

**BIOMASSA FÚNGICA COMO BIOADSORVENTE PARA A REMOÇÃO DE COMPOSTOS INIBIDORES DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL 2G**M. B. M. Ribeiro<sup>1,2,\*</sup>, C. S. Farinas<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro 1452, 13560-970, São Carlos, SP, Brasil<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brasil

\* Autor correspondente, e-mail: marinabmaluf@gmail.com

**Resumo:** No processamento da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias podem ser gerados compostos que atuam como inibidores das etapas subsequentes. Dentre os inibidores, os compostos fenólicos originados da degradação da lignina podem inibir ou desativar as enzimas durante a reação de hidrólise, impactando o rendimento global do processo. Dessa forma, novas estratégias que contribuam para diminuir o impacto negativo destes inibidores se fazem necessárias para viabilizar as futuras biorrefinarias. Neste contexto, uma potencial estratégia é o uso de biomassa microbiana como um bioadsorvente de baixo custo para a remoção dos compostos fenólicos gerados na etapa de pré-tratamento, o qual é o objetivo deste trabalho. O cultivo do fungo foi feito a fim de obter a biomassa microbiana e três tipos de biomassa de *A. niger* pré-tratadas e moídas foram utilizadas como bioadsorventes. Testes preliminares com amostras sintéticas de vanilina (monômero) e ácido tânico (oligômero) mostraram uma remoção de 90% de ácido tânico para a biomassa tratada com solução básica, enquanto que para a vanilina a afinidade foi menor, com uma remoção de 23%. Ainda assim, a biomassa microbiana demonstrou um grande potencial para remoção de inibidores presentes no licor do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Bioadsorção, Compostos fenólicos, *Aspergillus niger*, Biorrefinaria.

***FUNGAL BIOMASS AS BIOSORBENT TO REMOVE INHIBITORS OF THE ETHANOL 2G PRODUCTION PROCESS***

**Abstract:** The pretreatment process of lignocellulosic biomass in biorefineries can release compounds that act as inhibitors of the further steps. Among the inhibitors, the phenolic compounds originated from lignin degradation can inhibit the enzymes during the hydrolysis reaction, impacting the overall yield of the process. Therefore, new strategies that contribute to mitigate the negative effect of these inhibitors are necessary to enable the viability of future biorefineries. In this context, a potential strategy is the use of microbial biomass as a low-cost biosorbent for the removal of the phenolic compounds generated in the pretreatment stage, which is the aim of this work. The *Aspergillus niger* cultivation was made to obtain the microbial biomass and three types of treatments were used to prepare the biosorbent for phenolic compounds removal. Preliminary adsorption results with synthetic samples of vanillin and tanic acid showed a 90% removal of tanic acid by the biomass treated with basic solution while the affinity was lower for vanillin, with a removal of up to 23%. These positive findings towards biosorption of phenolics compounds suggests that the fungal biomass can be a good alternative for the removal of the inhibitors present in the pretreatment liquor of the sugarcane bagasse.

**Keywords:** Biosorption, Phenolic compounds, *Aspergillus niger*, Biorefinery.

**1. Introdução**

O rápido crescimento da população humana e o conseqüente crescimento da demanda por alimentos, energia e água são e irão continuar sendo grandes desafios para o mundo nas próximas décadas. Nesse contexto desafiador, as biorrefinarias tem o potencial de suprir boa parte dessa demanda de energia e insumos para diversos setores industriais de forma ambientalmente sustentável (CHANDEL et al., 2018).

No processamento da biomassa vegetal lignocelulósica nas biorrefinarias para a produção de etanol de segunda geração (2G) e outros bioprodutos é necessária uma etapa de pré-tratamento a fim de romper a estrutura recalcitrante da parede celular vegetal e aumentar a acessibilidade das enzimas durante o processo de conversão dos polissacarídeos em açúcares simples. No entanto, nessa etapa de pré-tratamento também são gerados compostos inibidores que prejudicam as reações bioquímicas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica à medida que os polissacarídeos e a lignina vão sendo degradados (MES-HARTREE; SADDLER, 1983; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; MOSIER et al., 2005; KO et al., 2015). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de estratégias para minimizar o impacto negativo dos compostos inibidores, de modo a melhorar o rendimento global das biorrefinarias.

