

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MARIANA GOVONI BRONDI

**PROTEÍNA DE SOJA COMO ADITIVO NA SACARIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA DA BIOMASSA VEGETAL:
DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE TECNO-ECONÔMICA DO
PROCESSO**

São Carlos - SP

2019

**PROTEÍNA DE SOJA COMO ADITIVO NA SACARIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA DA BIOMASSA VEGETAL:
DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE TECNO-ECONÔMICA DO
PROCESSO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Mariana Govoni Brondi

**PROTEÍNA DE SOJA COMO ADITIVO NA SACARIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA DA BIOMASSA VEGETAL: DESENVOLVIMENTO E
ANÁLISE TECNO-ECONÔMICA DO PROCESSO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Dra. Cristiane Sanchez Farinas (Embrapa Instrumentação / PPGEQ-UFSCar)

Coorientador: Dr. Roberto de Campos Giordano (LaDABio/DEQ-UFSCar)

São Carlos – SP

2019

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MARIANA GOVONI BRONDI APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 28 DE FEVEREIRO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:



Cristiane Sanchez Farinas
Orientadora, EMBRAPA/UFSCar



Felipe Fernando Furlan
UFSCar



Marcel Otávio Cerri
UNESP

*Dedico este trabalho aos meus pais, Silvia e Humberto,
ao meu noivo, Witor, à minha irmã, Leticia
e aos meus avós, Silvio e Helena (in memoriam),
por todo o apoio, carinho, compreensão
e amizade incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida maravilhosa, repleta de amor, oportunidades, conquistas e aprendizados.

Aos meus pais, minha irmã, meus avós (*in memoriam*) e meu noivo por todo o amor, apoio, carinho, ensinamentos e conversas. Vocês são meus exemplos de vida e inspiração.

À minha orientadora, Dra. Cristiane, pela orientação, oportunidade, ensinamentos, profissionalismo e por tornar este trabalho possível.

Ao professor Roberto Giordano, pelo apoio para a realização do trabalho.

Aos amigos do grupo de Agroenergia, em especial a Ariane, Camila, Juliana, Marina, Monique, Paula, Thalita, Thamara e Vanessa, por todas as conversas, paciência e apoio.

À Vanessa por toda a ajuda no começo deste estudo.

Ao Andrew e o professor Felipe por toda a ajuda com o EMSO.

À Embrapa Instrumentação pelo apoio institucional e infraestrutura para a realização do projeto.

Aos analistas e técnicos da Embrapa que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de mestrado e por todo o apoio financeiro (processo n° 2017/13931-3 e 2016/10636-8).

Ao PPG-EQ/UFSCar, ao CNPQ e à CAPES (Código de Financiamento 001) pelo apoio institucional e financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A implantação do processo de conversão bioquímica da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e outros bioprodutos ainda apresenta alguns desafios tecnológicos, tais como o baixo rendimento da etapa de hidrólise enzimática e o alto custo das enzimas celulolíticas. Dentre as estratégias para aumentar a eficiência das reações de sacarificação enzimática da biomassa, o uso de aditivos tem mostrado efeitos bastante positivos, uma vez que estes diminuem a adsorção improdutiva das celulasas na lignina, reduzindo a perda de atividade enzimática durante o processo. No entanto, o uso de aditivos de baixo custo se faz necessário para que o processo se viabilize economicamente. Assim, o presente estudo avaliou o uso de proteína de soja como aditivo para a redução da adsorção improdutiva de enzimas durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. A fim de se atingir tal objetivo, inicialmente utilizou-se o planejamento experimental estatístico como ferramenta para otimizar as variáveis carga de sólidos e de proteína de soja, sendo estas fixadas em 15% (m/v) e 12% (m/m), respectivamente, para as etapas subsequentes do trabalho. A avaliação do perfil temporal de liberação de glicose para diferentes cargas de enzima permitiu estabelecer a carga de 10 FPU/g de bagaço, além de mostrar que em 24 h hidrólise o efeito da proteína de soja se mostrou mais efetivo em relação ao controle (hidrólise sem aditivo). A sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico nessas condições possibilitou aumentar em até 26% a quantidade de glicose liberada, sendo que esta condição foi validada durante a hidrólise em reator de 0,5 L, o qual representava condições mais próximas da realidade industrial. Ensaios realizados com a fração solúvel da proteína de soja e a associação desta com o surfactante Tween 80 indicaram a possibilidade de reduzir significativamente a quantidade de aditivo e ainda obter ganhos similares ou superiores aos obtidos com 12% (m/m) de proteína de soja. A caracterização físico-química do conjunto biomassa-aditivo por FTIR e pela análise elementar de nitrogênio, assim como a análise do efeito da proteína de soja na atividade e estabilidade do coquetel enzimático mostraram que o aditivo, além de reduzir a adsorção improdutiva de enzimas na lignina, também tem efeito na estabilidade das enzimas. Transversalmente a essas atividades experimentais, utilizou-se a metodologia desenvolvida pelo LaDABio/UFSCar para análise reversa da viabilidade tecno-econômica do processo, permitindo definir metas de desempenho dentro do contexto de uma biorrefinaria integrada de etanol 1G-2G de modo a viabilizá-la economicamente. Tal análise mostrou que, para que seja possível a viabilização tecno-econômica da utilização da proteína de soja no contexto da biorrefinaria 1G-2G, a conversão proporcionada pelo aditivo deve ser aumentada e o carga enzimática deve ser reduzida. Ademais, trabalhar com 12% (m/m) de proteína se mostrou interessante, uma vez que acarretou aumento no VPL (Valor Presente Líquido) do processo devido ao aumento na quantidade de energia elétrica gerada pela planta devido a queima da proteína nas caldeiras.

Palavras-chave: hidrólise enzimática; proteína de soja; biomassa lignocelulósica; adsorção improdutiva; lignina; análise tecno-econômica.

ABSTRACT

The implementation of the biochemical conversion process of lignocellulosic biomass into biofuels and other bioproducts still have some technological challenges to be overcome, such as low yield of the enzymatic hydrolysis step and the high cost of cellulolytic enzymes. Among the strategies to increase efficiency of biomass enzymatic saccharification, the use of additives has shown positive effects, since they decrease unproductive adsorption of cellulases in the lignin, reducing loss of enzymes in the process. However, the use of low-cost additives is necessary to make the process economically feasible. Thus, the present study evaluated the use of soy protein as an additive to reduce unproductive adsorption of enzymes during the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. In order to achieve this objective, initially, a statistical experimental design methodology was used as a tool to optimize the solids loading and soy protein concentration, setting these variables for subsequent steps of this study at 15% (w/v) and 12% (w/w), respectively. The time profile for glucose release using different enzyme loads allowed to establish a loading of 10 FPU/g of bagasse and it also showed that it was for the hydrolysis time of 24 hours that soy protein was more effective in relation to the control (hydrolysis without additive). The saccharification of the liquid hot water pretreated sugarcane bagasse at these conditions allowed to increase the amount of glucose released in the process by up to 26%. This condition was validated during the hydrolysis in a 0.5 L reactor, which represents conditions more similar to the industrial reality. Assays performed with the soluble fraction of soy protein and its association with the surfactant Tween 80 showed that it was possible to reduce considerably the additive concentration used in the hydrolysis and still have similar or higher gains than those obtained by 12% (w/w) of soy protein. The physicochemical characterization of the biomass-additive interaction performed by FTIR and by the elemental nitrogen analysis, as well as the verification of the effect of soy protein on the activity and stability of the enzymatic cocktail indicated that the additive, besides reducing the non-productive adsorption between enzymes and lignin, also has a positive effect on the stability of the enzymes. Transversally to these experimental activities, a methodology developed by the LaDABio/UFSCar was used to analyze the reverse techno-economic feasibility of the process, allowing the definition of performance targets within the context of an integrated biorefinery of 1G-2G ethanol, in order to make it economically feasible. This analysis showed that, in order to allow techno-economic feasibility of the use of soy protein in the context of 1G-2G biorefinery, the conversion provided by the additive should be increased and the enzymatic load reduced. In addition, working with 12% (w/w) of protein in the hydrolysis reactor had an interesting result. It led to an increase in the NPV (Net Present Value) of the process, due to the increase in the amount of electric energy generated by the plant due to the burning of the protein in the boilers.

Key-words: Enzymatic hydrolysis; soy protein; lignocellulosic biomass; unproductive binding; lignin; techno-economic analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes da hemicelulose (Adaptado de Fengel & Wegener, 1989)....	7
Figura 2. Representação da estrutura de uma biomassa lignocelulósica (Zampiere, 2011).	8
Figura 3. Representação esquemática das principais etapas de produção do etanol 2G a partir da biomassa lignocelulósica (Adaptado de Modenbach & Nokes, 2013). 9	
Figura 4. Esquema geral de um pré-tratamento de biomassa lignocelulósica (Adaptado de Phitsuwan et al., 2013).	11
Figura 5. Representação da ação sinérgica das enzimas celulases (EG = Endoglucanases, CBH I e II = celobiohidrolases ou exoglucanases, BG = β - glicosidases), junto com a LPMO (AA9), na sacarificação enzimática da celulose (adaptado de Harris et al. 2014).	14
Figura 6. Inibição da celulase pela lignina. A) Adsorção improdutiva da celulase na lignina, B) bloqueio físico da lignina nos materiais lignocelulósicos, prejudicando a interação celulase-celulose, C) inibição da celulase pela lignina solúvel, e D) ação normal da celulase nas cadeias de celulose, liberando a glicose, em materiais sem ou com teor muito baixo de lignina (Adaptado de SAINI et al., 2016).....	16
Figura 7. Representação esquemática das etapas e produtos envolvidos em uma biorrefinaria 1G-2G (Mendonça et al., 2017).....	22
Figura 8. Regiões de viabilidade econômica da biorrefinaria de etanol 1G-2G, obtidas através da análise retro tecno-econômica, para 48 horas de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente (Adaptado de Longati et al., 2018).....	24
Figura 9. Fluxograma geral da biorrefinaria integrada de etanol 1G-2G (Adaptado de Furlan et al., 2015).	25
Figura 10. (a) Aparato experimental utilizado durante a hidrólise no reator do tipo tanque agitado. (b) Dimensões características do reator (Adaptado de Squinca, 2017).	32
Figura 11. Fluxograma representando a adição da proteína de soja na simulação da biorrefinaria de etanol 1G-2G desenvolvida no EMSO.....	40
Figura 12. Gráficos de Pareto para cada uma das variáveis dependentes analisadas a) Glicose, b) ART, c) Conversão e d) Ganho.	44
Figura 13. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a avaliação dos efeitos das cargas de sólidos e de proteína de soja na liberação de glicose. O tempo de hidrólise foi de 24 horas e a carga enzimática utilizada era de 5 FPU/g de substrato.	46
Figura 14. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a avaliação dos efeitos das cargas de sólidos e de proteína de soja na liberação de açúcares redutores totais (ART). O tempo de hidrólise foi de 24 horas e a carga enzimática utilizada era de 5 FPU/g de substrato.....	47
Figura 15. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a avaliação dos efeitos das cargas de sólidos e de proteína de soja na conversão da celulose em glicose. O tempo de hidrólise foi de 24 horas e a carga enzimática utilizada era de 5 FPU/g de substrato.....	48

- Figura 16.** Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a avaliação dos efeitos das cargas de sólidos e de proteína de soja no ganho. O tempo de hidrólise foi de 24 horas e a carga enzimática utilizada era de 5 FPU/g de substrato. 49
- Figura 17.** Obtenção dos valores que otimizam as variáveis dependentes do processo (glicose, ART, conversão e ganho) por meio da utilização da Função Desejabilidade presente no software STATISTICA..... 52
- Figura 18.** (a) Perfil temporal de liberação de glicose para cargas de enzima de 5, 10, 15 e 20 FPU/g de substrato, com e sem a adição de proteína de soja. As barras com cores sólidas representam os controles; as barras hachuradas representam a hidrólise com 12% (m/m) de proteína de soja. A carga de sólidos utilizada foi de 15% (m/v). (b) Ganho obtido pela hidrólise com o aditivo em relação ao controle. 55
- Figura 19.** Ganhos e conversão obtidos para diferentes tempos de incubação da proteína de soja com o bagaço, para uma carga enzimática de 10 FPU/g, 24 horas de hidrólise, 15% (m/v) de sólidos e 12% (m/m) de proteína de soja..... 59
- Figura 20.** Ganhos e conversão obtidos para diferentes tempos/temperaturas de desnaturação térmica da proteína de soja, para uma carga enzimática de 10 FPU/g, 24 horas de hidrólise, 15% (m/v) de sólidos e 12% (m/m) de proteína de soja.. 61
- Figura 21.** Quantificação da proteína de soja total e de sua fração solúvel, após 24 horas de incubação da proteína com o tampão, a 50°C e pH 4,8..... 63
- Figura 22.** Quantificação da glicose (a) e dos ganhos (b) obtidos para diferentes concentrações de proteína de soja (total e fração solúvel) para uma carga enzimática de 5 FPU/g, 24 horas de hidrólise e 15% (m/v) de sólidos. 64
- Figura 23.** Efeito da associação dos aditivos Tween 80 e Proteína de Soja na hidrólise do bagaço de cana hidrotérmico (15% m/v). As hidrólises foram realizadas com 10 FPU/g de substrato, 50°C, 30 rpm por 24 horas. As cargas de Tween avaliadas foram 0,1 e 0,25% (m/v); as de proteína foram 1, 5 e 12% (m/m). (a) Liberação de glicose; (b) ganho. As barras em preto, vermelho e hachuradas em verde e azul representam os controles na ausência dos aditivos, apenas com 12% de proteína de soja, com 0,1% e 0,25% de Tween. 66
- Figura 24.** Avaliação do efeito da proteína de soja na hidrólise do bagaço hidrotérmico pré-tratado com 10 e 15% (m/v) de sólidos (lavado e sem lavar), e da celulose microcristalina pura (celuflok e avicel). As hidrólises foram realizadas com carga enzimática de 10 FPU/g, 15% sólidos, por 24h, 50°C e 30 rpm. As barras em preto representam os controles (hidrólise sem aditivo) e em vermelho a hidrólise com a proteína (12% (m/m)). (a) liberação de glicose; (b) ganho..... 69
- Figura 25.** Avaliação do efeito da proteína de soja na hidrólise do bagaço hidrotérmico pré-tratado com 10 e 15% (m/v) de sólidos (lavado e sem lavar), e da celulose microcristalina pura (celufloc e avicel). As hidrólises foram realizadas com carga enzimática de 10 FPU/g, 15% sólidos, por 24h, 50°C e 30 rpm. As barras em preto representam os controles (hidrólise sem aditivo) e em vermelho a hidrólise com a proteína (12% (m/m)). (a) liberação de glicose; (b) ganho..... 71
- Figura 26.** Hidrólise enzimática em biorreator. Carga de bagaço de 15% (m/v), 10 FPU/g de sólidos de enzima, por 24 horas, 50°C e 250 rpm. Barra preta representa

o controle, as vermelhas referem-se a utilização de 12% de proteína de soja, as azuis possuem 0,1% de Tween 80 e as hachuradas em azul são referentes a associação do aditivos Tween (0,1%) e proteína de soja (1%). (a) Liberação de glicose e (b) ganhos.....	73
Figura 27. Determinação da atividade enzimática (FPase) da enzima Cellic CTec3®, no tempo zero (barra com cor cheia) e após 24 horas de incubação (barras hachuradas), com e sem proteína de soja. A Atividade residual corresponde a porcentagem de atividade obtida em relação ao controle (tempo zero, sem proteína de soja).	75
Figura 28. Quantificação do teor de nitrogênio (%) nas amostras após a incubação do bagaço por 24 horas com diferentes concentrações de proteína de soja. A barra em preto representa o controle (incubação sem a proteína).....	77
Figura 29. Espectros obtidos por FTIR do bagaço de cana (15% sólidos) incubado por 24 horas, a 50°C, na ausência e presença da proteína de soja, em diferentes concentrações.	78
Figura 30. Espectros obtidos por FTIR do bagaço de cana (15% sólidos) incubado por 24 horas, a 50°C, na ausência e presença da proteína de soja solúvel, para a concentração de 1,26 g/L.	81
Figura 31. Espectros obtidos por FTIR do bagaço de cana (15% sólidos) incubado por 24 horas, a 50°C, na ausência e presença da proteína de soja (12%), em diferentes pHs.....	82
Figura 32. Espectros obtidos por FTIR do bagaço de cana incubado por 24 horas, a 50°C, na ausência e presença da proteína de soja, em diferentes concentrações de NaCl.	83
Figura 33. Curvas isoeconômicas para VPL=0, avaliando o efeito das variáveis carga de sólidos, carga de enzimas, concentração de aditivo e conversão da biomassa, para 24 horas de hidrólise enzimática, considerando custo zero da proteína para a biorrefinaria. As linhas tracejadas referem-se a 80% de conversão, enquanto que as contínuas referem-se a 90%. Cada cor está associada a uma concentração diferente de aditivo na hidrólise.....	85
Figura 34. Efeito do custo da proteína de soja (0, 0,1, 1 e 3 US\$/kg) no VPL da biorrefinaria concentração de proteína de soja no VPL e na carga de sólidos, para 24 horas de hidrólise, 1 FPU/g celulose, 15% sólidos e considerando-se uma conversão fixa de 90% da celulose em glicose.....	87
Figura 35. Efeito da carga enzimática (1 e 2,5 FPU/g), da conversão (50, 70, 80 e 90%) e da concentração de proteína de soja no VPL da biorrefinaria, fixando-se a carga de sólidos em 15% e custo zero da proteína para a biorrefinaria.....	89
Figura 36. Energia elétrica total produzida e energia excedente em função da carga de aditivo, para 24 horas de hidrólise com 15% sólidos e 1 FPU/g de celulose, para VPL = 0, 90% de conversão e custo zero da proteína de soja para a biorrefinaria.	90
Figura 37. Efeito do tempo de hidrólise no VPL para diferentes conversões enzimáticas, fixando-se a carga de sólidos em 15%, 1 FPU/ g de celulose e 12% de proteína de soja.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz utilizada no planejamento experimental realizado.....	36
Tabela 2. Matriz com os valores codificados e reais do DCCR com os dados de glicose e açúcares redutores totais obtidos após 24 horas de hidrólise com 5 FPU/g.	43
Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para a variável concentração de glicose.	45
Tabela 4. Tabela de variância (ANOVA) para a variável concentração de açúcares redutores.....	45
Tabela 5. Tabela de variância (ANOVA) para a variável conversão.....	45
Tabela 6. Tabela de variância (ANOVA) para a variável ganho.....	45
Tabela 7. Validação do modelo obtido pelo planejamento experimental.....	52
Tabela 8. Quantificação da proteína de soja total e de sua fração solúvel, após 24 horas de incubação da proteína com o tampão, a 50°C e pH 4,8.....	63
Tabela 9. Alterações estruturais observadas após a análise por FTIR.....	80

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

1G	Referente ao etanol de primeira geração
2G	Referente ao etanol de segunda geração ou lignocelulósico
AA	Atividades Auxiliares
ART	Açúcares Redutores Totais
BSA	Albumina do Soro Bovino
CHN	Análise dos teores de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio
CS	Carga de Sólidos
DCCR	Delineamento Central Composto Rotacional
EMSO	Environment for Modeling Simulation and Optimization (Simulador de processos orientado a equações)
FPase	Medida da atividade enzimática em papel de filtro
FPU	Unidade de Papel de Filtro
FTIR	Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
LHW	Bagaço de cana submetido ao pré-tratamento hidrotérmico
LPMO	Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos
m/m	Relação massa/massa
m/v	Relação massa/volume
PEG	Polietilenoglicol
PS	Proteína de Soja
VPL / NPV	Valor Presente Líquido / Net Present Value

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Biomassa como matéria-prima para a produção de etanol	6
3.1.1. Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	6
3.1.2. Etapas para produção do etanol 2G.....	8
3.2. Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos	10
3.3. Hidrólise enzimática	12
3.4. Adsorção improdutiva de enzimas à lignina	15
3.5. Proteína de soja.....	20
3.6. Biorrefinarias integradas.....	21
3.7. Análise Tecno-econômica reversa do processo	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Materiais.....	26
4.1.1. Substratos	26
4.1.2. Aditivos: Proteína de soja e Tween 80.....	27
4.1.3. Enzima	27
4.2. Hidrólise Enzimática.....	28
4.2.1. Definição das cargas de sólidos e de aditivo a serem utilizadas experimentalmente.....	28
4.2.2. Avaliação do perfil temporal	29
4.2.3. Efeito da proteína de soja solúvel	29
4.2.4. Efeito da proteína de soja desnaturada	30
4.2.5. Pré-incubação da proteína de soja com o bagaço	30
4.2.6. Efeito da proteína de soja em diferentes substratos	31
4.2.7. Efeito da proteína de soja no extrato enzimático comercial Cellic CTec2®	31
4.2.8. Associação dos aditivos proteína de soja e Tween 80	31
4.2.9. Avaliação da sacarificação enzimática em biorreator	32
4.3. Adsorção.....	33

4.4.	Quantificação da glicose liberada e dos açúcares redutores totais	33
4.5.	Efeito da proteína de soja na atividade e estabilidade da Cellic CTec3® 34	
4.6.	Análise CHN	35
4.7.	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 35	
4.8.	Planejamento experimental, análise da metodologia de superfície de resposta e função desejabilidade	36
4.9.	Análise Tecno-Econômica Reversa.....	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1.	Hidrólise	42
5.1.1.	Planejamento Experimental	42
5.1.2.	Determinação dos valores que otimizam as variáveis dependentes (função Desejabilidade) e validação do modelo	50
5.1.3.	Avaliação do efeito da carga enzimática e perfil temporal.....	53
5.1.4.	Efeito da pré-incubação da proteína de soja com o bagaço.....	59
5.1.5.	Efeito da proteína de soja desnaturada.....	60
5.1.6.	Efeito da proteína de soja solúvel	62
5.1.7.	Associação dos aditivos Tween 80 e proteína de soja	65
5.1.8.	Efeito da proteína de soja na hidrólise de diferentes substratos	68
5.1.9.	Comparação do efeito das enzimas Cellic CTec2® e Cellic CTec3® ..	70
5.1.10.	Hidrólise em biorreator.....	72
5.1.11.	Efeito da proteína de soja na atividade enzimática	74
5.2.	Análise Elementar CHN.....	76
5.3.	Caracterização do conjunto biomassa-aditivo por FTIR.....	78
5.3.1.	Efeito de diferentes cargas de proteína de soja na adsorção	78
5.3.2.	Avaliação da interação da proteína de soja solúvel com a biomassa lignocelulósica	80
5.3.3.	Avaliação do tipo de interação da proteína de soja com o bagaço de cana 81	
5.4.	Adição da proteína de soja no contexto da biorrefinaria integrada de etanol 1G-2G: Análise Tecno-Econômica Reversa	84
5.4.1.	Análise tecno-econômica reversa.....	84
5.4.2.	Efeito do custo da proteína na biorrefinaria	87

5.4.3. Efeito da carga enzimática e de proteína de soja no VPL para diferentes conversões	88
5.4.4. Efeito do tempo de hidrólise no VPL	90
6. CONCLUSÕES	92
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A conversão de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis e outros bioprodutos, utilizando a hidrólise enzimática, tem sido identificada como a rota mais promissora para a implantação das novas indústrias do futuro, em consonância com os conceitos de biorrefinarias e bioeconomia (FitzPatrick et al., 2010; Menon & Rao, 2012; Pino et al., 2018; Valdivia et al., 2016). No entanto, o custo da produção do etanol celulósico ainda é elevado, sendo que alguns dos principais gargalos do processo estão no baixo rendimento das reações de hidrólise e no alto custo das enzimas celulolíticas (Johnson, 2016; Klein-Marcuschamer et al., 2012; Silva et al., 2018; Valdivia et al., 2016).

