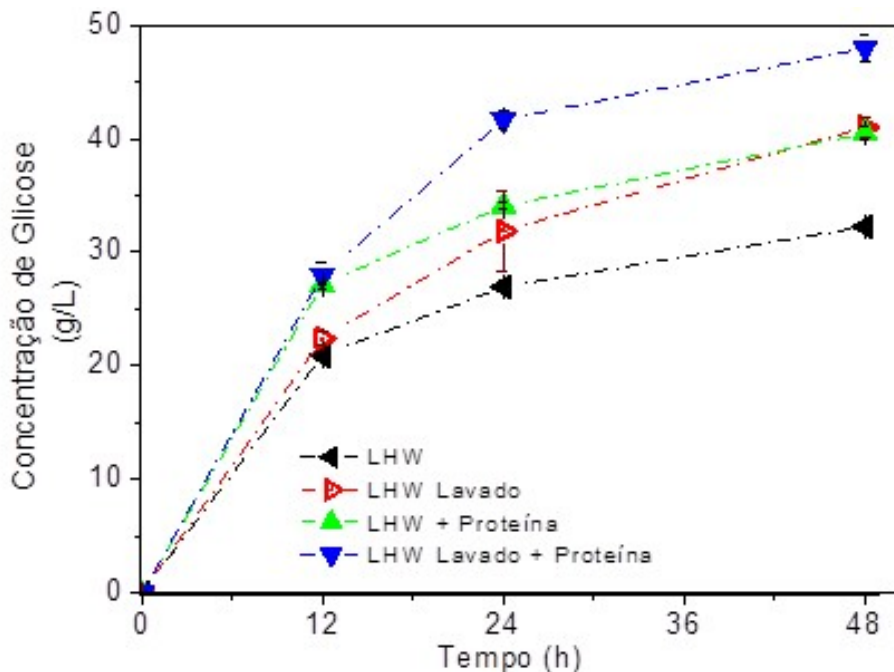


Figura 3. Perfil temporal para a concentração de glicose durante a hidrólise enzimática (15% sol., de 0h - 48h, 10 FPU/g de bagaço seco, 12% de proteína de sacrifício (massa de proteína de soja/massa de bagaço hidrotérmico seco).

O perfil temporal de concentração de glicose mostra que nas primeiras 12 h de hidrólise é notável uma tendência de aumento para o bagaço hidrotérmico com a adição da proteína comparado ao controle (34%). A concentração de glicose igual a 41,77 g/L no tempo de 24h superou aquelas obtidas somente por meio da lavagem, 31,88 g/L, ou com a adição da proteína de sacrifício, 34,10 g/L. Para tempos superiores a 24 h verifica-se que tanto o efeito da proteína de sacrifício quanto da lavagem da biomassa foram equivalentes, com ganho médio de, aproximadamente, 26% no máximo tempo de hidrólise (Figura 1). Em contrapartida, a mitigação de inibidores por lavagem concomitantemente com a proteína de sacrifício levou a ganhos de conversão na hidrólise de, aproximadamente, 50 % no tempo de 48h.

#### 4. Conclusões

Os ganhos positivos nas conversões de hidrólise pela mitigação de inibidores tanto pelo processo de lavagem quanto pela adição de proteína de sacrifício são promissores e devem ser avaliados paralelamente à análise de custos com consumo de utilidades, água e proteína de sacrifício nos processos envolvidos na biorrefinaria 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 das bolsas de mestrado e doutorado (processos 2017/13931-3 e 2017/21173-1, respectivamente), 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, processos 140906/2017-7 e 141303/2019-0).

#### Referências

- BRONDI, M. G.; VASCONCELLOS, V. M.; GIORDANO, R. C.; FARINAS, C. S. Alternative Low-Cost Additives to Improve the Saccharification of Lignocellulosic Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 461-473, 2019.
- FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Addition of Soybean Protein Improves Saccharification and Ethanol Production from Hydrothermally Pretreated Sugarcane Bagasse. **BioEnergy Research**. 2019.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- KIM, D. Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. **Molecules**, 23, n. 2, p. 309, 2018.
- KIM, Y.; KREKE, T.; HENDRICKSON, R.; PARENTI, J. LADISH, M. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. **Bioresour Technol**, 135, 30-38, 2013.
- LI, X.; ZHENG, Y. Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. **Biotechnology Advances**. 35, 466-489, 2017.
- PINTO, A. S. S.; RIBEIRO, M. P. A.; GIORDANO, R. C.; FARINAS, C. S. Viabilidade técnica da remoção de inibidores do bagaço de cana-de-açúcar por processo de lavagem em biorrefinarias. **Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária**, 2019.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory**. USA. 2008.