Uma potencial estratégia é a utilização de biomassa microbiana como adsorvente, processo este chamado também de bioadsorção. Estudos de bioadsorção de compostos fenólicos e metais pesados de efluentes industriais já demonstraram a viabilidade da aplicação da biomassa microbiana tanto de bactérias como de fungos como adsorvente (KAPOOR et al., 1999; RAO; VIRARAGHAVAN, 2002; MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009; SHROFF; VAIDYA, 2011; JAVANBAKHT et al., 2014). Assim, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar o uso da biomassa microbiana de *Aspergillus niger* como bioadsorvente para a remoção dos compostos fenólicos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa vegetal em biorrefinarias.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Obtenção dos bioadsorventes

A linhagem de fungos filamentosos *Aspergillus niger* C (BRMCTAA 82) foi obtida a partir da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Os esporos mantidos em congelador a -18 °C, foram ativados em placa petri contendo meio batata ágar dextrose (PDA) 39 g/L, por 96 h a 30 °C. A biomassa de *A. niger* foi cultivada por fermentação submersa por 5 dias a 220 rpm e 30 °C. O fungo foi inoculado a uma concentração de  $1,2 \cdot 10^7$  esporos/mL e o meio de cultivo utilizado foi composto de: dextrose anidra (20 g/L), peptona de soja (10 g/L) e extrato de levedura (3 g/L) (RAO; VIRARAGHAVAN, 2002). Após o período de tempo, a biomassa obtida foi filtrada e lavada com água deionizada, e então foi sujeita a três tipos de pré-tratamento:

- Autoclavada por 30 minutos a 121 °C e 124 kPa
- Imersa em solução de ácido sulfúrico 0,1 M por 1 h, e então autoclavada por 30 min
- Imersa em solução de hidróxido de sódio 0,1 M por 1 h, e então autoclavada por 30 min

Os tratamentos também foram baseados na metodologia de Rao e Viraraghavan (2002). As biomassas obtidas após os tratamentos foram secas em estufa a 60 °C por 36 horas e, posteriormente, moídas até serem obtidas partículas menores que 300 µm para serem usadas como bioadsorventes.

### 2.2. Ensaios de adsorção

Foram realizados testes preliminares com amostras sintéticas de vanilina, um monômero, e ácido tânico, um oligômero, de modo a analisar o comportamento da adsorção de compostos fenólicos pelos bioadsorventes. Estes compostos estão entre os fenólicos gerados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica e são grandes inibidores de enzimas (MALGAS et al., 2016; XIMENES et al., 2010; QIN et al., 2016). Também foram realizados os ensaios com a fração líquida proveniente do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar.

Todos os ensaios foram conduzidos em batelada por 24 h, em estufa que possui um eixo rotatório (360°) na posição horizontal, promovendo a mistura das amostras durante o processo. A rotação utilizada nos experimentos foi de 30 rpm. Após cada experimento, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante separado para a leitura dos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

### 2.3. Caracterização morfológica

As características morfológicas da superfície do bioadsorvente foram caracterizadas através de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram obtidas imagens antes e depois do contato da biomassa com a solução de ácido tânico.

### 3. Resultados e Discussão

Para 5% de carga de adsorvente em tampão pH 3 para as soluções de amostras sintéticas e pH original do licor, que é próximo de 3, os resultados em porcentagem de remoção de fenólicos estão apresentados na Figura 1. Em relação a todos os compostos estudados, a biomassa que se mostrou mais eficiente na adsorção foi a tratada com hidróxido de sódio. O ácido tânico demonstrou uma grande afinidade pela biomassa, com uma remoção de 90%. Para a vanilina a afinidade foi menor, com uma remoção de 22%. Em relação aos fenólicos totais presentes na fração líquida proveniente do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar, a biomassa foi capaz de remover mais de 30% desses inibidores. Propriedades físicas e químicas desses compostos estão, possivelmente, contribuindo para essa diferença nas capacidades de adsorção de cada um.

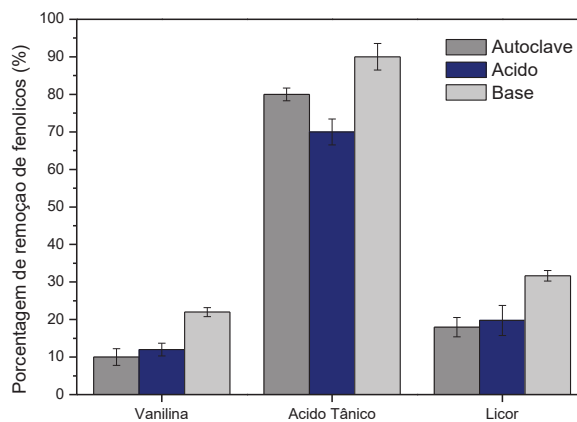


Figura 1. Porcentagem de remoção de vanilina, ácido tânico e fenólicos totais do licor para 5% de carga de adsorvente.