Dentre as estratégias para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática da biomassa vegetal, o uso de aditivos tem mostrado efeitos bastante positivos, uma vez que estes reduzem a adsorção improdutiva das celulasas na lignina (Eriksson et al., 2002; Rocha-Martin et al., (2017); Saini et al., 2016). Pesquisas envolvendo o uso de surfactantes (Tween, Triton), proteínas não catalíticas (BSA, proteína de soja) e polímeros (PEG) tem mostrado que estes aditivos reduzem consideravelmente a adsorção improdutiva de celulasas na lignina proveniente de diferentes materiais lignocelulósicos (Brondi et al., 2019; Börjesson et al., 2007a; Eriksson et al., 2002; Kaar & Holtzapfel, 1998; Li et al., 2012; Yang & Wyman, 2006; Zheng et al., 2008). A adição de Tween 20 durante a reação de hidrólise da madeira, por exemplo, possibilitou a redução da carga enzimática em 50%, mantendo-se o mesmo rendimento do processo, devido à redução da adsorção improdutiva (Eriksson et al., 2002). No entanto, apesar dos resultados bastante promissores do uso de aditivos na hidrólise da biomassa vegetal, o custo adicional desse insumo ainda representa uma limitação para a aplicação dessa estratégia em processos industriais de larga escala.

Nesse contexto, a utilização da proteína de soja como aditivo durante a hidrólise pode ser interessante do ponto de vista econômico, uma vez que tal insumo é considerado a proteína de menor custo no mercado, além do fato do Brasil ser o segundo maior produtor mundial de soja, o que garante a abundância no país de seus derivados, como por exemplo, a proteína isolada (CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), 2016; Klein-Marcuschamer et al., 2012). Florencio et al. (2016) mostraram que a proteína de soja apresentou desempenho melhor do que a BSA no aumento da eficiência da hidrólise, dobrando a liberação de glicose em relação à sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar sem aditivo, quando se utilizou coquetéis enzimáticos de *T. reesei* e *A. niger* produzidos “in-house”. Em outro estudo recente, Brondi et al. (2019) avaliaram o efeito da proteína de soja na presença de extratos enzimáticos comerciais nas reações de hidrólise do bagaço de cana e observaram o potencial diferenciado deste aditivo frente a outras alternativas de proteínas não-catalíticas. Tais estudos justificam a realização de uma investigação mais aprofundada do efeito e da otimização das variáveis operacionais como as cargas de sólidos, aditivo e de enzimas e do tempo de hidrólise, que são fatores fundamentais para viabilizar a aplicação desta estratégia em escala industrial. Além disso, a avaliação tecno-econômica da adição da proteína de soja no processo de produção do etanol de segunda geração (2G) é uma questão chave para viabilizar tal aplicação.

Além da utilização de aditivos de baixo custo durante a hidrólise, uma outra forma de tornar o etanol 2G (lignocelulósico) economicamente viável seria a integração do seu processo de produção com o do etanol de primeira geração (produzido a partir do caldo extraído da cana de açúcar). Nas unidades produtoras de etanol 1G, o bagaço é um subproduto do processo, sendo geralmente queimado em caldeiras de modo a fornecer energia elétrica para as usinas. No entanto, há na literatura estudos que mostram que integrar a produção do etanol 1G-2G resultaria não apenas em vantagens do ponto de vista econômico, mas também do ponto de vista da sustentabilidade (Dias et al., 2013;

Joelsson et al., 2016). Desse modo, associar a utilização da proteína de soja no contexto da integração de biorrefinarias de etanol 1G-2G, pode ser uma estratégia interessante de modo a viabilizar economicamente o etanol lignocelulósico.

Outra integração de processos interessante seria a do bioetanol com unidades produtoras de biodiesel. No Brasil, a localização das atuais usinas de açúcar e álcool e de unidades de produção de biodiesel indicam que há amplas áreas em que essas indústrias estão geograficamente próximas. Essa constatação dá suporte à proposta de estudo da integração dos processos de produção desses dois biocombustíveis, quer em uma mesma instalação, quer em plantas próximas (de forma a baratear a logística de transporte de intermediários entre elas). Em uma biorrefinaria integrada, processando soja e cana de açúcar, torna-se natural o estudo da possibilidade de utilização da proteína de soja como aditivo ou molécula de sacrifício para otimização do desempenho da hidrólise enzimática do bagaço. Evidentemente, tanto para o uso da proteína de soja como aditivo na sacarificação enzimática em biorrefinarias de etanol 1G-2G, quanto nas de biodiesel-etanol, deve-se avaliar a viabilidade tecno-econômica do processo.

Tal avaliação pode ser realizada por meio da metodologia desenvolvida pelo LaDABio de “análise tecno-econômica reversa”. Utilizando-se a simulação desenvolvida no ambiente EMSO (Soares & Secchi, 2003) de uma biorrefinaria integrada de etanol 1G-2G, pode-se avaliar os gargalos tecnológicos presentes, além de permitir a definição de metas de desempenho do processo de modo a superá-los (Furlan et al., 2016; Longati et al., 2018).

Mediante o que foi relatado anteriormente, tem-se que o aumento da eficiência do processo de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é uma etapa fundamental a fim de reduzir os custos de produção do etanol de segunda geração, de forma a torná-lo competitivo economicamente em relação aos demais combustíveis já existentes. Desse modo, estudar o efeito da utilização da proteína de soja durante a hidrólise pode ser uma

forma de aumentar a eficiência da etapa de sacarificação da biomassa. Além disso, avaliar o efeito da adição do aditivo no contexto de uma biorrefinaria integrada, aplicando-se a metodologia da “análise tecno-econômica reversa” pode permitir avaliar o processo em dimensões próximas as da realidade industrial, avaliando o desempenho mínimo necessário para viabilizá-lo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este estudo tem como principal objetivo desenvolver uma estratégia para viabilizar o uso da proteína de soja como um aditivo para a redução da adsorção improdutiva de enzimas na lignina durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar algumas variáveis de processo, tais como carga de sólidos, carga enzimática, concentração de proteína de soja e tempo de hidrólise;
- Avaliar o modo de utilização/adição da proteína de soja, analisando o efeito da desnaturação térmica da proteína, sua melhor estratégia de adição, o efeito de sua fração solúvel na hidrólise e da associação da proteína com o Tween 80;
- Validar a condição selecionada nas etapas anteriores em diferentes escalas (tubos de 5 mL e biorreator de 0,5 L);
- Verificar o efeito da proteína de soja na hidrólise de substratos com teores baixos de lignina (Celuflok e Avicel), além do bagaço hidrotérmico submetido a diferentes condições de pré-tratamento;
- Determinar a ação do aditivo durante a hidrólise (interação entre o bagaço/aditivo e efeito na atividade/estabilidade do coquetel enzimático);
- Realizar continuamente a análise tecno-econômica reversa do processo, integrado à biorrefinaria, gerando metas de desempenho a serem atingidas pela etapa experimental do estudo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biomassa como matéria-prima para a produção de etanol

3.1.1. Estrutura da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é majoritariamente composta por três tipos de macromoléculas naturais: celulose (40-50%), hemicelulose (20-40%) e lignina (20-30%), cujas proporções variam de acordo com a sua fonte na natureza. Matérias-primas lignocelulósicas tipicamente contém de 55-76% (em massa seca) de carboidratos (celulose e hemicelulose), que são polímeros que apresentam como monômeros açúcares de cinco ou seis carbonos (Horn et al., 2012; Wyman, 1994). Estes polímeros de carboidrato precisam ser fracionados em seus respectivos monômeros para que os microrganismos possam convertê-los em etanol ou outros produtos (Ballesteros, 2012).

A celulose é o principal componente da biomassa vegetal, sendo um polímero não-ramificado formado por monômeros de glicose unidos por meio de ligações covalentes do tipo β -1,4 glicosídicas. Duas unidades de glicose unem-se, liberando uma molécula de água, formando a celobiose, unidade estrutural que se repete ao longo da cadeia de celulose (Fengel & Wegener, 1989). As cadeias desta macromolécula se agregam em microfibras por meio de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals. Essas microfibras apresentam regiões cristalinas, que são ordenadas, rígidas e insolúveis, o que dificulta a sua hidrólise enzimática, e regiões amorfas, cuja estrutura é mais facilmente despolimerizada (Horn et al., 2012). A quebra desta macromolécula em monômeros de açúcares faz com que os microrganismos possam fermentá-las e assim convertê-las em etanol ou outros produtos (Laureano-Perez et al., 2005).

A hemicelulose é um heteropolímero ramificado, que apresenta uma estrutura complexa cuja composição varia de acordo com a sua fonte na natureza, podendo ser

composta por hexoses, como a manose, glicose e galactose, e por pentoses, como a xilose e arabinose. Esta macromolécula ainda pode conter ácidos urônicos, grupos acetila e desoxi-hexoses. A hemicelulose realiza a ligação entre as fibras de celulose e a lignina(Fengel & Wegener, 1989; Horn et al., 2012; Pereira Ramos, 2003). A Figura 1 ilustra alguns dos componentes da hemicelulose.

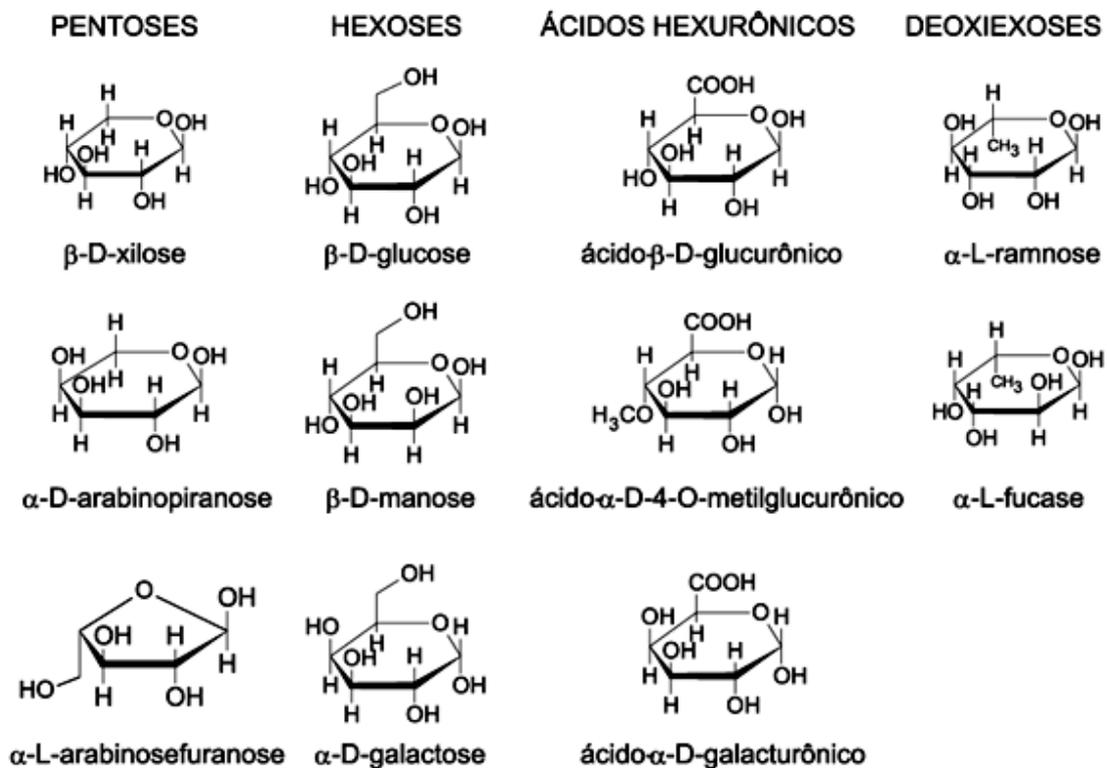


Figura 1. Componentes da hemicelulose (Adaptado de Fengel & Wegener, 1989).

A lignina é uma macromolécula fenólica, aromática, altamente ramificada, de estrutura química complexa e baseada em três precursores monoméricos principais: álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico. Sua composição varia de uma espécie de planta para outra. A propriedade física mais importante desta é a rigidez. Este composto caracteriza-se, também, por sua hidrofobicidade (Chang, Holtzaple, 2000; Joshi et al., 2011; Pereira Ramos, 2003; Zhu et al., 2008).

A lignina é identificada como o principal fator que prejudica a hidrólise enzimática da celulose, agindo como uma barreira física, liberando compostos inibidores durante a hidrólise e também atuando no processo de adsorção improdutivo de enzimas celulases (Chang, Holtzaple, 2000; Joshi et al., 2011; Pereira Ramos, 2003; Zhu et al., 2008). De acordo com Chang e Holtzaple (2000), remover a lignina é de grande importância para que se possa aumentar a sacarificação enzimática das biomassas lignocelulósicas.

Os polímeros de celulose e hemicelulose estão fortemente ligados à lignina por meio de ligações covalentes e de hidrogênio, o que torna a estrutura resistente a despolimerização (Zabed et al., 2016). A Figura 2 representa esquematicamente a estrutura de uma biomassa lignocelulósica.

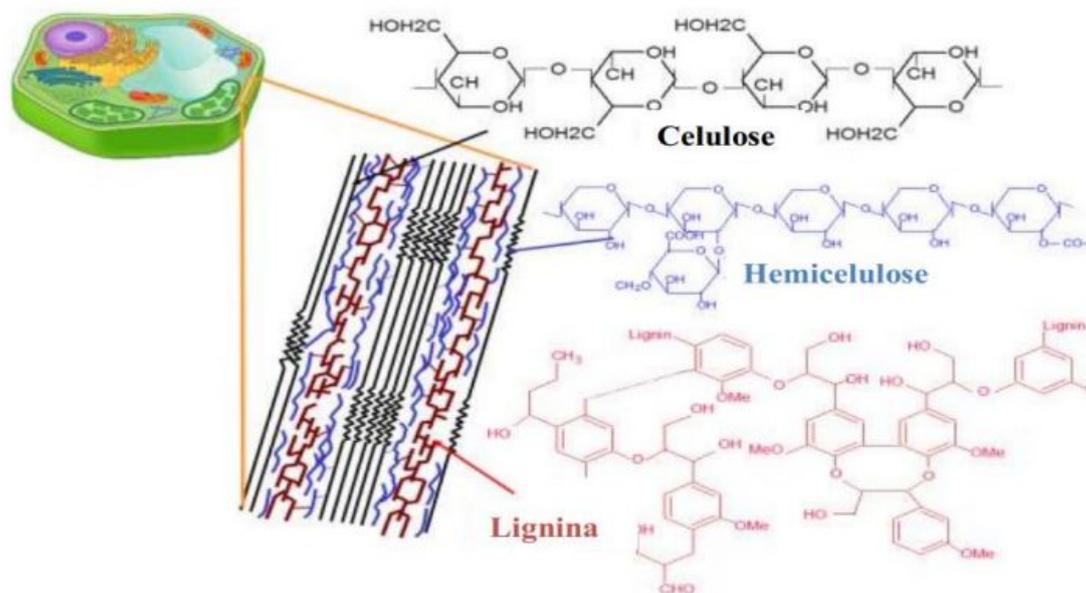


Figura 2. Representação da estrutura de uma biomassa lignocelulósica (Zampiere, 2011).

3.1.2. Etapas para produção do etanol 2G

A produção de etanol celulósico a partir de biomassas como a palha de milho, palha de arroz, sorgo, bagaço e palha de cana-de-açúcar, entre outros, requer etapas adicionais

de tratamento do material a fim de converter os compostos poliméricos presentes em açúcares fermentescíveis. O processamento da lignocelulose em etanol baseia-se em quatro etapas principais: (1) pré-tratamento da biomassa; (2) hidrólise; (3) fermentação; (4) separação e purificação do etanol (Mosier et al., 2005). O custo da produção de etanol a partir da hidrólise enzimática de biomassas vegetais ainda é elevado, sendo que os principais gargalos do processo estão no baixo rendimento e no alto custo das enzimas celulolíticas utilizadas no processo de hidrólise (Johnson, 2016; Klein-Marcuschamer et al., 2012; Sun & Cheng, 2002). A Figura 3 ilustra as principais etapas envolvidas na produção do etanol de segunda geração, inserido no contexto de uma biorrefinaria.

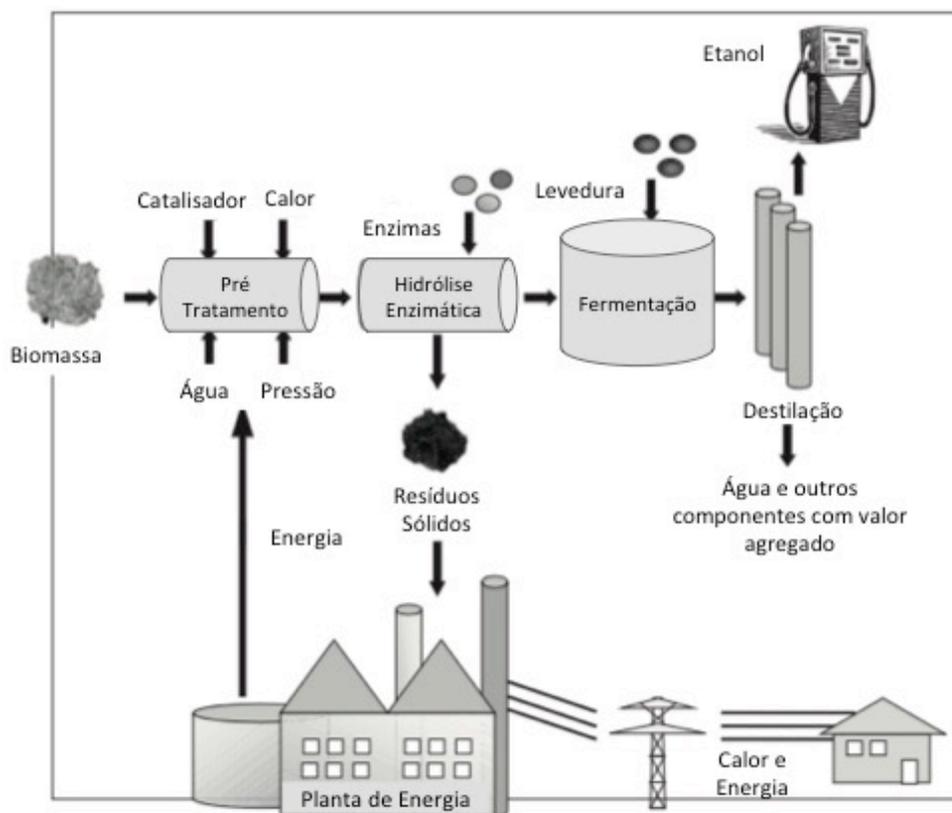


Figura 3. Representação esquemática das principais etapas de produção do etanol 2G a partir da biomassa lignocelulósica (Adaptado de Modenbach & Nokes, 2013).

3.2. Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos

O objetivo do pré-tratamento é alterar ou remover impedimentos estruturais ou a composição da biomassa de modo a elevar o rendimento da hidrólise e a produção de açúcares fermentescíveis. A biomassa, na forma como é encontrada na natureza, limita o acesso das enzimas devido a sua estrutura. Assim, o pré-tratamento é um pré-requisito essencial para tornar a biomassa acessível, desestruturando a lignina e a hemicelulose e rompendo a estrutura cristalina da celulose (Mosier et al., 2005; Zhu et al., 2008). O pré-tratamento deve favorecer a formação de açúcares, evitar a degradação de carboidratos e a formação de subprodutos inibidores da hidrólise e ser economicamente viável (Sun & Cheng, 2002).

Apesar de ser essencial para aumentar a eficiência do processo de sacarificação enzimática, reações laterais indesejáveis são muitas vezes inevitáveis durante o pré-tratamento, liberando produtos que podem inibir/desativar as enzimas durante a hidrólise e/ou o crescimento de microrganismos durante a etapa de fermentação. Muitos dos compostos inibidores gerados devem-se a degradação e solubilização da hemicelulose e da lignina, uma vez que a biomassa é submetida a condições severas de processo (Jönsson & Martín, 2016). Desse modo, a degradação da hemicelulose, por exemplo, pode acarretar a liberação de ácido acético, furfural, ácido fórmico, 5-(hidroximetil)furfural, dentre outros compostos. Já a lignina pode liberar compostos fenólicos como a vanilina e o ácido ferúlico (Ko et al., 2015b).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura para separação e aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Tais técnicas são baseadas em processos mecânicos, físicos, químicos, biológicos ou na combinação destes. A Figura 4 apresenta o esquema geral de um pré-tratamento de uma biomassa lignocelulósica, assim como alguns dos compostos inibidores que podem ser gerados durante o processo.

Um dos pré-tratamentos amplamente reportados na literatura como fracionador dos componentes da biomassa vegetal é o hidrotérmico. Tal método utiliza água a alta pressão e alta temperatura (160 – 240°C) o que acarreta a solubilização da hemicelulose, tornando a celulose mais acessível ao ataque enzimático durante a hidrólise. A água, quando submetida a elevadas pressões e temperaturas, aumenta o seu grau de ionização. Os íons hidroxila gerados atuam como catalisadores da hidrólise da hemicelulose. As principais variáveis que afetam a eficiência do pré-tratamento são o tempo de retenção e a temperatura do processo (Santos, 2013; Santos et al., 2014).

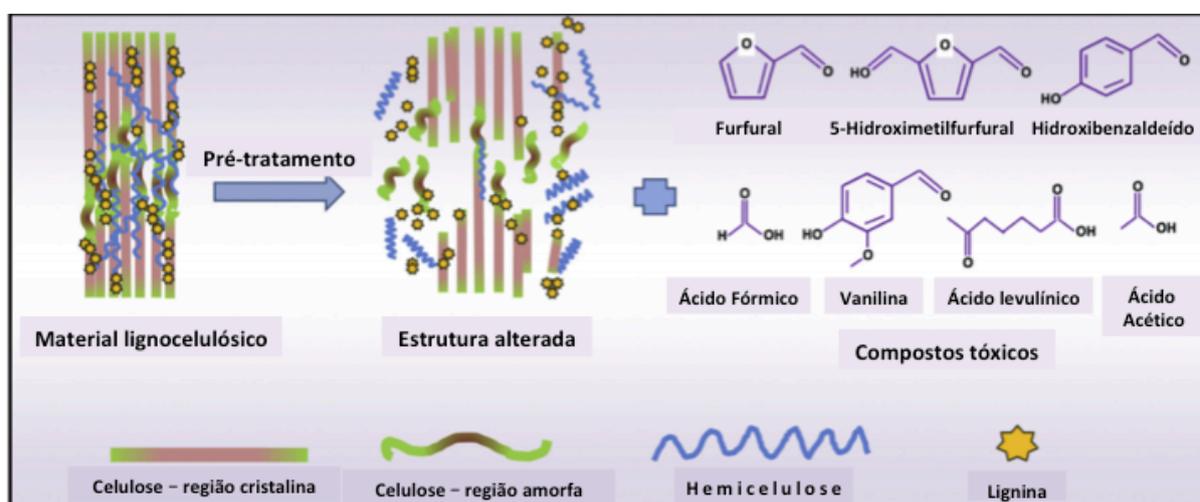


Figura 4. Esquema geral de um pré-tratamento de biomassa lignocelulósica (Adaptado de Phitsuwan et al., 2013).

As vantagens do pré-tratamento hidrotérmico consistem no fato do processo não fazer uso de reagentes químicos (importante para os pontos de vista ambiental e econômico), além de não haver a necessidade de se trabalhar com reatores resistentes a corrosão; ocorre a hidrólise de grande parte da hemicelulose presente no material; há uma baixa produção de compostos inibidores quando comparado ao pré-tratamento de explosão a vapor (Boussarsar et al., 2009; Taherzadeh & Karimi, 2008).

Santos et al. (2013) realizaram o pré-tratamento hidrotérmico a 210°C por 15 minutos da palha de cana-de-açúcar e observaram que o tratamento solubilizou grande parte da hemicelulose presente no material. Após o tratamento hidrotérmico a maior parte da lignina presente na biomassa continua presente na estrutura do material. No entanto, esta lignina sofre alterações em sua estrutura (Ko et al., 2015b). De acordo com Ko et al. (2015b) o pré-tratamento hidrotérmico faz com que a superfície da lignina se torne mais exposta, fazendo com que esta adsorva improdutivamente mais celulases do que sua forma original.

3.3. Hidrólise enzimática

A hidrólise de materiais lignocelulósicos tem como objetivo gerar açúcares fermentescíveis monoméricos a partir da celulose e da hemicelulose. A hidrólise enzimática é baseada na exposição da suspensão sólida da biomassa pré-tratada às enzimas celulolíticas, que constituem um complexo de várias classes de enzimas. Ao menos três principais grupos de celulases estão envolvidos no processo de hidrólise, sendo elas as endoglucanases, as exoglucanases (celobiohidrolases) e as β -glicosidases (Sun & Cheng, 2002; Van Dyk & Pletschke, 2012). As endoglucanases atuam nas regiões de baixa cristalinidade das fibras de celulose ou nas extremidades das regiões cristalinas, clivando as ligações β -1,4 glicosídicas e produzindo cadeias que apresentam extremidades reductoras e não reductoras. As exoglucanases agem nessas extremidades livres, liberando moléculas de celobiose. As β -glicosidases (BGL) hidrolisam as unidades de celobiose em duas moléculas de glicose, sendo este o produto final da hidrólise (Sun & Cheng, 2002; Van Dyk & Pletschke, 2012). Exo e endoglucanases são inibidas pela celobiose, e a ação da celobiase (β -glicosidase) é, geralmente, a etapa limitante na velocidade de degradação da celulose (Lee, 1997; Zabed et al., 2016). As enzimas

utilizadas podem ser diretamente produzidas por microrganismos (fungos e bactérias) ou podem-se utilizar complexos enzimáticos comerciais (Zabed et al., 2016).

Recentemente, descobriu-se um conjunto de enzimas que auxiliam a ação das celulases na sacarificação de biomassas lignocelulósicas, tornando o processo mais eficientes. Tais enzimas são denominadas monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO's) e integram um grupo de enzimas denominadas Atividades Auxiliares (AA). Estes grupos de proteínas oxidam ligações do tipo β 1-4 glicosídicas presentes na cadeia de celulose, formando-se, assim, oligossacarídeos oxidados. Para que estas reações sejam possíveis, estas enzimas necessitam de oxigênio molecular e doadores de elétrons, como o ácido gálico, ácido ascórbico, fenóis derivados da lignina ou a enzima celobiose desidrogenase (Harris et al., 2014; Horn et al., 2012; Levasseur et al., 2013). Na literatura há estudos que demonstram que a ação sinérgica de LPMO's junto com as celulases aumentam a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis (Cannella et al., 2012). Alguns complexos enzimáticos comerciais modernos, como por exemplo a Cellic CTec3[®], já possuem as LPMO's de modo a torná-los mais eficientes (Druzhinina & Kubicek, 2017). A Figura 5 exemplifica a ação sinérgica das três principais celulases, juntamente com a LPMO, na hidrólise da celulose.

A conversão de biomassas em açúcares fermentescíveis depende das condições da hidrólise e das características da biomassa. Assim, alguns fatores que influenciam o rendimento da hidrólise são: composição e estrutura da biomassa, cristalinidade da celulose, área superficial do substrato disponível ao ataque enzimático, quantidade de lignina e hemicelulose presente, tamanho da partícula do substrato, tipo de enzima e carga enzimática, acúmulo de celobiose no meio e a adsorção improdutiva de enzimas à lignina (Alvira et al., 2010; Saini et al., 2016; Zabed et al., 2016), além das condições de operação do processo, como temperatura e tempo de hidrólise, agitação, carga de sólidos e tipo de reator utilizado.

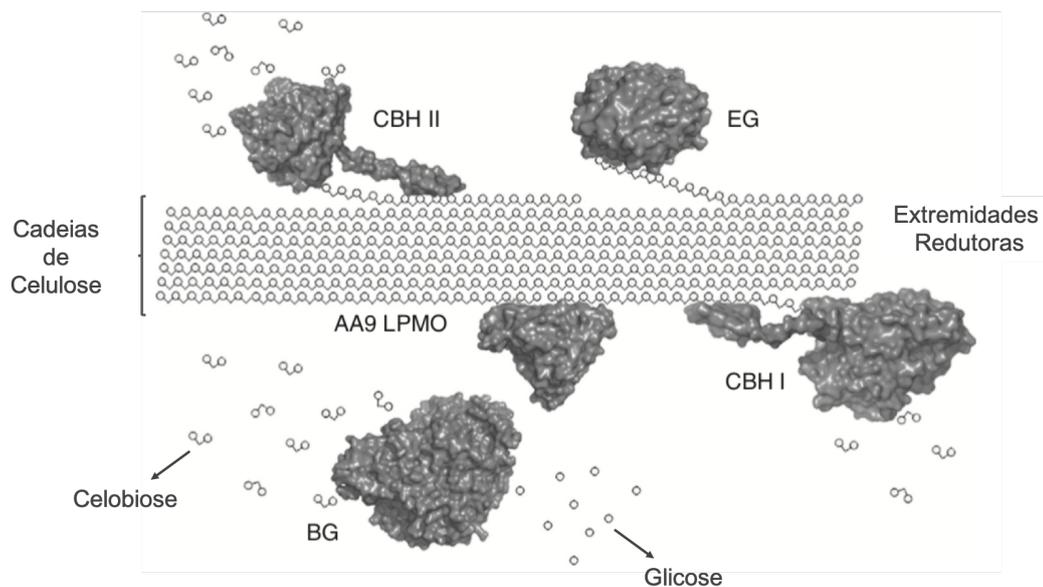


Figura 5. Representação da ação sinérgica das enzimas celulases (EG = Endoglucanases, CBH I e II = celobiohidrolases ou exoglucanases, BG = β - glicosidases), junto com a LPMO (AA9), na sacarificação enzimática da celulose (adaptado de Harris et al. 2014).

Trabalhar com altas cargas de sólidos apresenta várias vantagens como, por exemplo, a geração de soluções com maiores concentrações de açúcares, o que conseqüentemente resultará em uma maior concentração de etanol, e redução de custos operacionais, principalmente relacionado à destilação. No entanto, trabalhar com um alto teor de sólidos nos reatores também acarreta algumas dificuldades ao processo, sendo estas relacionadas, principalmente, a dificuldades de agitação e ao transporte de massa e calor insuficientes e também problemas de inibição das enzimas pelo produto (celobiose) (Kristensen et al., 2009; Modenbach & Nokes, 2013). Para que seja possível a utilização de altas cargas de sólidos, trabalhar com reatores de batelada alimentada faz-se mais interessante do que reatores batelada (Hodge et al., 2009). Zhang et al., (2012) realizaram a hidrólise em batelada alimentada do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH, com 9,6 FPU/g sólidos da enzima Accellerase® 1500, trabalhando com uma carga total de sólidos de 30% (m/v) e conseguiram converter 55% da celulose em glicose após 144h de sacarificação.

3.4. Adsorção improdutiva de enzimas à lignina

Durante a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos pré-tratados, as enzimas celulasas tendem a ligar-se às regiões ricas em lignina por meio de interações que podem ser de natureza hidrofóbica, eletrostática ou ligações de hidrogênio. Essa interação é denominada adsorção improdutiva e é um fator prejudicial à sacarificação da celulose, pois reduz a quantidade de enzimas livres. Consequentemente, uma quantidade maior de enzima é necessária para que se atinja a eficiência desejada da hidrólise (Lou et al., 2013; Rahikainen et al., 2013). A Figura 6 apresenta o efeito da lignina na sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos, podendo agir tanto na adsorção improdutiva (A), quanto como uma barreira física (B) ou inativando a enzima por meio de compostos derivados liberados durante o pré-tratamento ou durante a hidrólise (C).

Segundo Ko et al. (2015), dentre as enzimas envolvidas no processo de hidrólise, as β -glicosidases são as que mais adsorvem na lignina da biomassa. Além disso, as enzimas produzidas por diferentes microrganismos apresentam composição, massa molecular, hidrofobicidade e pontos isoelétricos diferentes, fazendo, assim, com que tenham comportamentos diferentes em sua adsorção pela lignina. A β -glicosidase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* é menos adsorvida pela lignina do que a β -glicosidase produzida pelo *T. reesei*. Ademais, a composição da lignina também influencia na adsorção improdutiva. Lignina com teor maior de guaiacil apresenta uma maior adsorção de celulasas durante a hidrólise.

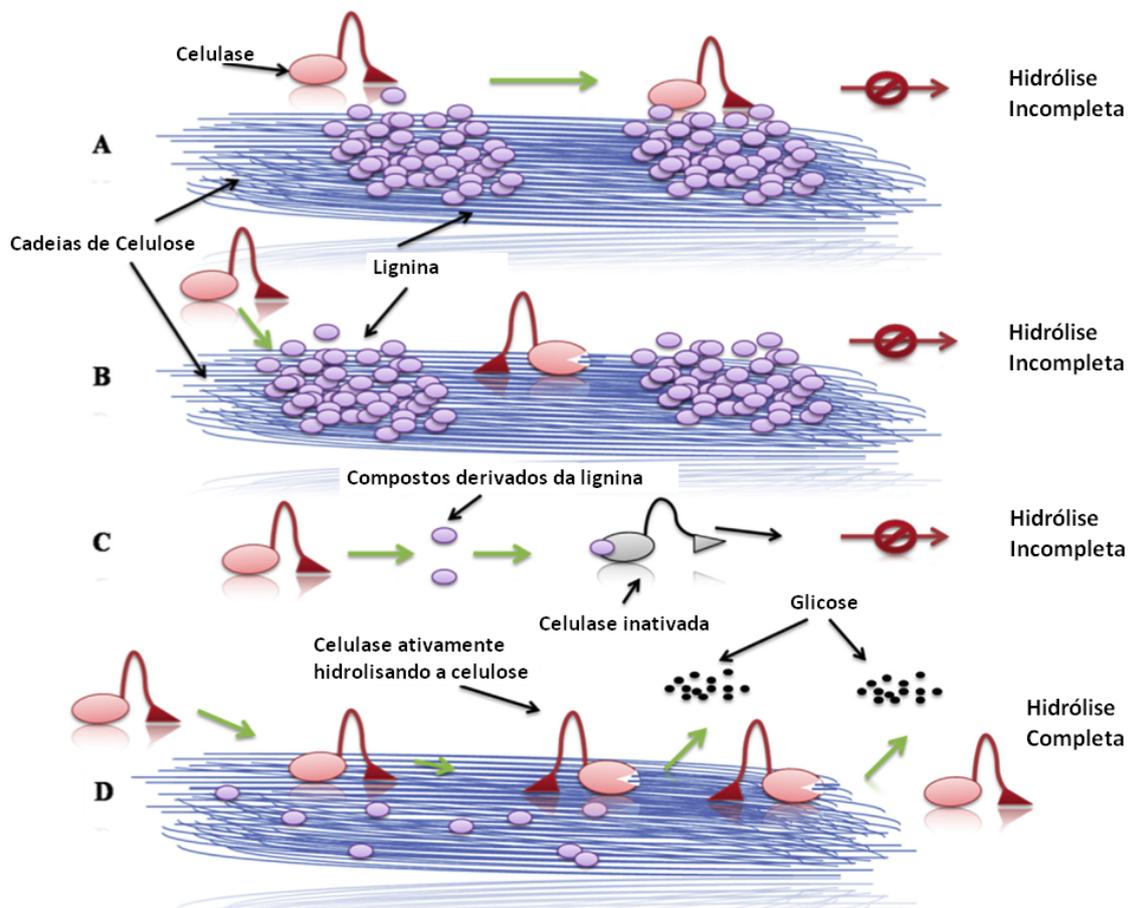


Figura 6. Inibição da celulase pela lignina. A) Adsorção improdutiva da celulase na lignina, B) bloqueio físico da lignina nos materiais lignocelulósicos, prejudicando a interação celulase-celulose, C) inibição da celulase pela lignina solúvel, e D) ação normal da celulase nas cadeias de celulose, liberando a glicose, em materiais sem ou com teor muito baixo de lignina (Adaptado de SAINI et al., 2016).

Dentre as estratégias para aumentar a eficiência do processo de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, reduzindo a adsorção improdutiva, o uso de aditivos, como por exemplo, proteínas não-catalíticas e agentes surfactantes, tem mostrado efeitos bastante positivos (Börjesson et al., 2007a; Méndez Arias et al., 2017a; Rocha-Martín et al., 2017; Saini et al., 2016; Yang & Wyman, 2006). A adição de surfactantes na hidrólise, principalmente os não-iônicos como o Tween, aumentou a conversão da celulose em açúcares fermentescíveis, principalmente quando este processo é precedido por uma etapa de pré-tratamento do substrato, o qual torna a superfície da lignina mais exposta, favorecendo a interação desta com os aditivos (Eriksson et al., 2002; Xin et al., 2017). A

adsorção de surfactantes pela lignina aumenta o rendimento do processo, uma vez que tem-se mais enzimas livres para interagir com a celulose (Börjesson et al., 2007a, 2007b; Xin et al., 2017). Outros mecanismos propostos incluem os surfactantes como sendo capazes de modificar a natureza do substrato, tanto aumentando a superfície disponível para a reação, como promovendo sítios para adsorção das enzimas (Eriksson et al., 2002; Kumar & Wyman, 2008). Surfactantes também podem ter um efeito estabilizador sobre as enzimas, prevenindo de modo eficaz a desnaturação destas durante a hidrólise, além de reduzirem a desativação das celulasas na interface ar-líquido do meio reacional (Bhagia et al., 2018; Kumar & Wyman, 2009; Xin et al., 2017).

O PEG (polietilenoglicol) também é um aditivo bastante reportado na literatura (Börjesson et al., 2007b; Kristensen et al., 2007; Li et al., 2012; Sipos et al., 2010). Segundo Borjesson et al., (2007b), o PEG se liga a lignina por meio de interações hidrofóbicas, sendo que esta interação é altamente dependente da temperatura. Este polímero apresenta uma alta densidade superficial na lignina, gerando, assim, uma repulsão histerica das enzimas, impedindo que estas sejam adsorvidas na lignina e aumentando a eficiência da hidrólise. A utilização do PEG 4000 aumentou em 46% a liberação de glicose, durante 24 horas de hidrólise da madeira de pinheiro pré-tratado a vapor, em relação à hidrólise da biomassa sem o aditivo (Börjesson et al., 2007a).

Akimkulova et al. (2016) utilizaram íons metálicos, como o Mg^{2+} , como aditivo e obtiveram resultados promissores, elevando em aproximadamente 20% a conversão da celulose após 24 horas de hidrólise da palha de trigo, em relação ao controle (hidrólise da biomassa sem aditivo). Com a adição destes íons, a superfície da lignina torna-se menos negativa, o que enfraquece as interações entre a lignina e as enzimas, reduzindo, assim, a adsorção improdutiva. Vasconcellos et al. (2016) também estudaram o efeito de íons metálicos na redução da adsorção improdutiva. A utilização do íon Mn^{2+} aumentou em 34% a liberação de glicose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido.

Há também na literatura estudos que utilizam proteínas não catalíticas, como por exemplo a BSA (albumina do soro bovino), para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática (Wang et al., 2015; Yang & Wyman, 2006; Zheng et al., 2008). A BSA apresenta uma alta afinidade pela lignina da biomassa, sendo adsorvida de forma competitiva e irreversível devido a interações hidrofóbicas entre a proteína e a lignina (Zheng et al., 2008). Isso faz com que a adsorção improdutiva da celulase seja reduzida, deixando mais enzima livre em solução, aumentando a conversão da celulose em açúcares e reduzindo o consumo enzimático. Segundo Yang & Wyman (2006), o tratamento com BSA, antes de se adicionar as enzimas, reduz, principalmente, a adsorção da β -glicosidases na lignina, uma vez que esta apresenta maior afinidade pela β -glicosidase do que por outras celulases. Tal estudo apresentou um aumento de aproximadamente 20% na conversão da celulose em glicose após 24 horas de hidrólise da palha de milho pré-tratada com ácido em relação ao controle.

Apesar de ser um aditivo amplamente reportado na literatura, a BSA é uma proteína de custo elevado, o que pode encarecer ainda mais o processo de hidrólise. Nesse sentido, Brondi et al. (2019) testaram o uso de aditivos de menor custo como a peptona de soja, zeína e triptona. Todos os aditivos estudados aumentaram a liberação de glicose, com destaque para a triptona e zeína que obtiveram performances semelhantes a da BSA, elevando em 22% e 17%, respectivamente, a glicose liberada. A utilização do farelo de soja durante a hidrólise da Avicel também foi avaliado por Bhagia et al. (2018). Os autores observaram que o farelo teve efeitos positivos na hidrólise semelhantes aos obtidos pela BSA e Tween, destacando que o efeito benéfico se deve, principalmente, as propriedades anfífilas da proteína presente no farelo. Além disso os autores salientaram que a utilização do farelo de soja se faz vantajosa devido ao baixo custo deste insumo.

O efeito da proteína de soja como aditivo para reduzir a adsorção improdutiva também foi recentemente avaliado (Brondi et al., 2019; Florencio et al., 2019, 2016).

Florencio et al. (2016) promoveram um aumento de duas vezes na glicose liberada durante a hidrólise, utilizando coquetéis enzimáticos de *T. reesei* e *A. niger*, produzidos “in-house”, em relação ao controle (hidrólise sem aditivo), apresentando um efeito melhor do que a BSA. Brondi et al. (2019) estudaram o efeito da adição da proteína de soja na hidrólise do bagaço de cana de açúcar pré-tratado por explosão a vapor, utilizando o coquetel enzimático comercial Cellic CTec2[®], e aumentaram a liberação de glicose em até 39%. Florencio et al. (2019) avaliaram o efeito da proteína de soja tanto na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, quanto no bagaço hidrotérmico, utilizando a enzima Cellic CTec2[®]. Em ambos os casos a proteína aumentou a sacarificação enzimática da biomassa, sendo que foi para o pré-tratamento hidrotérmico que o efeito se mostrou mais pronunciado, aumentando-se a quantidade de glicose liberada em mais de 76% em relação a hidrólise na ausência do aditivo, após 24 horas e utilizando-se 12%(m/m) de proteína, 15% (m/v) de biomassa e uma carga enzimática de 5 FPU/g de sólidos. Os autores também mostraram que a carga de sólidos, o tipo de pré-tratamento e a carga enzimática influênciam no efeito do aditivo durante a hidrólise, embora um estudo aprofundado para a otimização destas variáveis não tenha sido realizado.

Além destes efeitos positivos relatados na literatura, a proteína de soja ainda apresenta a vantagem de ter um custo menor do que os outros aditivos já citados (Brondi et al., 2019; Klein-Marcuschamer et al., 2012). Ademais, o uso da proteína de soja como aditivo na hidrólise da biomassa teria grande vantagem do ponto de vista de logística de transporte em uma biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol, aproveitando-se a evidente sinergia entre os dois processos de produção dos biocombustíveis (a partir da soja e da cana de açúcar).

3.5. Proteína de soja

A soja é a leguminosa que apresenta o maior teor proteico em seus grãos, apresentando valores acima de 40% de proteína em sua constituição (Fischer, 2006). Em geral, o processamento da soja envolve a remoção do óleo por extração com solvente (sendo o hexano o mais utilizado), podendo este ser posteriormente processado em biorrefinarias para a obtenção do biodiesel, e a obtenção do farelo proteico (Mandarino et al., 2015). Após a extração do óleo, o farelo de soja é moído e peneirado e apresenta entre 52-54% de proteína (Deak et al., 2008). Para se obter a proteína isolada, a proteína do farelo é solubilizada em meio alcalino e separada da farinha por centrifugação. A solução com a proteína é então acidificada para que haja a precipitação desta. Posteriormente, esta passa por sucessivas lavagens com água para que ocorra o aumento de sua pureza e é seca em Spray-dryer, apresentando um teor proteico superior a 90% no final do processo (Lusas & Riaz, 1995). As principais proteínas presentes na soja são a glicinina e a β -conglucina, sendo a primeira geralmente encontrada em maior proporção (25-35% das proteínas totais presentes nos grãos). A glicinina apresenta grupos hidrofóbicos em sua superfície, sendo que quando submetida a processos de aquecimento térmico, sua hidrofobicidade pode ser aumentada (Wang et al., 2014).