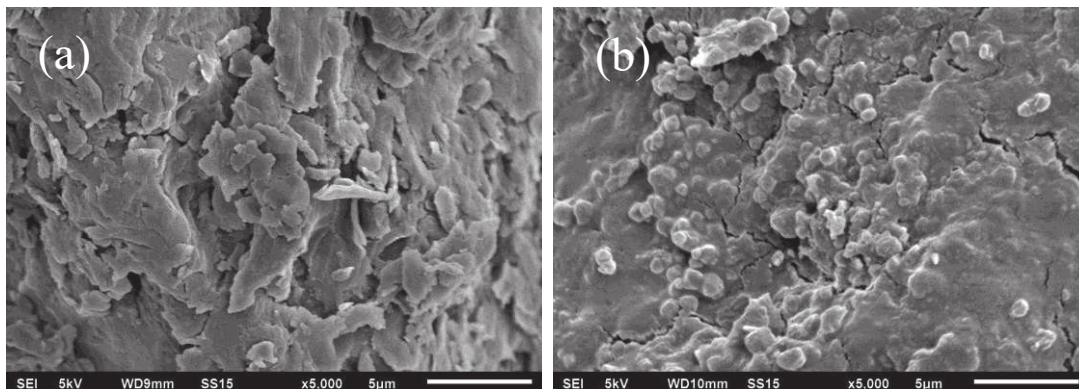


Figura 2. Imagens de microscopia da biomassa tratada com base, antes e após a adsorção de ácido tânico.

Foram feitas imagens da biomassa tratada com solução básica após a adsorção de ácido tânico, a fim de observar as mudanças na morfologia da superfície do adsorvente após o contato com a solução. Em comparação com a Figura 2 (a), a Figura 2 (b) mostra claramente as mudanças na superfície da biomassa de fungo devido as interações ocorridas entre as moléculas de ácido tânico e o bioadsorvente. A superfície sofreu uma deformação, se tornando menos rugosa. Este fenômeno provavelmente ocorreu devido a ligação de moléculas de ácido tânico aos grupos funcionais presentes na parede celular da biomassa, propiciando a deformação física de sua

superfície. Resultados similares de deformação da superfície da biomassa após a adsorção foram encontrados por outros autores (SHROFF; VAIDYA, 2012; HERRUTINER et al., 2011; TUNALI et al., 2005).

#### 4. Conclusões

A remoção dos compostos inibidores presentes no licor do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias é importante para o aumento do rendimento global do processo. A biomassa microbiana de *A. niger* demonstrou ter potencial para ser aplicada como bioadsorvente na remoção desses compostos, com uma capacidade de adsorção de mais de 30% dos fenólicos inibidores. O bioadsorvente obtido através do tratamento com solução básica se mostrou com maior capacidade de adsorção dos compostos, e o ácido tânico o composto com maior afinidade pelos bioadsorventes, com uma remoção de 90%.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento FAPESP (processos 2016/10.636-8 e 2018/20.292-0), CAPES e CNPq pelo apoio financeiro, e as instituições Universidade Federal de São Carlos e Embrapa Instrumentação pelo suporte para o desenvolvimento do projeto.

#### Referências

- CHANDEL, A. K. et al. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*, v. 264, n. June, p. 370–381, 2018.
- HERRUTINER, Y. E. et al. Caracterización de la biomasa inactiva de *Aspergillus niger* o-5 como sorbente de PB (II). *Quimica Nova*, v. 34, n. 7, p. 1141–1146, 2011.
- KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T. & CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* v. 70, p. 95–104, 1999.
- KO, J. K. et al. Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, n. 2, p. 252–262, 2015.
- MALGAS, S. et al. The inhibitory effects of various substrate pre-treatment by-products and wash liquors on mannanolytic enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 123, p. 132–140, 2016.
- MATHIALAGAN, T., VIRARAGHAVAN, T. 2006. Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 549-558, 2009.
- MES-HARTREE, M.; SADDLER, J. N. The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology Letters*, v. 5, n. 8, p. 531-536, 1983.
- MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.
- QIN, L. et al. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnology for Biofuels*, v. 9, n. 70, 2016.
- RAO, J. R.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass. *Bioresource Technology*, v. 85, n. 2, p. 165–171, 2002.
- SHROFF, K. A. & VAIDYA, V. K. Effect of pre-treatments on the biosorption of chromium (VI) ions by the dead biomass of *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* v. 87, p. 294–304, 2011.
- TUNALI, S., KIRAN I., AKAR, T. Chromium (VI) biosorption characteristics of *Neurospora crassa* fungal biomass. *Minerals Engineering*, v. 18, p. 681-689, 2005.
- XIMENES, E. et al. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 3–4, p. 170-176, 2010.