Desse modo, em uma biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol, a utilização da proteína de soja como aditivo no processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar faz-se interessante pois esta seria um subproduto obtido a partir produção do biodiesel de soja. Por já estar dentro da planta industrial, seu custo seria reduzido e, ademais, esta poderia ser obtida sem precisar passar por todas as etapas de processamento as quais a proteína isolada é submetida antes de ser vendida comercialmente.

3.6. Biorrefinarias integradas

Biorrefinarias são instalações que integram processos de conversão de biomassas em produtos de maior valor agregado como, por exemplo, produtos químicos, biomateriais e energia. Os objetivos dessas instalações são a otimização de recursos e a minimização dos efluentes gerados (Cherubini, 2010; Clark & Deswarte, 2008). Para tanto, as biorrefinarias utilizam processos de conversão físicos, químicos, biológicos e térmicos, ou a combinação destes, para a obtenção de seus produtos (Naik et al., 2010).

No Brasil costuma-se intercalar culturas agrícolas de cana-de-açúcar e de soja. Desse modo, biorrefinarias que utilizem a cana e a soja como matérias-primas poderiam gerar produtos de grande interesse comercial como, por exemplo, o biodiesel, o bioetanol, a glicerina e eletricidade (Souza & Seabra, 2013). No entanto, de modo a integrar os processos destas instalações de forma sinérgica e reduzir custos de produção, desafios tecnológicos precisam ser superados. Dentre estes desafios encontra-se o aumento da eficiência do processo de hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas.

Outra integração possível de biorrefinaria seria a da produção do etanol de primeira geração (1G) e o de segunda geração (2G). Nas usinas de etanol 1G, o bagaço de cana é um subproduto do processo, sendo destinado, principalmente, para a geração de energia das unidades. Um outro destino para esse bagaço seria a sua utilização para a produção do etanol 2G. A integração destes dois processos poderia trazer vantagens econômicas e sustentáveis, viabilizando, assim a produção do etanol 2G (Dias et al., 2013; Furlan et al., 2013; Joelsson et al., 2016). De acordo com Junqueira et al. (2017), a longo prazo (entre os anos de 2026 – 2030), considerando os avanços tecnológicos associados a produção do etanol 2G e ao processamento da cana energia, espera-se que biorrefinarias integradas aumentem a produção de etanol em 76%, além disso, os autores avaliam que o custo de produção do etanol 2G se tornará inferior ao do 1G. Uma avaliação do ponto de vista

ambiental também foi realizada, mostrando que as produções de etanol 1G e 2G são capazes de reduzir o impacto ambiental quando comparados à gasolina, sendo que a produção de etanol 2G é a que apresenta menor prejuízo ao meio ambiente (Junqueira et al., 2017). Vale destacar que nesse tipo de biorrefinaria, o etanol não seria o único produto obtido pelo processo, podendo-se produzir, também, polímeros, fertilizante e biogás entre outros produtos. A Figura 7 apresenta um esquema geral de uma biorrefinaria 1G-2G, com a possibilidade de produtos obtidos a partir da conversão da cana-de-açúcar.

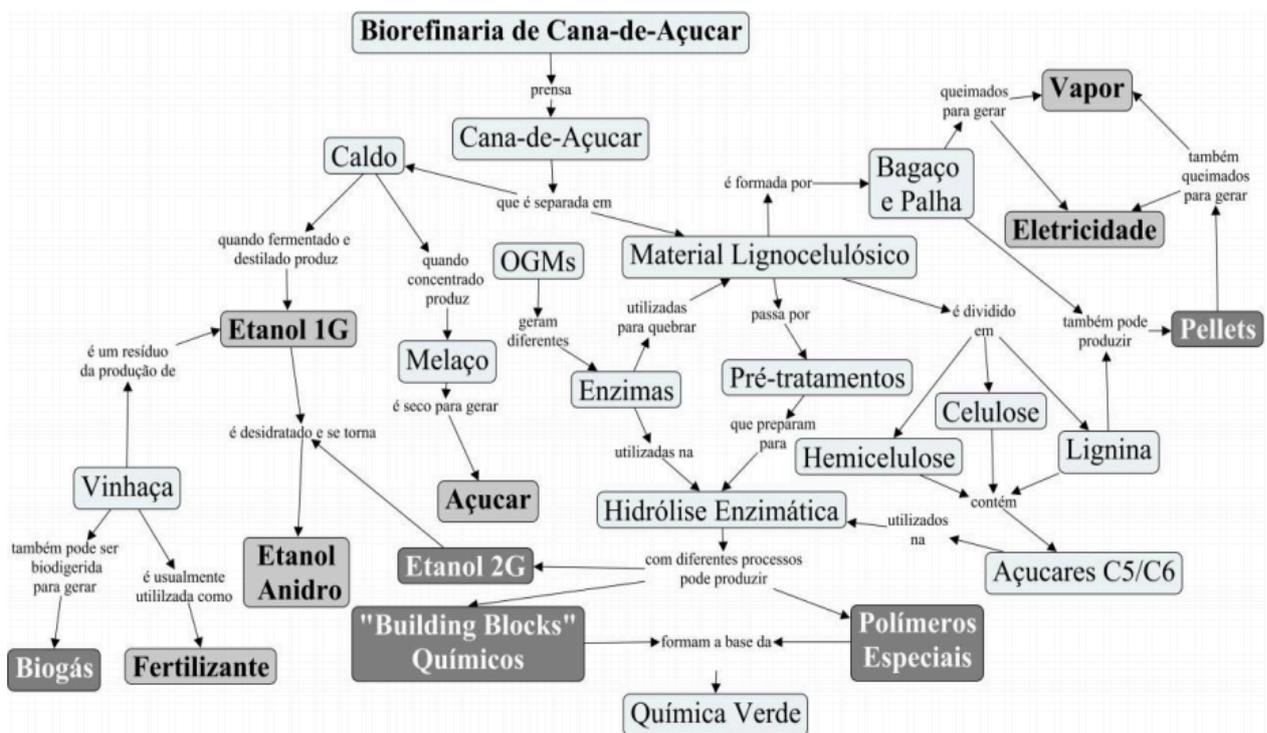


Figura 7. Representação esquemática das etapas e produtos envolvidos em uma biorrefinaria 1G-2G (Mendonça et al., 2017)

A avaliação tecno-econômica de biorrefinarias integradas é de grande importância para que se entenda e viabilize a produção destas unidades. É nesse sentido que pesquisadores do LaDABio/UFSCar estão trabalhando de forma a avaliar a operação dessas biorrefinarias em simuladores de processos, identificando os gargalos a serem

sanados e definindo metas de desempenho a serem atingidas de forma a tornar essas biorrefinarias integradas economicamente viáveis. Uma das formas de realizar esta análise está representada no próximo item.

3.7. Análise tecno-econômica reversa do processo

A abordagem convencional para análise tecno-econômica de um novo processo, a ser integrado a uma planta industrial, consiste em realizar simulações da planta, para uma determinada configuração operacional, utilizando simuladores de processos como, por exemplo o ASPEN[®], e a seguir proceder à verificação da viabilidade econômica daquela situação. Esse é um processo iterativo, demandando mais tempo e a intervenção do analista de forma contínua.

Recentemente foi proposta uma metodologia alternativa: utilizando um simulador de processos baseado em equações (o EMSO[®], Soares & Secchi, 2003), inclui-se um determinado índice econômico (por exemplo, Valor Presente Líquido (VPL) da planta industrial nulo) como mais uma equação a ser resolvida pelo simulador, liberando-se com isso alguma especificação que seria necessária para zerar os graus de liberdade do sistema. Com isso, geram-se facilmente curvas “isoeconômicas” que fornecem metas de desempenho, a serem buscadas experimentalmente, que permitirão identificar e superar os gargalos econômicos existentes (Furlan, 2016). Tal metodologia foi denominada Análise Tecno-econômica Reversa ou Retro Tecno-econômica. O mesmo procedimento, diga-se, pode ser aplicado utilizando critérios de impacto ambiental.

Tal técnica foi aplicada no contexto de simular uma biorrefinaria integrada de etanol 1G e 2G (Furlan et al., 2016; Longati et al., 2018), além de estar ainda em fase de desenvolvimento para a integração desta unidade com a biorrefinaria de biodiesel. A Figura 8 ilustra um resultado típico obtido por esta metodologia, para uma biorrefinaria

1G-2G, na qual são apresentadas as curvas “isoeconômicas” para a carga enzimática em função da fração mássica de sólidos, para diferentes conversões da hidrólise durante 48 horas de processo. A partir deste gráfico, tem-se que, por exemplo, para uma carga de sólidos de 20% e uma carga enzimática de 5 FPU/g de celulose, a mínima conversão de hidrólise necessária para que o processo apresente Valor Presente Líquido (VPL) igual a zero é de 60%. Valores acima deste valor de conversão representam viabilidade econômica; abaixo deste valor, o processo apresenta inviabilidade. Conversões acima de 100% são não-factíveis. A Figura 9 apresenta o fluxograma geral da biorrefinaria 1G-2G simulada no ambiente EMSO. Os processos identificados dentro da área 1G são referentes a produção do etanol de primeira geração; as etapas destacadas dentro da região 2G referem-se ao etanol lignocelulósico. A figura também apresenta as correntes que integram ambos os processos.

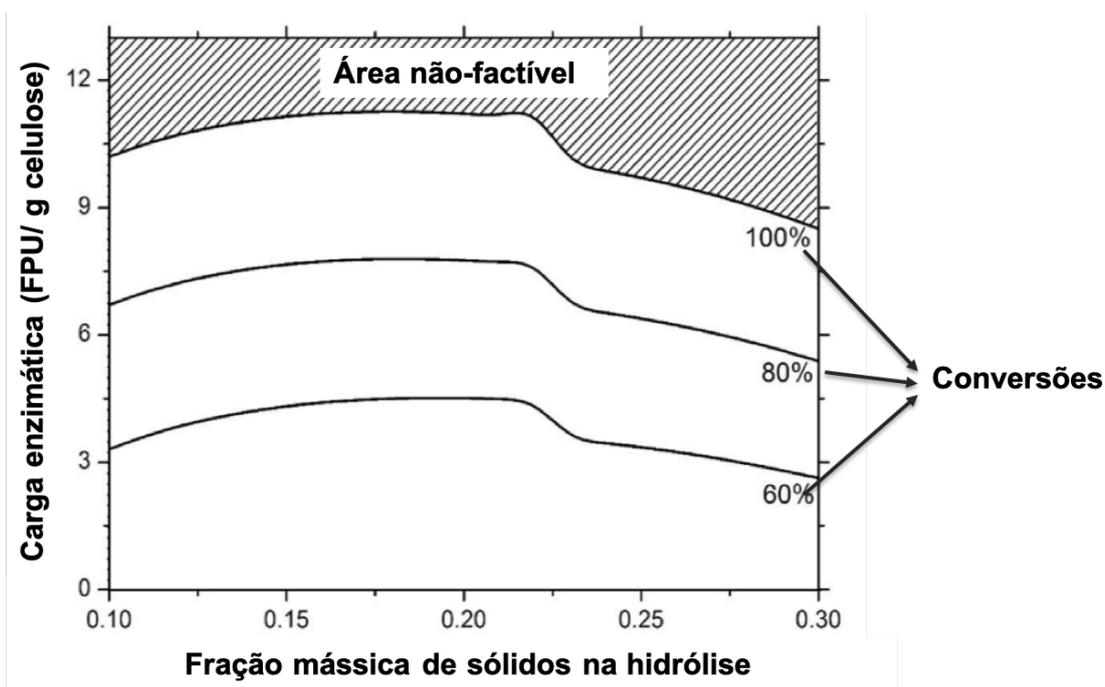


Figura 8. Regiões de viabilidade econômica da biorrefinaria de etanol 1G-2G, obtidas através da análise retro tecno-econômica, para 48 horas de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente (Adaptado de Longati et al., 2018).

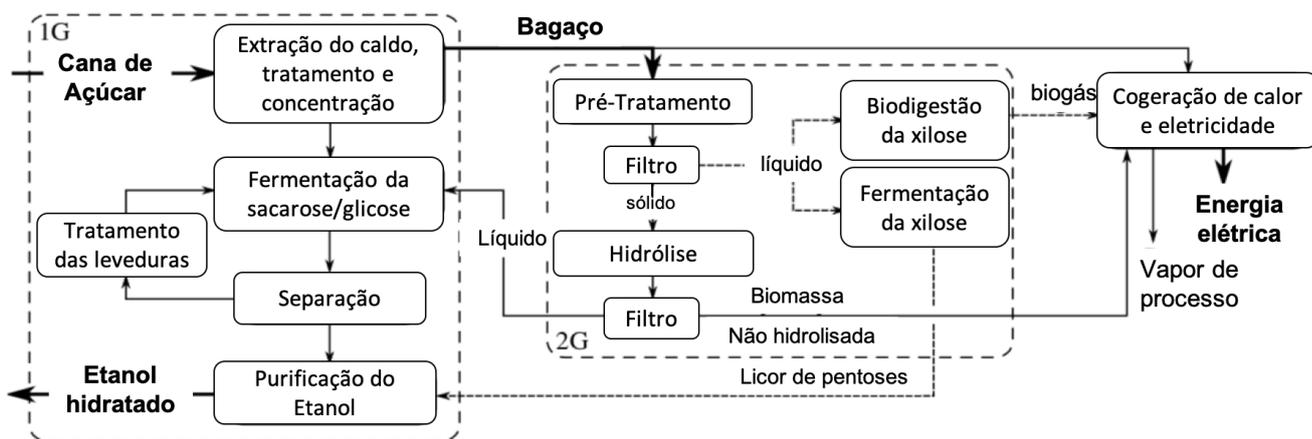


Figura 9. Fluxograma geral da biorrefinaria integrada de etanol 1G-2G (Adaptado de Furlan et al., 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Substratos

O material lignocelulósico utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática foi o bagaço de cana de açúcar. Este foi gentilmente cedido pela Usina Ipiranga, localizada em Descalvado-SP.

O bagaço in natura foi moído de modo a apresentar um diâmetro de partícula menor do que 2,5 mm e pré-tratado hidrotérmicamente (LHW). O pré-tratamento foi realizado em um reator de 5L (modelo 4580, Parr Instruments) utilizando uma carga de sólidos de 10% e 15% (m/v), a temperatura de 195°C por 10 minutos. Após o processo, o bagaço foi seco a temperatura ambiente até obter umidade inferior a 10%. A biomassa pré-tratada foi previamente caracterizada conforme metodologia descrita por Gouveia et al. (2009), apresentando a seguinte composição: 56% celulose, 29% lignina, 6% hemicelulose e 4 % cinzas (Florencio et al., 2016). Antes da realização dos experimentos de hidrólise o bagaço foi moído e peneirado de forma a ter uma granulometria menor ou igual a 1 mm. Nos experimentos, utilizou-se tanto o bagaço que não foi lavado após o pré-tratamento, quanto o lavado. A lavagem do bagaço pré-tratado com 10% de sólidos ocorreu com água à 60°C, até que o pH do licor extraído da lavagem apresentasse pH neutro (6,9). A biomassa pré-tratada com 15% de sólidos, foi submetida a três estágios de lavagem, com água à 90°C e um teor de sólidos em cada etapa de 10% (m/v).

A hidrólise também foi realizada em substratos sem lignina. Para tanto, utilizou-se celulose microcristalina (Celufloc 200, Celuflok, Brasil e Avicel PH-101, Sigma-Aldrich, EUA).

4.1.2. Aditivos: Proteína de soja e Tween 80

Nos estudos foi utilizada a proteína de soja isolada como aditivo (teor proteico \geq 90%, Bremil, RS, Brasil). Inicialmente esta foi utilizada em diferentes concentrações a fim de se realizar o planejamento experimental estatístico de modo a otimizar a sua concentração. Após o planejamento, a carga de proteína foi fixada em 12% (massa de proteína de soja/massa de biomassa).

A proteína foi avaliada em sua forma in natura e também após ser submetida a um processo de desnaturação térmica, que teve como objetivo aumentar a hidrofobicidade desta e favorecer a sua interação com a lignina da biomassa. As temperaturas/tempos de desnaturação foram: 60°C / 90 min, 70°C / 60 min e 90°C / 30 min. A desnaturação foi realizada em shakers para as temperaturas de 60 e 70°C, com agitação de 175 rpm e em banho de água para a temperatura de 90°C.

O efeito da fração solúvel da proteína de soja isolada também foi avaliado. Para tanto, soluções com concentrações de 1,5, 7,5, 18, 30 e 100 g/L de proteína de soja em tampão citrato de sódio, 50 mM, foram colocadas em uma estufa, a 50°C, 30 rpm, por 24 horas. Após o processo, as soluções foram centrifugadas e o sobrenadante contendo a fração solúvel da proteína foi separado.

O efeito do Tween 80 (Monolaurato de Polioxietilenosorbitan, Dinamica, Brasil) como aditivo também foi avaliado. As concentrações estudadas foram 0,1% e 0,25% (m/v). Este foi testado na presença e ausência da proteína de soja.

4.1.3. Enzima

O extrato enzimático comercial utilizado foi a Cellic CTec3[®] (Novozymes, PR, Brasil). A atividade celulolítica do coquetel enzimático, em FPU/mL, foi determinada seguindo metodologia proposta por Ghose, (1987), no tampão citrato de sódio, 50 mM e

pH 4,8, utilizando-se papel de filtro Whatman N°1. O efeito da Cellic CTec2® (Novozymes, PR, Brasil) também foi avaliado, de modo a comparar o efeito da proteína de soja na hidrólise com ambos os extratos enzimáticos.

4.2. Hidrólise enzimática

A capacidade do extrato enzimático comercial Cellic CTec3® em hidrolisar o bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente foi avaliada na presença e ausência do aditivo (proteína de soja). Inicialmente, as hidrólises foram realizadas em frascos de 5 mL, nos quais o bagaço, a enzima, o aditivo e o tampão (citrato de sódio, 50 mM, pH 4,8) foram incubados em uma incubadora rotacional com mixer de 360° a 50°C e 30 rpm. Após a definição das condições da hidrólise nos frascos de 5 mL, estas foram testadas em reator do tipo Tanque Agitado.

Após os experimentos de hidrólise, o sobrenadante foi centrifugado e quantificou-se a glicose liberada durante o processo de modo a avaliar o efeito do aditivo. Todos os experimentos e análises foram realizadas em triplicatas. As metodologias apresentadas entre os itens 4.2.1 e 4.2.8 correspondem às hidrólises realizadas nos frascos de 5 mL. Com exceção de quando for especificado (item 4.2.6), as hidrólises foram realizadas com o bagaço pré-tratado com 10% (m/v) de sólidos no reator Parr, sem que este passasse por uma posterior etapa de lavagem.

4.2.1. Definição das cargas de sólidos e de aditivo a serem utilizadas experimentalmente

A fim de avaliar o efeito das variáveis carga de sólidos e concentração de aditivo, utilizou-se a metodologia do planejamento experimental estatístico, na qual estas

variáveis foram analisadas de modo a definir os valores que implicariam na maior concentração de glicose, ART (açúcares redutores totais), ganho e conversão da biomassa. Estes experimentos foram realizados com uma carga fixa de enzimas de 5 FPU/g de bagaço e em 24 h de reação. As concentrações de aditivo e a carga de sólidos utilizadas serão posteriormente especificadas durante a apresentação da metodologia utilizada para a realização do planejamento experimental. Nesta etapa, utilizou-se uma carga baixa de enzima (5 FPU/g de sólidos) de modo a evitar que esta mascarasse o efeito positivo da proteína de soja na hidrólise.

4.2.2. Avaliação do perfil temporal

Após a definição das cargas de sólidos e de proteína de soja a serem utilizadas experimentalmente, o perfil temporal da hidrólise foi avaliado para cargas de enzima de 5, 10, 15 e 20 FPU/g bagaço, carga de sólidos de 15% (m/v) e concentração de proteína de soja de 12% (m/m), nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

4.2.3. Efeito da proteína de soja solúvel

O efeito da fração solúvel da proteína de soja foi analisado e comparado com o efeito total desta (fração solúvel + insolúvel). Para tanto, soluções com concentrações de 1,5, 7,5, 18, 30 e 100 g de proteína/L de tampão citrato foram colocadas na estufa com o mixer de 360°, 50°C e 30 rpm por 24 horas. Após esse período, as soluções foram centrifugadas e a fração líquida, contendo apenas a proteína solúvel, foi separada e utilizada na hidrólise enzimática. A quantificação da proteína solúvel presente no sobrenadante foi realizada utilizando-se o reagente bicinonínico (BCA).

A sacarificação foi realizada com uma carga de enzimas de 10 FPU/g de biomassa, carga de sólidos de 15% (m/v), por 24 horas. A glicose liberada após o processo foi comparada com a quantidade liberada utilizando-se a fração total de proteína (solúvel + insolúvel) como aditivo.

4.2.4. Efeito da proteína de soja desnaturada

De acordo com Wang et al. (2014), quando submetida a processos de desnaturação térmica, a proteína de soja pode aumentar sua hidrofobicidade. Tal efeito poderia favorecer a interação da proteína com a lignina do bagaço. Desse modo, avaliou-se o efeito da proteína de soja desnaturada termicamente em três tempos/temperaturas (conforme descrito no item 4.1.2) durante a hidrólise para uma carga de enzimas de 10 FPU/g de bagaço, carga de sólidos de 15% (m/v) e 12% (m/m) de aditivo, por 24 horas. Após a desnaturação, esperou-se até que a solução de tampão com a proteína desnaturada retornasse a temperatura ambiente antes da adição da enzima.

4.2.5. Pré-incubação da proteína de soja com o bagaço

Avaliou-se o efeito da pré-incubação da proteína de soja com o bagaço e o tampão por tempos de 2, 4, 6 e 24h, a 50°C. Após esse período, a enzima (10 FPU/g) foi adicionada ao meio reacional, realizando-se a hidrólise por 24 h, para as cargas de sólidos e de proteína definidas nas etapas anteriores do estudo (15% (m/v) e 12% (m/m), respectivamente).

4.2.6. Efeito da proteína de soja em diferentes substratos

O efeito de 12% (m/m) de proteína de soja na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente (com 10% e 15% (m/v) de sólidos no pré-tratamento, sem e com posterior lavagem da biomassa) foi comparada com a hidrólise da celulose microcristalina (Celufloc e Avicel PH101). Os experimentos foram realizados com 15% (m/v) de sólidos na hidrólise, carga enzimática de 10 FPU/g de enzima, por 24 h a 50°C.

4.2.7. Efeito da proteína de soja no extrato enzimático comercial Cellic CTec2®

Os efeitos dos extratos enzimáticos comerciais Cellic CTec2® e 3 foram comparados durante a hidrólise do bagaço hidrotérmico. A sacarificação foi realizada com 15% de sólidos no pré-tratamento, 10 FPU/g de bagaço, 12% de proteína de soja, por 24h a 50°C.

4.2.8. Associação dos aditivos proteína de soja e Tween 80

Avaliou-se o efeito da associação dos aditivos Tween 80 e proteína de soja. Para tanto, testou-se duas concentrações de Tween na hidrólise do bagaço de cana: 0,1 e 0,25% (m/v). Ambas concentrações foram associadas com 1, 5 e 12% (m/m) de proteína. A hidrólise apenas com o Tween como aditivo também foi realizada. Os experimentos ocorreram com 15% (m/v) bagaço, 10 FPU/g sólidos, por 24h a 50°C.

4.2.9. Avaliação da sacarificação enzimática em biorreator

Após a definição das condições da hidrólise nos frascos de 5 mL, estas foram testadas em reator do tipo Tanque Agitado. O biorreator possui um volume de trabalho de 500 mL, diâmetro interno de 0,085 m e altura de 0,140 m, com dois impelidores do tipo orelha de elefante com três lâminas cada, espaçados em 0,040 m. A sacarificação enzimática no biorreator foi realizada com um teor de sólidos de 15% (m/v), carga enzimática de 10 FPU/g de sólidos, na ausência e presença dos aditivos proteína de soja e Tween 80, por 24 h, 50°C e 250 rpm. Avaliou-se a hidrólise com 12% de proteína como aditivo, 0,1% (m/v) de Tween e associando 1% (m/m) de proteína com 0,1% (m/v) de Tween. A representação esquemática do aparato experimental utilizado, assim como as dimensões características do reator, está representada na Figura 10 (a) e (b), respectivamente.

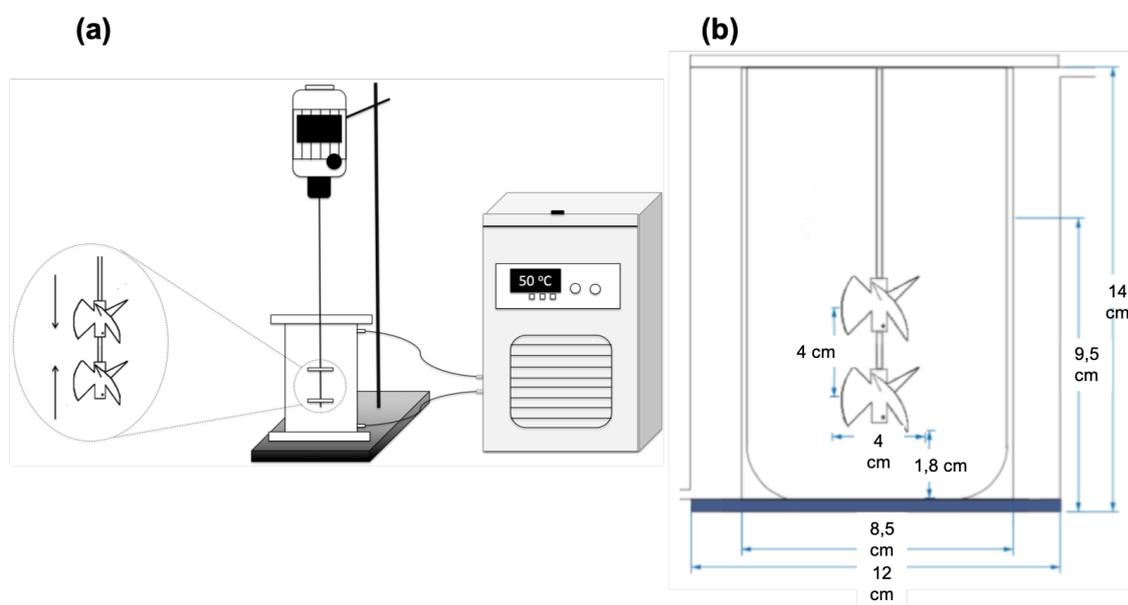


Figura 10. (a) Aparato experimental utilizado durante a hidrólise no reator do tipo tanque agitado. (b) Dimensões características do reator (Adaptado de Squinca, 2017).

4.3. Adsorção

Simultaneamente e seguindo as mesmas condições dos experimentos de hidrólise, foram realizados controles sem a adição de enzima, de modo a estudar a interação da proteína de soja com a lignina da biomassa. Para isso, após os experimentos a suspensão foi filtrada a vácuo e seca em estufa por 1 hora a 50 °C. Posteriormente, as amostras sólidas foram caracterizadas por FTIR e pela Análise CHN (Carbono, Hidrogênio e Oxigênio).

De modo a avaliar os efeitos das interações eletrostáticas entre a lignina e a proteína, realizaram-se experimentos de adsorção da proteína no bagaço em diferentes pHs (tampão citrato, pHs 3, 4, 5 e 6) e diferentes concentrações de cloreto de sódio (0, 50, 100, 200 e 400 mM).

4.4. Quantificação da glicose liberada e dos açúcares redutores totais

A quantidade de glicose liberada durante a hidrólise foi determinada utilizando-se um kit enzimático de glicose oxidase (Labtest, Brasil), no qual a concentração desta foi determinada por meio da leitura da absorbância da amostra a 505 nm em um espectrofotômetro UV/VIS. Os gráficos da porcentagem de ganho na liberação de glicose com o uso do aditivo em relação ao controle (hidrólise do bagaço sem a proteína de soja) foram obtidos por meio da seguinte conversão (Equação 1):

$$\% \text{ ganho} = \left(\frac{\text{Glicose liberada utilizando-se o aditivo}}{\text{Glicose liberada pelo controle}} - 1 \right) * 100\% \quad (1)$$

O cálculo da conversão enzimática da biomassa foi realizado de acordo com a Equação 2, onde m_{glicose} corresponde a massa de glicose quantificada após a hidrólise, 0,9 é um fator de conversão devido a adição de uma molécula de água pela glicose durante a hidrólise e $m_{\text{bagaço}}$ é a massa de biomassa utilizada na hidrólise.

$$\% \text{ Conversão} = \left(\frac{m_{\text{glicose}} * 0,9}{m_{\text{bagaço}} * \text{teor de celulose}} \right) * 100\% \quad (2)$$

Os açúcares redutores totais liberados foram quantificados utilizando-se o método de DNS (Miller, 1959).

4.5. Efeito da proteína de soja na atividade e estabilidade da Cellic CTec3[®]

A influência da proteína de soja na atividade e estabilidade Cellic CTec3[®] foi avaliada por meio da incubação das enzimas e do aditivo em tampão citrato de sódio. As concentrações de enzima, tampão e proteína foram os mesmos utilizados nos experimentos de hidrólise enzimática (12% (m/m) de proteína e 10 FPU/g). Avaliou-se o efeito da proteína logo após a sua adição à solução enzimática (tempo zero) e após 24 horas de incubação destas, a 50°C e 30 rpm, na estufa com rotor de 360°.

A atividade da enzima (com e sem proteína de soja) foi avaliada por meio da atividade desta em papel de filtro (FPAse), seguindo a metodologia proposta por Ghose, (1987).

4.6. Análise CHN

Para determinar as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas amostras sólidas do bagaço adsorvido com a proteína, foi utilizada a técnica de Análise Elementar (CHN). Seu funcionamento é baseado no processo de combustão das amostras em uma atmosfera de oxigênio puro. Após a combustão, os gases resultantes são quantificados por detector TCD (detector de condutividade térmica). A análise foi realizada em um equipamento da marca Perkin Elmer, modelo 2400.

4.7. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia por FTIR fornece informação estrutural sobre a natureza e a conformação dos grupos funcionais presentes nos materiais lignocelulósicos. Isso é obtido por meio da correlação entre as bandas espectrais obtidas e as absorções específicas de cada grupo funcional presente no material (hidroxilas, cetonas, anéis aromáticos, alcenos, ésteres e álcoois) (Rodríguez-Zúñiga et al., 2014).

As amostras de bagaço após a adsorção foram analisadas no Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da marca Bruker, modelo Vertex 70, utilizando o acessório ATR (leitura por Refrattância Total Atenuada). Os espectros das amostras ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) foram adquiridos com 4 cm^{-1} de resolução, com 32 escaneamentos por amostra. Os espectros foram normalizados em relação a banda de 1031 cm^{-1} .

4.8. Planejamento experimental, análise da metodologia de superfície de resposta e função desejabilidade

A fim de avaliar o efeito das variáveis independentes carga de sólidos e concentração de proteína de soja na liberação de glicose, de açúcares redutores totais, no ganho e na conversão da celulose em glicose (parâmetros dependentes a serem avaliados) durante a hidrólise, utilizou-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) do tipo 2^2 , com triplicatas no ponto central e pontos axiais distantes em $\pm \alpha$, com $\alpha = 2^{1/2}$. A Tabela 1 apresenta a matriz codificada do planejamento, assim como os valores de carga de sólidos e de proteína de soja utilizados.

Tabela 1. Matriz utilizada no planejamento experimental realizado.

Ensaio	Carga de Sólidos		Carga de Proteína de Soja	
	Codificado	% (m/v)	Codificado	% (m/m)
1	- 1	10	- 1	4
2	+ 1	20	- 1	4
3	- 1	10	+ 1	12
4	+ 1	20	+ 1	12
5	- 1,41	8	0	8
6	+ 1,41	22	0	8
7	0	15	- 1,41	2,4
8	0	15	+ 1,41	13,6
9	0	15	0	8
10	0	15	0	8
11	0	15	0	8

Após a elaboração do planejamento, os resultados foram avaliados utilizando-se o software STATISTICA®, versão 13.3. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 0,05 (nível de confiança de 95%). A adequabilidade do modelo foi verificada por meio do teste F. Realizou-se, também, a análise gráfica das superfícies de resposta para determinar as melhores condições do processo para cada uma das variáveis dependentes analisadas. O ajuste do modelo estatístico aos dados experimentais foi expresso por meio do coeficiente de determinação R^2 .

Após a obtenção das superfícies de resposta para cada uma das variáveis dependentes, utilizou-se a Função Desejabilidade presente no STATISTICA de modo a se determinar, no espaço amostral avaliado, os valores de carga de sólidos e de proteína de soja que maximizaria uma ponderação das quatro variáveis dependes: liberação de glicose, de açúcares redutores, a conversão da celulose em glicose e o ganho. Assim, essa função foi utilizada de modo a se obter uma diretriz a ser seguida experimentalmente (em relação as variáveis independentes analisadas) que implicasse em uma alta conversão, ganho e liberação de açúcares.

A Função *Desirability* ou Desejabilidade foi desenvolvida por Harrington (1965) e foi mais tarde aperfeiçoada por (Derringer & Suich, 1980), e é utilizada na otimização de processos com múltiplas respostas. O método permite determinar as condições experimentais que garantem, segundo critérios estabelecidos pelo usuário, o melhor valor de resposta conjunta (mais desejável) para todas as variáveis dependentes analisadas.

O princípio de funcionamento do método baseia-se no fato de que, a partir da aplicação do planejamento experimental (no caso desde estudo utilizou-se o Delineamento Central Composto Rotacional) obtêm-se equações que associam as variáveis dependentes estudadas em função das independentes. As equações obtidas

apresentam a seguinte forma: $Y_n = f(\text{CS}, \text{PS})$, onde Y_n são as variáveis dependentes (neste estudo quatro variáveis foram analisadas, sendo elas concentração de glicose, de ART, conversão e ganho), CS é a carga de sólidos e PS a de proteína de soja, e são válidas dentro da região avaliada, apresentada na Tabela 1.

A partir destas equações, cada uma das respostas obtidas foi transformada de modo que elas obtenham valores pertencentes ao intervalo de $[0, 1]$. A função transformada é denominada d_i , sendo que o valor desta aumenta a medida que a resposta se aproxima aos limites impostos pelo usuário. A Equação 3 apresenta a determinação da função desejabilidade global (D), a partir da combinação de cada desejabilidade individual transformada (d_i), por meio de uma média geométrica, onde k denota o número de respostas a serem avaliadas (Pimenta et al., 2014).

$$D = (d_1(Y_1) \times d_2(Y_2) \times \dots \times d_k(Y_k))^{1/k} \quad (3)$$

De maneira geral, o valor de D avalia os níveis do conjunto combinado de respostas. Esta variável também apresenta valores pertencentes ao intervalo de $[0, 1]$, e será maximizada quanto todas as variáveis se aproximarem o máximo possível das especificações desejadas pelo estudo, sendo que, quanto mais próximo de 1 estiver D, mais próximas as variáveis dependentes estão dos valores desejados. Zero representa um valor inaceitável. O ponto de ótimo geral do sistema é o ponto atingido pela maximização da equação 3 (Paiva, 2008).

A vantagem em se utilizar a média geométrica é que esta leva ao alcance da solução global de forma balanceada, possibilitando que todas as respostas atinjam os valores esperados e forçando o algoritmo a se aproximar das especificações impostas. Quando isso não é possível, o algoritmo gera uma solução inviável ao problema (Paiva, 2008).

Neste trabalho, deseja-se maximizar as variáveis dependentes aqui estudadas, para que a hidrólise tenha elevados ganhos, conversão e liberação de açúcares. Para este caso, as funções desejabilidade individuais são calculadas pela Equação 4.

$$d_i = \begin{cases} 0 & \text{se } Y_i < L_i \\ 1 & \text{se } Y_i > A \\ \left[\frac{(Y_i - L_i)}{(A - L_i)} \right]^t & \text{se } Y_i > L_i \end{cases} \quad (4)$$

Onde, d_i é a desejabilidade individual de cada variável; Y_i é o valor da resposta em cada ponto estudado da variável dependente i ; L_i é o limite inferior dos valores obtidos para a variável i na região experimental avaliada (menor valor); e A é o valor alvo (mais desejado). Para $d_i = 0$, a resposta obtida é totalmente indesejada; se $d_i = 1$, a resposta obtida é altamente desejada (valor alvo). Quanto mais próximo de 1, maior a desejabilidade do valor obtido.

O valor de t indica a importância do valor alvo. Se $t = 1$, a função desejabilidade aumenta linearmente na direção de A ; se $t > 1$, a função é convexa; para $t < 1$, a função é côncava (Pimenta et al., 2014).

Após a aplicação desta metodologia aos dados obtidos pelo planejamento experimental, os valores das variáveis independentes que otimizavam as respostas conversão enzimática, ganho, liberação de glicose e liberação de ART, dentro da região avaliada experimentalmente, foram 15% (m/v) de bagaço e 12% (m/m) de proteína. A validação dos modelos obtidos foi realizada para esses pontos experimentais.

4.9. Análise Tecno-Econômica Reversa

Seguindo a metodologia descrita em Furlan et al. (2016), as metas de desempenho do reator de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado hidrotêrmicamente foram obtidas através de simulações no ambiente EMSO (Environment for Modeling Simulation and Optimization). A simulação da biorrefinaria 1G-2G no EMSO foi baseada na utilizada por Longati et al. (2018).

Inicialmente, geraram-se curvas isoeconômicas as quais permitiram avaliar o efeito das variáveis carga enzimática, carga de sólidos, concentração de proteína de soja e a conversão da biomassa na viabilidade do processo. O índice econômico utilizado nas análises foi o Valor Presente Líquido igual a zero, ou seja, o valor mínimo necessário para que a planta possa se tornar viável economicamente. O efeito do custo da proteína de soja e do tempo de operação do reator de hidrólise também foram avaliados.

A proteína de soja foi adicionada na simulação da seguinte forma: inseriu-se no processo uma corrente de proteína (a 50°C e 1 atm, de modo a evitar problemas de balanço de energia no reator) após a adição da corrente de enzimas e antes da entrada desta no reator de hidrólise. A Figura 11 representa como foi inserido o aditivo no fluxograma da etapa de hidrólise.

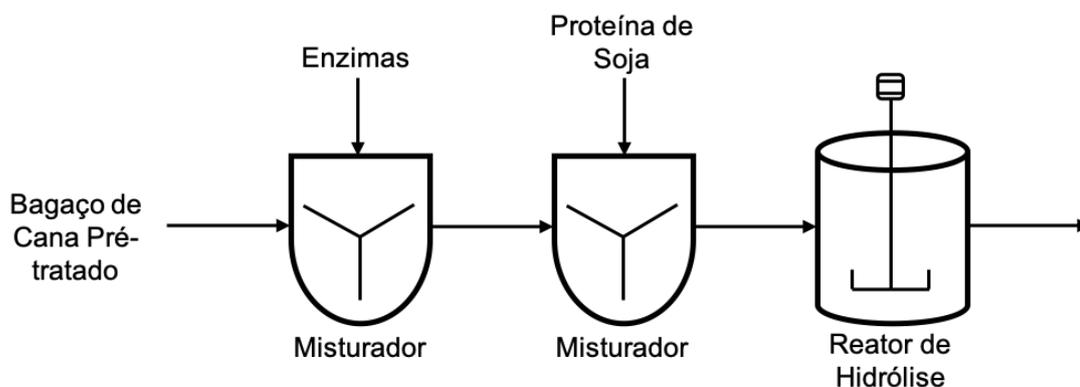


Figura 11. Fluxograma representando a adição da proteína de soja na simulação da biorrefinaria de etanol 1G-2G desenvolvida no EMSO.

De modo a facilitar a adição da proteína na simulação do processo, esta foi inserida como um componente já existente na simulação. Assim, o aditivo foi adicionado como uma corrente extra de enzimas no processo. Na simulação, estabeleceu-se que essa corrente de proteína não reagiria no reator de hidrólise, evitando-se, assim, que ela fosse contabilizada como enzima que hidrolisaria o material lignocelulósico no reator. Além disso, considerou-se que essa corrente de proteína de soja seria queimada nas caldeiras após a saída da etapa de sacarificação enzimática. Devido a falta de dados na literatura, o poder calorífico da proteína foi aproximado como sendo a sua entalpia de desnaturação (1500 kJ/mol), sendo este dado obtido a partir dos dados apresentados por (Hua et al., 2005), para a proteína 11S (globulina) presente na soja. Exceto quando especificados, os principais parâmetros de processo utilizados na simulação foram os mesmos apresentados na Tabela 1 de Longati et al. (2018).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Hidrólise

5.1.1. Planejamento Experimental

A fim de definir as melhores condições para as variáveis independentes cargas de sólidos e de proteína de soja, dentro da região com os valores experimentais avaliados, utilizadas na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente, aplicou-se a metodologia de superfície de resposta utilizando-se o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) como ferramenta (foram avaliadas apenas estas duas variáveis no planejamento objetivando-se reduzir o número de experimentos a serem realizados). Foram analisadas como variáveis dependentes a concentração de glicose, de açúcares redutores totais (ART), a conversão da celulose em glicose e o ganho obtidos após a sacarificação, para uma carga de enzimas fixa em 5 FPU/g de bagaço no tempo de 24 horas. A carga enzimática foi fixada em 5 FPU/g de modo a evitar que uma carga alta de enzimas mascarasse o efeito da proteína de soja como aditivo. Para tanto, foram realizados um total de 11 ensaios, seguindo as combinações dos fatores selecionados conforme apresentados na Tabela 1. A Tabela 2 apresenta a matriz DCCR com as variáveis independentes e dependentes obtidas. Para a determinação do ganho, este foi calculado a partir dos dados da glicose liberada pelos controles (hidrólise sem a proteína de soja) para cada uma das cargas de sólidos estudadas. Desse modo, para as cargas de bagaço de 8, 10, 15, 20 e 22% (m/v), os controles liberaram, respectivamente, 12,06, 17,43, 23,15, 28,34 e 27,22 g/L de glicose.

A Figura 12 apresenta os gráficos de Pareto obtidos para cada uma das variáveis dependentes analisadas. A análise do gráfico de Pareto possibilita verificar o efeito das variáveis independentes e suas combinações sobre o rendimento da hidrólise. Para a

liberação de glicose, de açúcares redutores totais (ART) e conversão, os fatores que foram significativos para o nível de significância de 95% adotado foram as cargas de sólidos, em sua forma linear (L) e quadrática (Q), e o termo linear da carga de proteína de soja. Para as três variáveis o maior efeito foi obtido para o termo linear da carga de sólidos, sendo que este influenciou de forma positiva a glicose e ART e de forma negativa a conversão, e a interação entre os fatores não se mostrou significativa. Para o ganho, apenas os termos lineares foram significativos no intervalo de confiança adotado, com a carga de sólidos apresentando o maior efeito e influenciando de forma negativa o aumento do ganho. Desse modo, para a obtenção dos modelos, apenas os termos significantes no intervalo de confiança adotado foram considerados.

Tabela 2. Matriz com os valores codificados e reais do DCCR com os dados de glicose e açúcares redutores totais obtidos após 24 horas de hidrólise com 5 FPU/g.

Ensaio	Carga de Sólidos (% m/v)	Carga de Proteína de Soja (% m/m)	Glicose (g/L)	Açúcares Redutores Totais (g/L)	Conversão (%)	Ganho (%)
1	- 1 (10)	- 1 (4)	19,88	32,58	31,94	14,03
2	+ 1 (20)	- 1 (4)	29,08	48,73	23,37	2,63
3	- 1 (10)	+ 1 (12)	22,92	33,88	36,83	31,49
4	+ 1 (20)	+ 1 (12)	30,39	49,23	24,42	7,24
5	- 1,41 (8)	0 (8)	16,28	26,29	32,72	35,08
6	+ 1,41 (22)	0 (8)	25,30	48,14	18,48	-7,07
7	0 (15)	- 1,41 (2,4)	24,99	42,12	26,78	7,98
8	0 (15)	+ 1,41 (13,6)	28,88	46,90	30,88	24,50
9	0 (15)	0 (8)	27,56	43,32	29,52	19,05
10	0 (15)	0 (8)	28,02	43,78	30,02	21,05
11	0 (15)	0 (8)	27,82	43,50	29,81	20,19

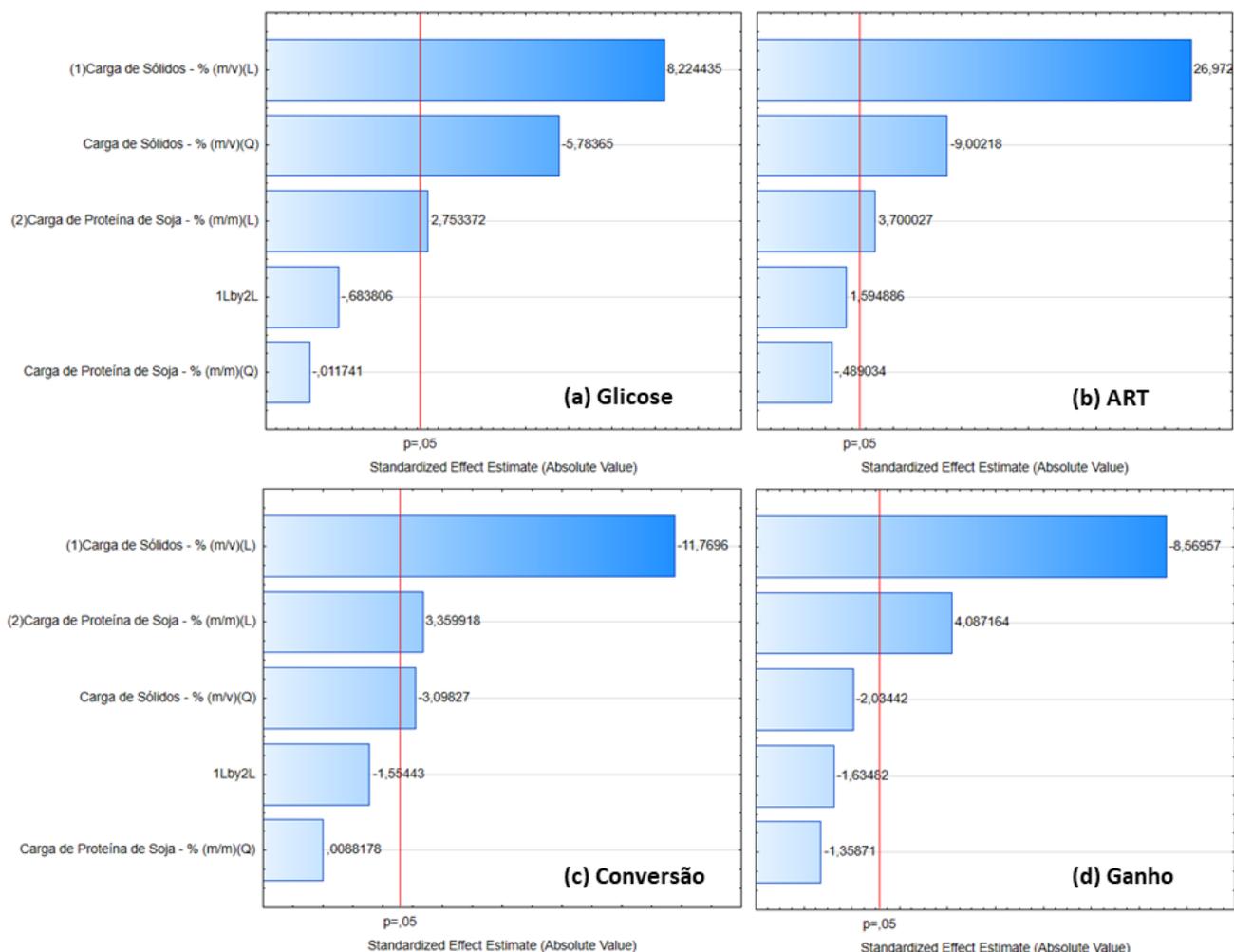


Figura 12. Gráficos de Pareto para cada uma das variáveis dependentes analisadas a) Glicose, b) ART, c) Conversão e d) Ganho.

As análises de variância (ANOVA) para as variáveis de resposta estudadas são apresentadas nas Tabelas 3, 4, 5 e 6. Para que o modelo obtido represente de forma satisfatória os dados experimentais, este deve possuir um elevado coeficiente de determinação (R^2), além do valor do $F_{\text{calculado}}$ ter que ser maior do que o do F_{tabelado} . A partir da análise das tabelas, percebe-se que os valores de R^2 obtidos foram satisfatórios, variando entre 0,8787 para o ganho e 0,9941 para o ART. De forma análoga, o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior do que o F_{tabelado} em todos os casos. Desse modo, tem-se que os modelos obtidos são estatisticamente significativos e se ajustam bem aos dados experimentais.

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para a variável concentração de glicose.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de $F_{\text{calculado}}$
Regressão	178,4181	3	59,4727	47,148
Resíduo	8,83	7	1,2614	
Total	187,2481	10		

$$R^2 = 0,9568; F_{\text{tabelado}}(3; 7; 0,05) = 4,35$$

Tabela 4. Tabela de variância (ANOVA) para a variável concentração de açúcares redutores.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de $F_{\text{calculado}}$
Regressão	561,8231	3	187,2744	254,345
Resíduo	5,154	7	0,7363	
Total	566,9771	10		

$$R^2 = 0,9941; F_{\text{tabelado}}(3; 7; 0,05) = 4,35$$

Tabela 5. Tabela de variância (ANOVA) para a variável conversão.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de $F_{\text{calculado}}$
Regressão	244,62	3	81,54	50,33
Resíduo	11,31	7	1,62	
Total	255,93	10		

$$R^2 = 0,9558; F_{\text{tabelado}}(3; 7; 0,05) = 4,35$$

Tabela 6. Tabela de variância (ANOVA) para a variável ganho.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de $F_{\text{calculado}}$
Regressão	1392,31	2	696,16	28,97
Resíduo	192,21	8	24,03	
Total	1584,52	10		

$$R^2 = 0,8787; F_{\text{tabelado}}(2; 8; 0,05) = 4,46$$

Após a análise de variância e da constatação da significância dos modelos, obteve-se as superfícies de resposta para cada uma das variáveis analisadas, além das equações codificadas, considerando-se apenas os parâmetros significativos dentro do intervalo de confiança de 95% adotado. Nas equações que serão apresentadas, CS representa a carga de sólidos e PS a de proteína de soja.

Primeiramente avaliou-se o efeito da carga de sólidos e de proteína na liberação de glicose e de açúcares redutores totais. As superfícies de resposta (a) e as curvas de contorno (b) para cada uma das variáveis estão apresentadas nas Figuras 13 e 14, seguidas de suas respectivas equações do modelo (Equações 5 e 6).

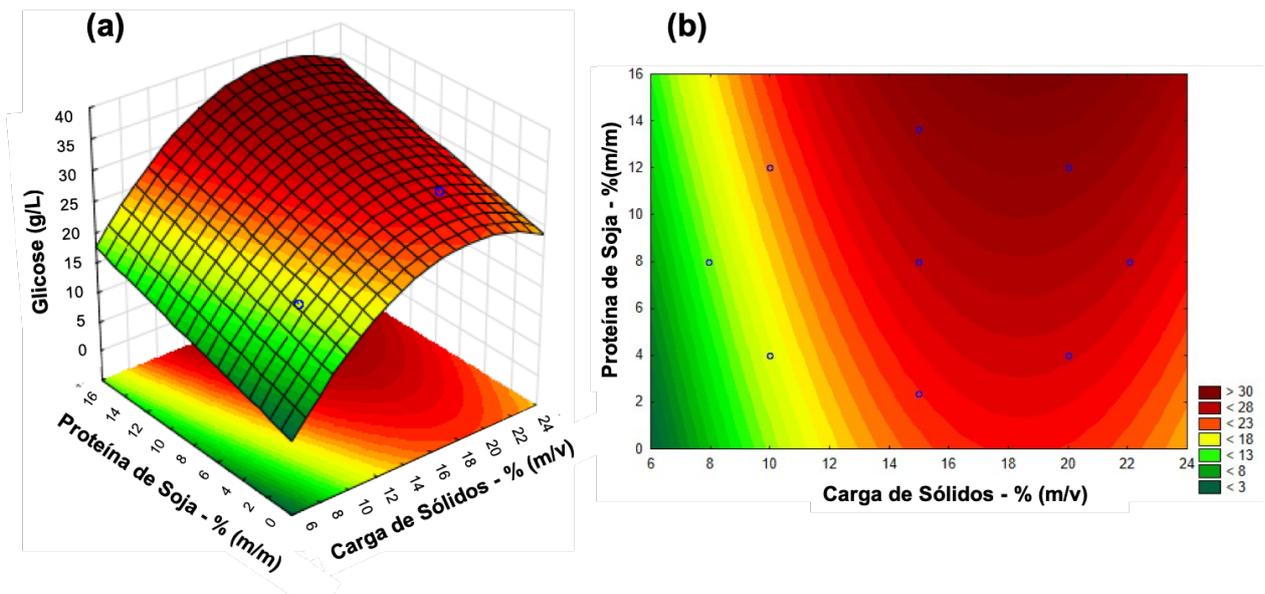


Figura 13. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a avaliação dos efeitos das cargas de sólidos e de proteína de soja na liberação de glicose. O tempo de hidrólise foi de 24 horas e a carga enzimática utilizada era de 5 FPU/g de substrato.

$$\text{Glicose} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 27,80 + 7,356 * \text{CS} - 6,15 * \text{CS}^2 + 2,442 * \text{PS} \quad (5)$$

A partir das superfícies geradas para a glicose na Figura 13, verificou-se que altas cargas de sólidos acarretam o aumento da glicose liberada após a hidrólise, estando de

acordo com trabalhos encontrados na literatura (Modenbach & Nokes, 2013). A proteína de soja também influenciou de forma positiva a hidrólise, sendo que quanto maior a sua concentração na faixa de valores analisadas, maior foi a concentração de glicose obtida. No entanto, ressalta-se novamente que o efeito da carga de sólidos foi mais significativo do que o da proteína.

A análise da liberação de açúcares redutores mostrou que a proteína de soja pouco influencia esta variável. O efeito da carga de sólidos se mostrou muito mais expressivo uma vez que quanto maior o valor desta, mais açúcares redutores foram liberados. Conforme pode ser observado na Figura 14, as regiões com as maiores concentrações de açúcares redutores estão em aproximadamente 21% de carga de sólidos (regiões com os tons de vermelho mais escuros).

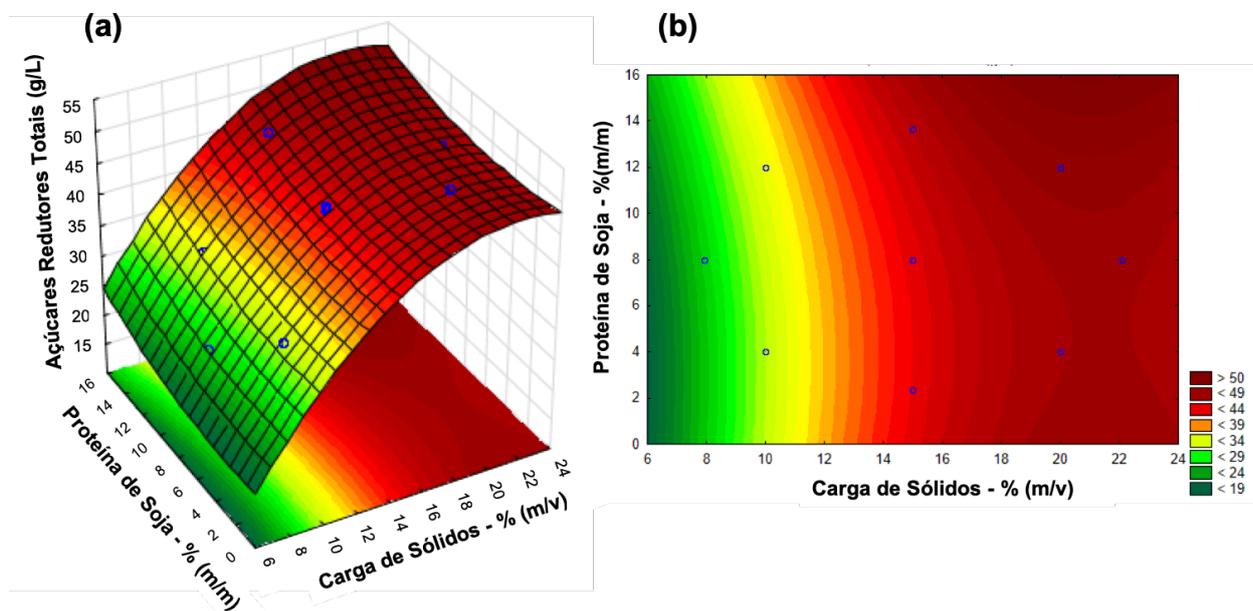


Figura 14. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a avaliação dos efeitos das cargas de sólidos e de proteína de soja na liberação de açúcares redutores totais (ART). O tempo de hidrólise foi de 24 horas e a carga enzimática utilizada era de 5 FPU/g de substrato.

$$\text{ART} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 43,55 + 15,60 * \text{CS} - 6,2138 * \text{CS}^2 + 2,9346 * \text{PS} \quad (6)$$

Assim, de forma similar ao que foi apresentado anteriormente, avaliou-se o efeito da carga de sólidos e de aditivo na conversão e no ganho. As Figuras 15 e 16 representam as superfícies de resposta e curvas de contorno para cada uma das variáveis analisadas. As equações com os parâmetros significativos dos modelos também foram apresentadas nas Equações 7 e 8.

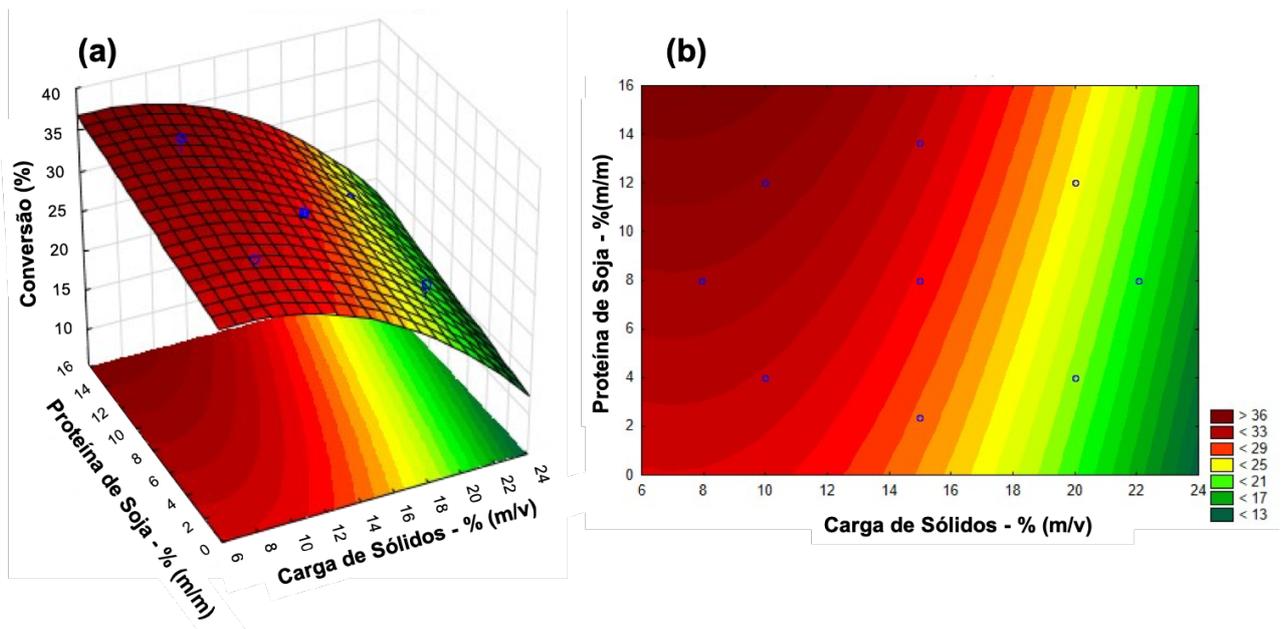


Figura 15. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a avaliação dos efeitos das cargas de sólidos e de proteína de soja na conversão da celulose em glicose. O tempo de hidrólise foi de 24 horas e a carga enzimática utilizada era de 5 FPU/g de substrato.

$$\text{Conversão (\%)} = 29,7833 - 10,279 * CS - 3,22 * CS^2 + 2,94 * PS \quad (7)$$

A Figura 15 apresenta o efeito negativo de altas cargas de sólidos na conversão da celulose em glicose, além de evidenciar que o aumento na concentração de proteína de soja favoreceu a conversão. De forma similar, na Figura 16 percebe-se que o ganho apresentou a mesma tendência da conversão.

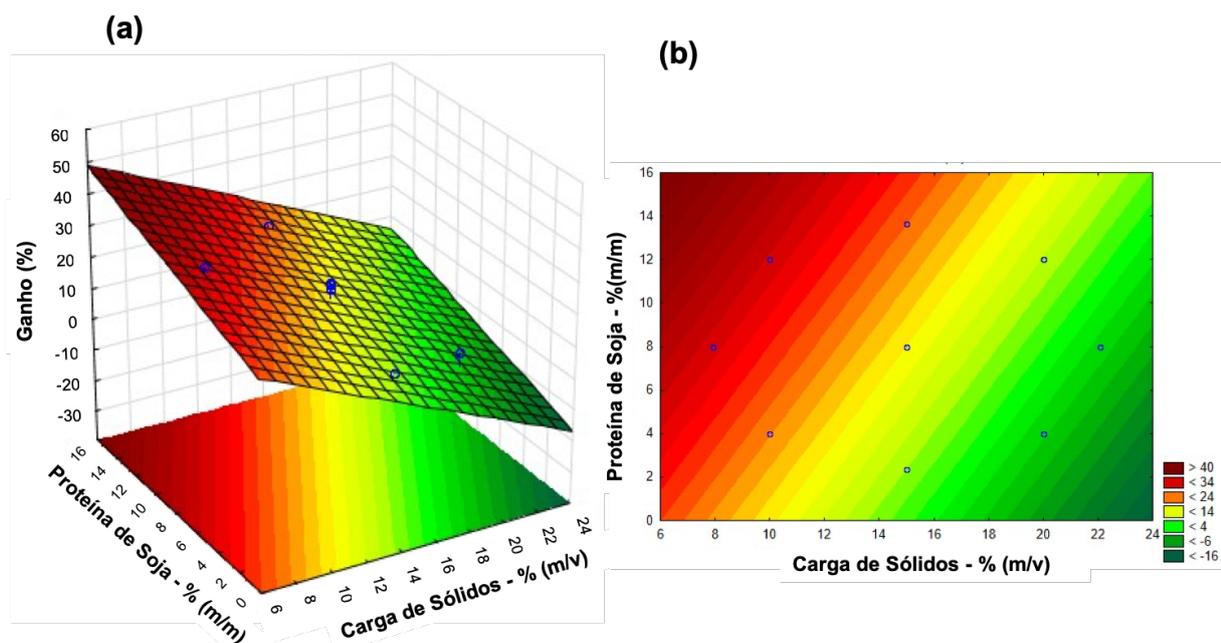


Figura 16. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a avaliação dos efeitos das cargas de sólidos e de proteína de soja no ganho. O tempo de hidrólise foi de 24 horas e a carga enzimática utilizada era de 5 FPU/g de substrato.

$$\text{Ganho (\%)} = 16,016 - 23,815 * CS + 11,358 * PS \quad (8)$$

Dessa forma, os resultados obtidos pelo planejamento corroboram dados da literatura de que trabalhar com altas cargas de sólidos durante a hidrólise aumentam a quantidade de glicose liberada no processo. Utilizar altas cargas de sólidos é fundamental para garantir a viabilização da produção do etanol de segunda geração, uma vez que o aumento na liberação de açúcares implica em maior produtividade da planta industrial (da Silva Martins et al., 2015; Hodge et al., 2009; Kristensen et al., 2009; Modenbach & Nokes, 2013). No entanto, conforme observou-se na Figura 15, para processos em batelada, utilizar altas cargas de sólidos acarreta a redução da conversão da biomassa em glicose. Trabalhar com cargas de sólidos consideradas altas (maiores do que 15%) implica na redução da conversão da celulose, além do aumento do tempo de liquefação da biomassa e do tempo de processo (Mukasekuru et al., 2018). Essa redução na conversão acontece, pois, cargas elevadas de sólidos implicam em problemas de agitação, transporte

de massa e inibição das enzimas pelos produtos formados. Durante a hidrólise com altos teores de biomassa, as enzimas podem ser inibidas tanto pelos produtos formados, quanto pelos inibidores formados durante o pré-tratamento, que estão em maior concentração devido à alta quantidade de sólidos. Além disso, a falta de água disponível aumenta a viscosidade do meio, o que prejudica a agitação, e reduz o transporte de massa, dificultando o acesso das enzimas a celulose e criando regiões com concentrações elevadas de produtos que acabam por inibir a ação destas. Esses fatores implicam em tempos maiores de reação, o que afeta economicamente de forma negativa o processo. Uma forma de minimizar estes problemas é conduzir a hidrólise utilizando um processo de batelada alimentada (da Silva Martins et al., 2015; Hodge et al., 2009; Modenbach & Nokes, 2013).

5.1.2. Determinação dos valores que otimizam as variáveis dependentes (função Desejabilidade) e validação do modelo

A partir dos modelos obtidos pelo planejamento experimental, utilizou-se a Função Desejabilidade presente no software STATISTICA para determinar, dentre a região experimentalmente avaliada, os valores de carga de bagaço e de proteína de soja que otimizem as quatro variáveis dependentes avaliadas. Buscou-se esse ótimo uma vez que, para garantir a viabilidade econômica da produção do etanol 2G, junto da utilização da proteína de soja como aditivo, a hidrólise deve ter uma alta liberação de açúcares fermentescíveis, associada a uma alta conversão e um alto ganho.

A Figura 17 apresenta a superfície de resposta e as curvas de contorno obtidas por meio da função Desejabilidade. Quanto mais próximo de 1 no gráfico da superfície de resposta (a), mais próximo se está da região que otimiza as variáveis liberação de açúcares, o ganho e a conversão, dentro da região estudada. Para a aplicação deste método, conforme estabelecido no item 4.8, considerou-se como os limites inferiores (Li)

de cada variável resposta como sendo o valor mínimo obtido por elas na Tabela 2. Os valores alvos (A) foram considerados os máximos resultados obtidos por cada variável na Tabela 2.

O objetivo deste estudo é trabalhar com uma alta carga de sólidos ($\geq 15\%$), mantendo-se valores elevados de ganho, liberação de açúcares e da conversão da biomassa. Assim, analisando a Figura 17 tem-se que os valores das variáveis independentes cargas de sólidos e de proteína, que permitem trabalhar em uma região que tenha altos valores para as variáveis dependentes estudadas (regiões com as colorações em vermelho mais escuro), foram, respectivamente, 15% (m/v) e 12% (m/m). Este ponto está destacado pela linha tracejada em preto, presente na Figura 17(b). Conforme pode ser observado, trabalhar com concentrações de proteína maiores que 12%, não acarretam melhora significativa no aumento simultâneo das variáveis dependentes para a carga de sólidos selecionada. Da mesma forma, aumentar o teor de bagaço também não melhorou o processo, uma vez que para essa variável há uma região de ótimo conforme pode ser observado no gráfico.

Após a definição dos valores otimizados para as cargas de sólidos e de proteína, utilizados nas próximas etapas do estudo, validou-se para esta condição os modelos obtidos anteriormente para cada uma das variáveis analisadas. O valor de 15% de sólidos (CS) obtém o valor codificado igual a 0 (zero); já o valor de 12% de proteína (PS) é representado pelo valor codificado igual a +1.

A Tabela 7 apresenta os valores preditos por cada modelo, representado pelas Equações 5, 6, 7 e 8, assim como os valores obtidos experimentalmente. Os dados experimentais representam as médias das triplicatas realizadas.

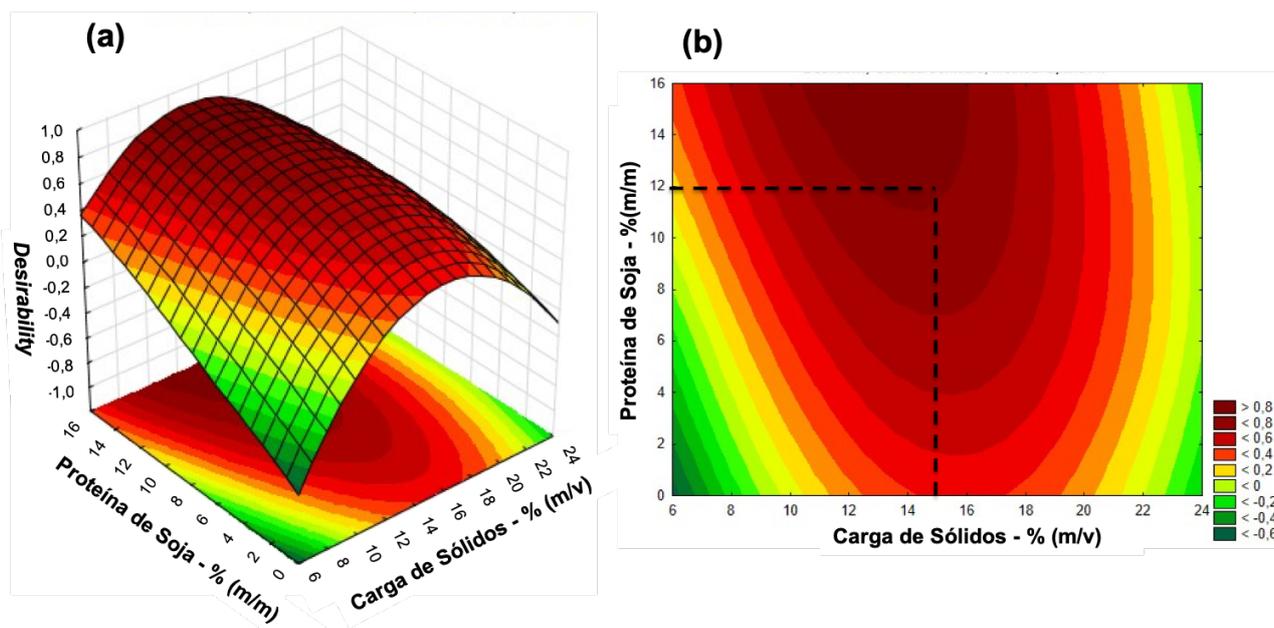


Figura 17. Obtenção dos valores que otimizam as variáveis dependentes do processo (glicose, ART, conversão e ganho) por meio da utilização da Função Desejabilidade presente no software STATISTICA.

Tabela 7. Validação do modelo obtido pelo planejamento experimental.

Variáveis Dependentes	Valor Predito	Valor Experimental
Glicose (g/L)	30,24	30,5±0,4
ART (g/L)	46,50	47,2±0,7
Conversão (%)	32,72	32,7±0,4
Ganho (%)	27,37	26,9±1,4

Considerando-se os desvios padrões associados aos dados experimentais, tem-se que os valores experimentais para cada variável analisada estão muito próximos aos valores preditos. Isso significa que os modelos propostos representam de forma satisfatória os dados experimentais. Assim, os valores otimizados de carga de sólidos e de aditivo, obtidos após a realização do planejamento experimental estatístico, foram fixados para as etapas subsequentes do estudo.

É importante salientar que, apesar da função Desejabilidade aqui empregada fornecer o ponto que otimiza as variáveis dependentes analisadas em função da carga de

bagaço e de aditivo, estas condições não necessariamente implicarão no melhor desempenho tecno-econômico do processo. De modo a se avaliar o impacto tecno-econômico da adição da proteína de soja no processo de produção do etanol de segunda geração, esta foi avaliada e apresentada nas etapas seguintes desta dissertação no contexto da simulação da biorrefinaria integrada de etanol 1G-2G, desenvolvida por pesquisadores do LaDABio do Departamento de Engenharia Química da UFSCar (Furlan et al., 2016; Longati et al., 2018). Os valores experimentais apresentados neste trabalho serão comparados com os valores simulados no item 5.5 deste trabalho.

Além disso, segundo Paiva (2008), deve-se destacar que, apesar de muito utilizada no ambiente acadêmico, a aplicação da função desejabilidade apresenta limitações e problemas, tais como: (i) o método depende de uma escolha subjetiva das funções individuais (d_i); (ii) o método não considera a variância das respostas, bem como a estrutura da correlação entre elas. No entanto, esta metodologia foi aqui empregada por ser bastante difundida no meio acadêmico, além de ser um método mais simples de otimização, já que condensa um problema de otimização multivariada em um univariado (Paiva, 2018).

5.1.3. Avaliação do efeito da carga enzimática e perfil temporal

Após a definição no item anterior dos parâmetros carga de sólidos e de aditivo, por meio da busca de condições que fornecessem valores elevados de conversão, ganho e liberação de açúcares (dentro da região avaliada experimentalmente), definiu-se, para os experimentos subsequentes de hidrólise e adsorção, a fixação das cargas de sólidos e de proteína de soja em 15% (m/v) e 12% (m/m), respectivamente. Em seguida, realizou-se a hidrólise para diferentes cargas de enzima (5, 10, 15 e 20 FPU/g de biomassa) e tempos de hidrólise (24, 48 e 72 horas). De modo a averiguar os efeitos destas variáveis no

processo, avaliou-se, então o perfil temporal de liberação de glicose. A Figura 18 representam o perfil temporal de liberação de glicose e os ganhos obtidos (calculados de acordo com a Equação 1), respectivamente. Na Figura 18(a), as barras com cores sólidas representam os controles (hidrólise sem a adição da proteína). Já as barras hachuradas apresentam a glicose liberada após a hidrólise na presença do aditivo. As diferentes cores estão relacionadas às diferentes cargas enzimáticas avaliadas.

A análise dos gráficos permite identificar que a proteína de soja teve efeito positivo na liberação de glicose para todos os tempos e cargas de enzima avaliados. As linhas tracejadas em azul, presentes na Figura 18 (a), destacam que, para 5 FPU/g e 12% (m/m) de proteína, a glicose liberada durante 24 horas de hidrólise foi praticamente a mesma do que para o controle de 5 FPU/g em 48 e 72 horas de hidrólise. De forma similar, 24 horas de hidrólise na presença do aditivo, para 10 FPU/g de enzima, liberou a mesma quantidade de glicose, para a mesma carga de enzima, após 48 e 72 horas de hidrólise do controle (sem a proteína de soja). Desse modo, a adição da proteína de soja durante sacarificação possibilitou liberar a mesma quantidade de glicose do que em 72 horas de hidrólise do controle, implicando, assim, em um tempo de processo 66% menor. Do ponto de vista industrial, reduzir o tempo de operação, mantendo-se o rendimento é algo fundamental para que se possa garantir vantagens econômicas ao processo. Verificou-se, também, que entre os tempos de 48 e 72 horas não houve um aumento significativo na liberação de glicose.

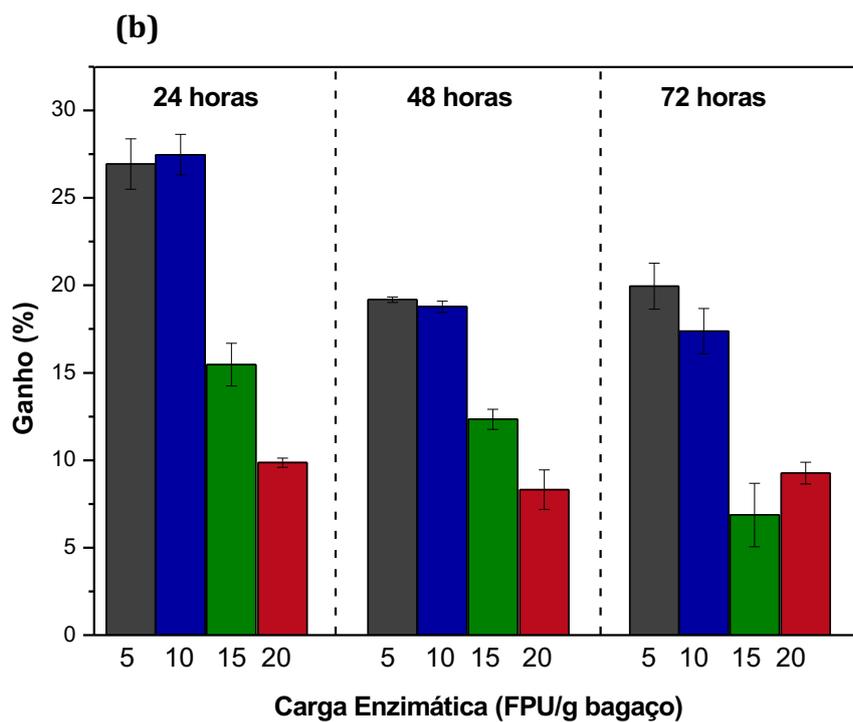
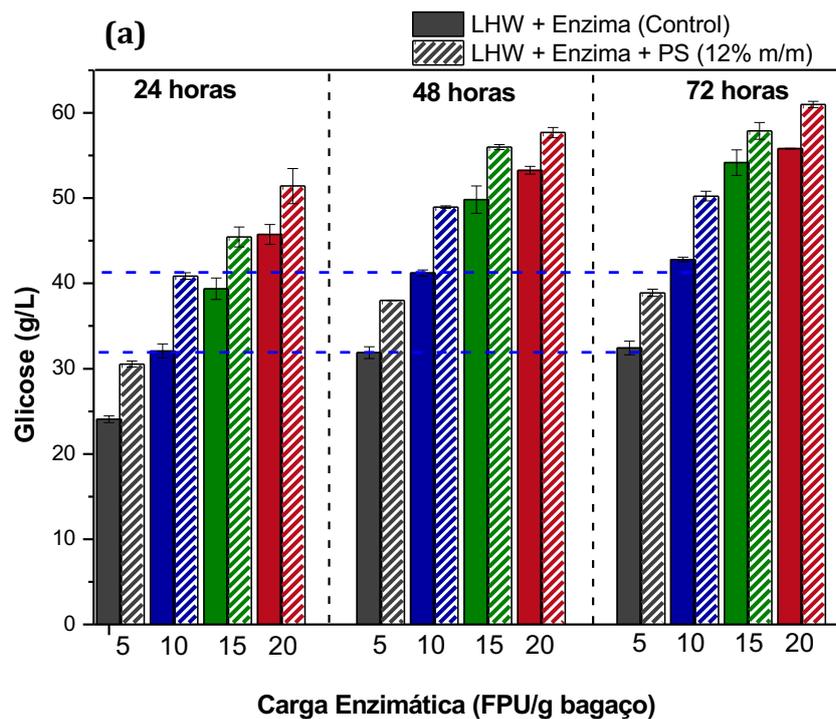


Figura 18. (a) Perfil temporal de liberação de glicose para cargas de enzima de 5, 10, 15 e 20 FPU/g de substrato, com e sem a adição de proteína de soja. As barras com cores sólidas representam os controles; as barras hachuradas representam a hidrólise com 12% (m/m) de proteína de soja. A carga de sólidos utilizada foi de 15% (m/v). **(b)** Ganho obtido pela hidrólise com o aditivo em relação ao controle.

Outra observação importante foi que 5 FPU/g com 12% (m/m) de proteína, em 24 horas de hidrólise, liberou a mesma quantidade de glicose em relação ao controle de 10 FPU/g em 24 horas. Assim a adição da proteína possibilitou reduzir pela metade a carga enzimática utilizada no processo. Ainda para o tempo de 24 horas, 10 FPU/g com proteína obteve a mesma conversão que 15 FPU/g sem o aditivo. De forma análoga, 15 e 20 FPU/g obtiveram a mesma tendência. Esses resultados implicam em uma redução de 33 e 25% na carga enzimática, respectivamente. Para os tempos de 48 e 72 horas, perfis similares podem ser também observados. Do ponto de vista econômico, essa possibilidade de redução na carga enzimática é extremamente interessante, uma vez que a proteína de soja possui um custo muito inferior ao da enzima (Klein-Marcuschamer et al., 2012).

O gráfico com os ganhos (porcentagem de aumento na liberação de glicose em relação aos resultados obtidos sem o aditivo) apresentado na Figura 18(b) mostra que para todos os tempos e cargas de enzima estudados, a adição de proteína de soja resultou no aumento na liberação de glicose em relação ao controle. Contudo, esse aumento foi mais acentuado quando se trabalhou com concentrações de enzima de 5 e 10 FPU/g em 24 horas de processo. Os ganhos obtidos chegaram a 26% de aumento na liberação de glicose. Desse modo, constata-se que o tempo de 24 horas e as cargas enzimáticas de 5 e 10 FPU/g apresentam-se como as mais adequadas para se realizar as etapas subsequentes do estudo, uma vez que nestas condições o efeito da proteína de soja na hidrólise se mostrou mais pronunciado. Conforme aqui observado, na literatura altas cargas enzimáticas também implicam na redução do efeito positivo dos aditivos durante a hidrólise (Cai et al., 2017; Kumar et al., 2012; Wei & Wu, 2017; Zhang et al., 2018). Isso ocorre pois, para os controles (hidrólise sem aditivo), uma parte das enzimas são adsorvidas improdutivamente pela lignina durante a sacarificação enzimática, no entanto, a alta concentração destas no meio reacional faz com que estas enzimas adsorvidas atuem como proteínas de sacrifício, não afetando assim a ação das enzimas livres em solução.

Para baixas cargas enzimáticas, as celulasas adsorvidas improdutivamente reduzem de forma significativa a quantidade de enzimas livres em solução, reduzindo a conversão da biomassa e, assim, o efeito dos aditivos na hidrólise são mais efetivos (Kumar et al., 2012; Wei & Wu, 2017; Zhang et al., 2018).

Florencio et al. (2016) também obtiveram resultados positivos no aumento da eficiência da hidrólise enzimática do bagaço de cana utilizando a proteína de soja como aditivo e utilizando-se coquetéis enzimáticos produzidos in-house, sem aditivos que afetem a adsorção improdutiva em sua formulação. Segundo os autores, a proteína foi capaz de aumentar a liberação de glicose em até 50%, apresentando resultados melhores do que aditivos usualmente reportados na literatura, como a BSA, o Tween e o PEG.

Brondi et al. (2019), ao avaliar o perfil temporal de liberação de glicose para o bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, utilizando um coquetel enzimático comercial (Cellic CTec2[®]), também observaram o efeito positivo da proteína de soja. Ganhos superiores a 35% foram obtidos para 24 horas de hidrólise utilizando-se uma carga enzimática de 5 FPU/g de substrato. Similarmente ao apresentado na Figura 18(b), foi para o tempo de 24 horas que o efeito do aditivo se mostrou mais pronunciado. Os autores também demonstraram que era possível reduzir o tempo de processo em até 66% e a carga enzimática em 33% com a adição da proteína.

Florencio et al., (2019) realizaram a hidrólise do bagaço de cana hidrotérmico, também utilizando 15% sólidos e 12% de proteína de soja como aditivo, no entanto, a sacarificação foi realizada pelo coquetel comercial Cellic CTec2[®]. Os autores observaram ganhos de até 76% quando uma carga enzimática de 5 FPU/g de sólidos foi empregada, para 24 horas de hidrólise, sendo estes superiores aos obtidos pela Figura 18. No entanto, enquanto que o controle para a hidrólise de Florêncio et al. (2019) gerou cerca de 11 g/L de glicose e a presença da proteína elevou este valor para aproximadamente 19,5 g/L, na Figura 18 os valores obtidos para as mesmas condições foram de, respectivamente, 24

g/L e 30,5 g/L. Tal diferença na sacarificação se deve a utilização de coquetéis enzimáticos diferentes. A Cellic CTec3[®] representa um coquetel enzimático mais moderno e recente produzido pela empresa Novozymes, apresentando, de acordo com a fabricante, performance 1,5 vezes melhor do que sua antecessora, a Cellic CTec2[®]. De acordo com Sun et al. (2015), além de apresentar maior FPAse, a CTec3[®] também apresenta uma maior quantidade de enzimas acessórias, que agem de forma sinérgica com as celulases presentes no coquetel enzimático, aumentando, assim, a performance desta tanto na hidrólise da celulose pura, quanto de materiais lignocelulósicos.

Yu et al., (2013) realizaram a hidrólise do bagaço de cana hidrotérmico, utilizando o Tween 80 como aditivo e carga enzimática de 15 FPU/g durante a hidrólise. Para 24 horas de hidrólise os autores não observaram efeito significativo do aditivo, no entanto, para 72 horas de processo, o Tween aumentou em 34% a conversão da celulose presente no material. Assim, a proteína de soja obteve efeito positivo na hidrólise mais rapidamente do que o Tween 80, um dos aditivos mais reportados na literatura para a redução da adsorção improdutiva de enzimas pela lignina (Börjesson et al., 2007a, 2007b; Eriksson et al., 2002), uma vez que teve seu melhor efeito na liberação de glicose com 24 horas de hidrólise. O melhor desempenho da proteína frente ao Tween pode ser devido, além da redução da adsorção improdutiva, ao aumento da estabilidade da atividade das enzimas durante a hidrólise e, também, a redução da viscosidade do meio reacional, o que facilitaria o transporte de massa neste. No entanto, estudos mais aprofundados se fazem necessários para melhor entender o efeito da proteína de soja durante a hidrólise.

Frente ao que foi observado na Figura 18, as cargas enzimáticas de 5 e 10 FPU/g apresentaram ganhos similares na hidrólise. Como 10 FPU/g acarreta maior conversão e liberação de glicose ao material lignocelulósico (maior quantidade de açúcares gerados para uma mesma massa de bagaço) optou-se por realizar os próximos estudos com essa carga enzimática fixa.

5.1.4. Efeito da pré-incubação da proteína de soja com o bagaço

Objetivando-se aumentar ainda mais o rendimento da hidrólise enzimática, avaliou-se o efeito da pré-incubação da proteína de soja durante 2, 4, 6 e 24 horas, a 50°C, com o bagaço pré-tratado hidrotermicamente. Após estes tempos, adicionou-se a enzima e realizou-se a hidrólise por 24 horas. A Figura 19 apresenta os dados referentes aos ganhos obtidos em relação ao controle (hidrólise sem o aditivo) assim como a conversão da celulose em glicose e a quantificação da glicose liberada para todos os tempos de incubação estudados.

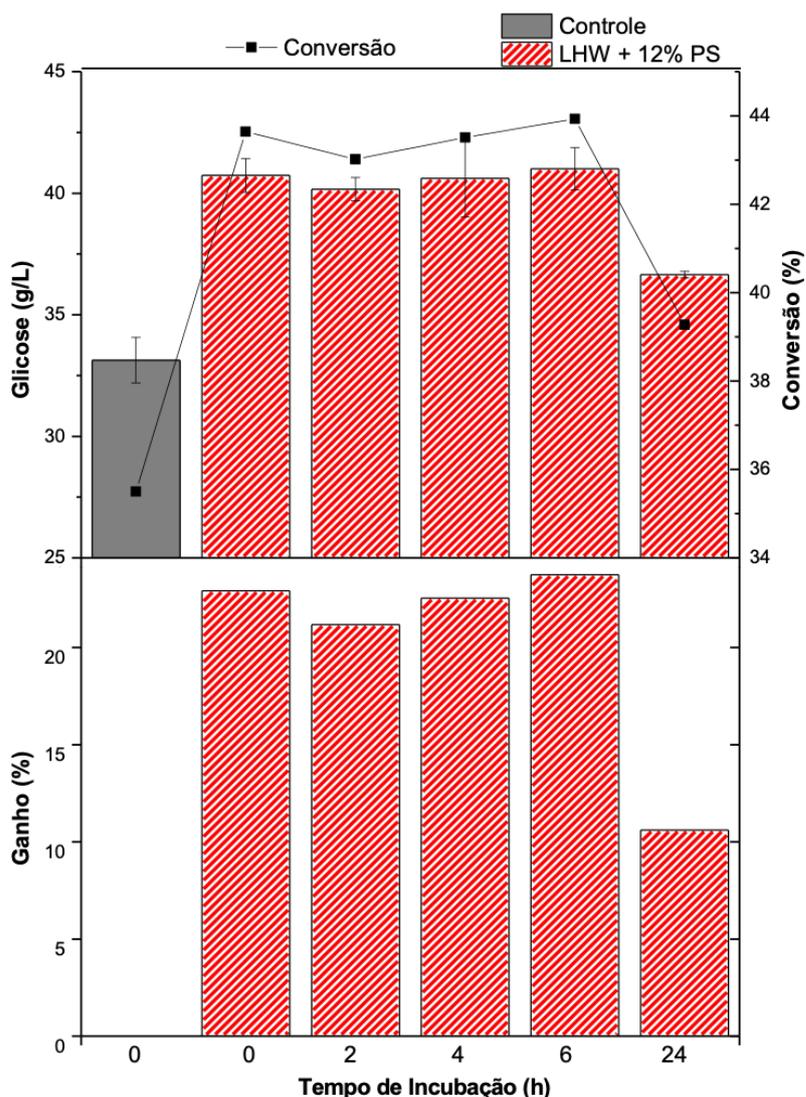


Figura 19. Ganhos e conversão obtidos para diferentes tempos de incubação da proteína de soja com o bagaço, para uma carga enzimática de 10 FPU/g, 24 horas de hidrólise, 15% (m/v) de sólidos e 12% (m/m) de proteína de soja.

A partir dos dados obtidos percebe-se que a incubação prévia da biomassa com a proteína de soja, antes da hidrólise, não se mostrou eficiente no aumento da eficiência da hidrólise enzimática, uma vez que a concentração de glicose liberada se manteve praticamente constante em relação à hidrólise sem a incubação para os tempos de 2, 4 e 6 horas. Para o tempo de 24 horas houve uma redução na liberação de glicose em relação à hidrólise sem a incubação. Isso pode ser devido a liberação de substâncias presentes no bagaço devido ao longo tempo de incubação que podem, além de inibir a ação das enzimas, alterar o pH do meio reacional, afetando o rendimento do processo.

Florencio et al. (2016) também avaliaram o efeito da incubação da proteína de soja com o bagaço de cana explodido a vapor durante a hidrólise enzimática utilizando enzimas produzidas *in house*. Assim como os resultados apresentados na Figura 19, os autores também não obtiveram melhorias na liberação de glicose.

5.1.5. Efeito da proteína de soja desnaturada

Wang et al., (2014) relataram que a desnaturação térmica aumenta a hidrofobicidade da proteína de soja. Isso ocorre principalmente devido a desnaturação da β -conglucina presente na soja. Como a adsorção improdutiva de celulasas pela lignina deve-se, principalmente, a interações hidrofóbicas, realizou-se a desnaturação térmica da proteína de soja com o objetivo de favorecer a interação lignina-proteína de soja, reduzindo a adsorção improdutiva de enzimas. Os tempos e temperaturas de desnaturação testados foram baseados nos maiores valores de hidrofobicidade obtidos por Wang et al., (2014).

A Figura 20 apresenta os dados da glicose liberada, da conversão e do ganho obtido em relação à hidrólise sem aditivo, para a proteína de soja isolada (vermelho), esta desnaturada em três diferentes condições (azul) e o controle sem o aditivo (cinza).

Nota-se, a partir do gráfico, que a desnaturação térmica se mostrou menos eficiente no aumento da liberação de glicose do que quando se utilizou a proteína de soja isolada *in natura*. Brondi et al. (2019) também não observaram melhoria significativa na hidrólise após a desnaturação da proteína de soja. Desse modo, os estudos subsequentes serão realizados com a proteína *in natura*, uma vez que a desnaturação térmica não se mostrou vantajosa, além de acarretar custos adicionais com a desnaturação ao processo de sacarificação enzimática.

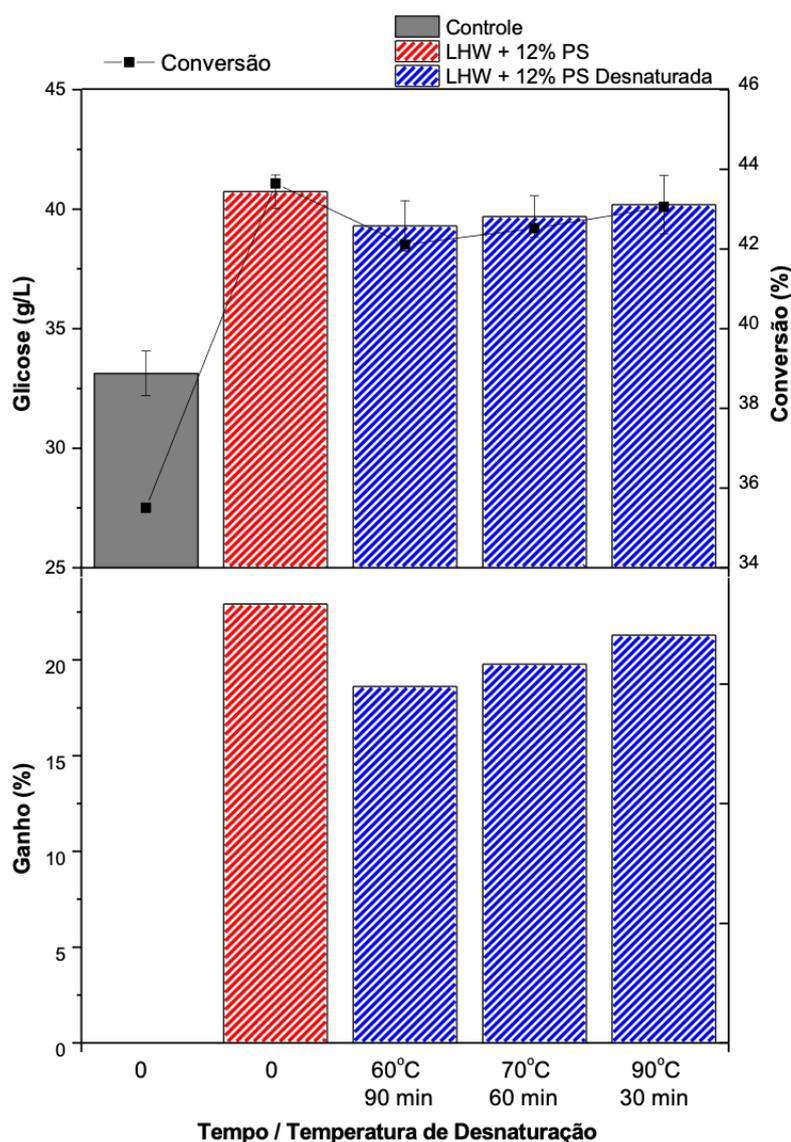


Figura 20. Ganhos e conversão obtidos para diferentes tempos/temperaturas de desnaturação térmica da proteína de soja, para uma carga enzimática de 10 FPU/g, 24 horas de hidrólise, 15% (m/v) de sólidos e 12% (m/m) de proteína de soja.

5.1.6. Efeito da proteína de soja solúvel

A proteína de soja apresenta ponto isoelétrico no pH 4,5 (Sinha-Ray et al., 2012). Isto faz com que esta apresente baixa solubilidade no pH de hidrólise aqui utilizado, 4,8. De modo a avaliar a baixa solubilidade da proteína de soja no pH 4,8, quantificou-se a fração solúvel, por meio do kit BCA, presente em soluções com concentrações iniciais (frações solúveis + insolúveis) de 1,5, 7,5, 18, 30 e 100 g de proteína/L de tampão. Tais concentrações correspondem as cargas de aditivo utilizadas na hidrólise de 1, 5, 12, 20 e 67% (m/m), respectivamente. Assim, a Figura 21 apresenta a quantificação da proteína de soja solúvel presente no sobrenadante, após 24 horas de incubação entre o aditivo e o tampão (barras com a cor azul), a 50°C, assim como as concentrações iniciais de proteína isolada (barras hachuradas em vermelho - frações solúvel + insolúvel) as quais a fração solúvel foi extraída. Os números acima das barras representam os valores das concentrações obtidas em g/L. As barras azuis localizadas à direita das vermelhas correspondem as frações solúveis extraídas destas. A Tabela 8 apresenta as concentrações encontradas de proteína solúvel em relação à proteína total, assim como a porcentagem de proteína solubilizada.

Com a análise dos dados percebe-se a baixa solubilidade da proteína nesse pH avaliado. Para todas as concentrações estudadas a fração solúvel correspondeu a valores entre 1,26 – 2,24% da concentração total inicial do aditivo (solúvel + insolúvel).

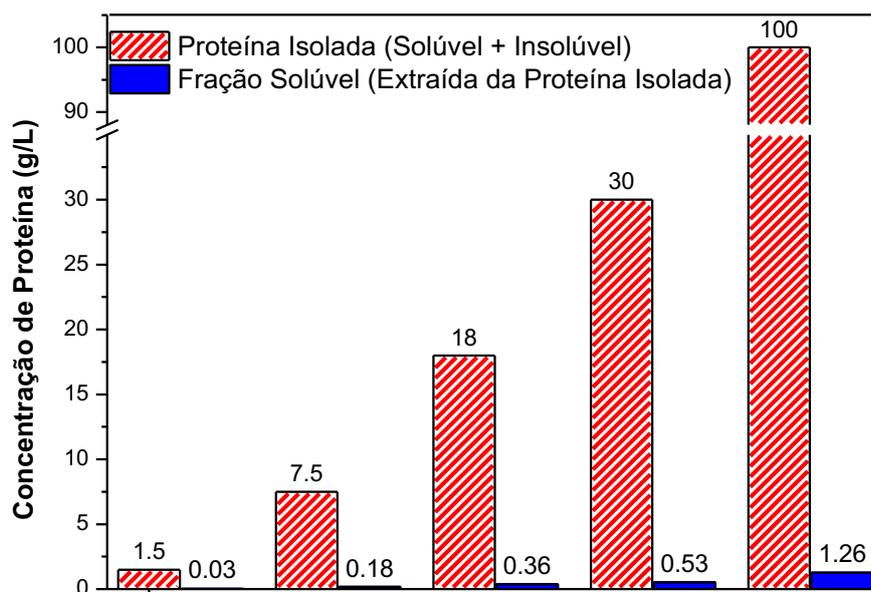


Figura 21. Quantificação da proteína de soja total e de sua fração solúvel, após 24 horas de incubação da proteína com o tampão, a 50°C e pH 4,8.

Tabela 8. Quantificação da proteína de soja total e de sua fração solúvel, após 24 horas de incubação da proteína com o tampão, a 50°C e pH 4,8.

Concentração Inicial (g/L) – Proteína total	1,5	7,5	18	30	100
Concentração de Proteína Solúvel (g/L)	0,03	0,18	0,36	0,53	1,26
Porcentagem de Proteína Solúvel Presente na Inicial (%)	1,83	2,24	1,74	1,66	1,26

Assim, de modo a investigar o efeito da fração solúvel e insolúvel na hidrólise, realizou-se a sacarificação enzimática utilizando a proteína total e apenas a sua fração solúvel extraída após a centrifugação. A Figura 22 apresenta as concentrações de glicose (a) e os ganhos (b) obtidos após a hidrólise. No gráfico, as barras hachuradas em vermelho representam a glicose e os ganhos obtidos utilizando-se a proteína isolada (frações solúveis + insolúveis) como aditivo, enquanto que as barras hachuradas em azul representam os valores obtidos pela fração solúvel (extraídas a partir da concentração de proteína total adjacentes a estas). A barra preta (Figura 22(a)) quantifica o controle (hidrólise sem aditivo).

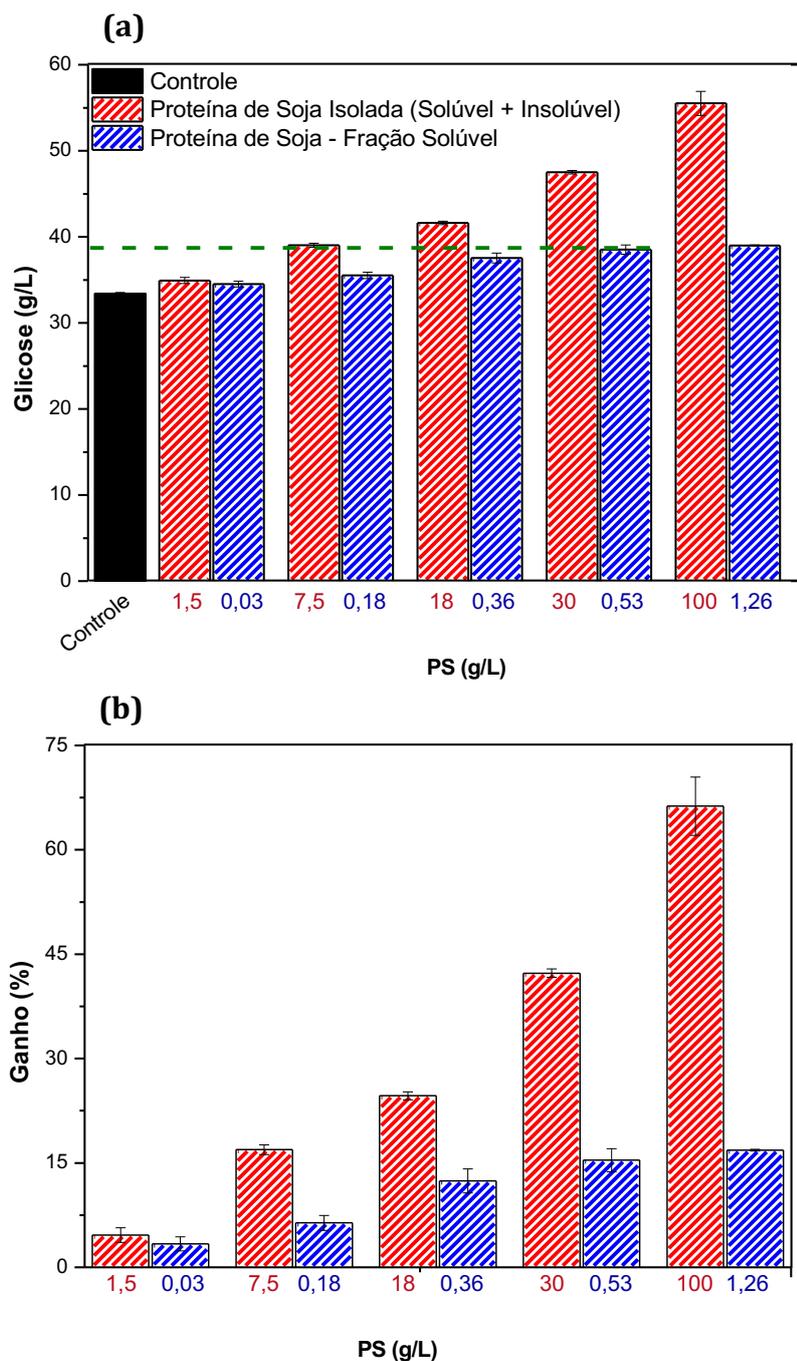


Figura 22. Quantificação da glicose (a) e dos ganhos (b) obtidos para diferentes concentrações de proteína de soja (total e fração solúvel) para uma carga enzimática de 5 FPU/g, 24 horas de hidrólise e 15% (m/v) de sólidos.

Desse modo, percebe-se que a proteína de soja solúvel apresentou efeito positivo na hidrólise do bagaço de cana em relação ao processo sem a utilização de aditivo, uma vez que os ganhos foram positivos para todas as concentrações avaliadas. No entanto,

vale ressaltar que a fração insolúvel também possui efeito positivo no aumento da liberação de glicose, visto que a concentração da glicose liberada pela fração total foi sempre superior a fração solúvel. Ressalta-se, também, que a fração solúvel com concentração de 0,53 g/L (extraída da solução de proteína isolada com 30 g/L) apresentou ganho similar ao obtido com 7,5 g/L de proteína total, conforme destacado pela linha tracejada em verde no gráfico. Ou seja, os resultados foram similares embora a proteína solúvel tenha uma concentração 14 vezes menor em relação a proteína total. Apesar desse resultado promissor, para concentrações de aditivo solúvel acima de 0,533 g/L o ganho da hidrólise deixou de aumentar em relação a proteína total, não sendo possível a obtenção da hidrólise de ganhos maiores do que 17%.

5.1.7. Associação dos aditivos Tween 80 e proteína de soja

Mukasekuru et al., (2018) estudaram o efeito da associação dos aditivos Tween 80, BSA e saponina durante a hidrólise do bagaço de cana com a enzima Cellic CTec2® e obtiveram efeitos interessantes, aumentando a liberação de glicose em relação ao controle e reduzindo a concentração dos aditivos utilizados durante a sacarificação. Desse modo, neste trabalho estudou-se a associação dos aditivos proteína de soja e do surfactante Tween 80, buscando-se reduzir a concentração de proteína de soja e aumentar a conversão enzimática do bagaço de cana. A Figura 23(a) apresenta os dados referentes a liberação de glicose, enquanto que a Figura 23(b) apresenta os ganhos do processo, para 24 horas de hidrólise a 50°C com 10 FPU/g. As concentrações de Tween avaliadas foram 0,1 e 0,25% (m/v), enquanto que as de proteína foram 1, 5 e 12% (m/m). A barra preta representa o controle, a vermelha refere-se a hidrólise com 12% de proteína e as hachuradas em verde e azul são referentes a hidrólise do bagaço com 0,1 e 0,25% de

Tween 80, respectivamente. As barras em cores sólidas verdes e azuis apresentam os resultados dos aditivos associados.

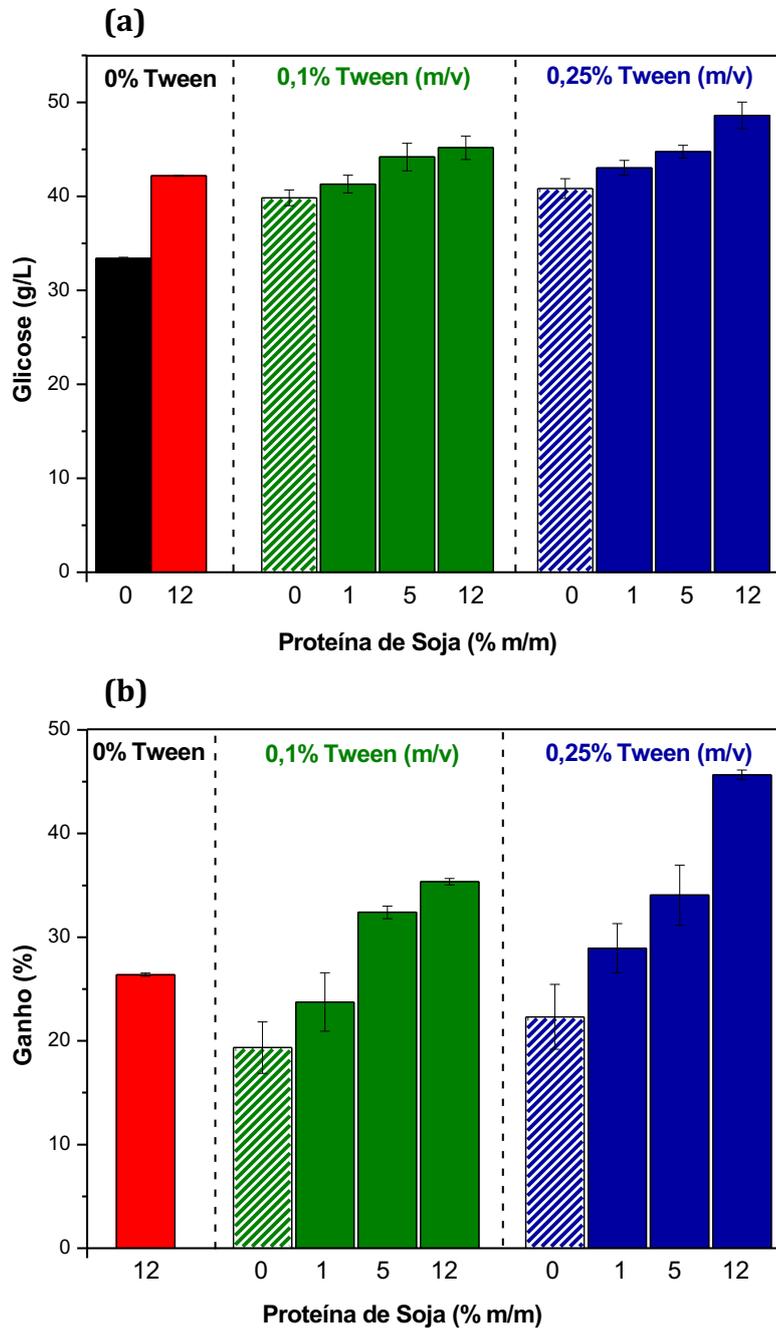


Figura 23. Efeito da associação dos aditivos Tween 80 e Proteína de Soja na hidrólise do bagaço de cana hidrotérmico (15% m/v). As hidrólises foram realizadas com 10 FPU/g de substrato, 50°C, 30 rpm por 24 horas. As cargas de Tween avaliadas foram 0,1 e 0,25% (m/v); as de proteína foram 1, 5 e 12% (m/m). (a) Liberação de glicose; (b) ganho. As barras em preto, vermelho e hachuradas em verde e azul representam os controles na ausência dos aditivos, apenas com 12% de proteína de soja, com 0,1% e 0,25% de Tween.

A partir da análise dos dados, percebe-se que associar os aditivos se mostrou bastante interessante, aumentando a concentração de glicose e possibilitando uma redução bastante significativa no teor de proteína de soja. Quando se utilizou 0,1% (m/v) de Tween com 1% (m/m) de proteína, a liberação glicose foi praticamente a mesma do que a hidrólise com apenas 12% (m/m) de proteína de soja (41,3 e 42 g/L, respectivamente). Quando se adicionou 0,1% de Tween com 5% e 12% de proteína os ganhos aumentaram de 26,3% (hidrólise com apenas a proteína – 12% (m/m)) para 33% e 35%, respectivamente. Para a situação em que se utilizou 0,25% de Tween e 12% de proteína, ganhos próximos a 45% foram atingidos. Em todos os casos estudados, as hidrólises com proteína de soja (sem e com Tween) acarretaram em uma maior liberação de glicose do que os controles (hidrólise do bagaço apenas com a enzima e a hidrólise com Tween e enzima).

Assim como o observado por Mukasekuru et al. (2018), associar os aditivos se mostrou uma estratégia interessante na redução de suas concentrações no processo, sendo que a utilização conjunta de diferentes aditivos é uma estratégia pouco explorada na hidrólise enzimática. Na literatura há muitos trabalhos que relatam o efeito positivo do Tween na hidrólise de biomassas lignocelulósicas. Seu efeito positivo é muitas vezes associado ao fato deste surfactante reduzir a adsorção improdutiva de enzimas na lignina, além de aumentar a atividade e a estabilidade das celulasas (Eriksson et al., 2002; Kumar & Wyman, 2008; Xin et al., 2017). O efeito da proteína de soja é relatado na literatura de modo a também reduzir adsorção improdutiva (Brondi et al., 2019; Florencio et al., 2019, 2016) sendo que seu efeito durante a hidrólise será melhor estudado e relatado em seções seguintes da presente dissertação. Além disso, mais estudos seriam necessários de modo a melhor entender e otimizar a ação conjunta destes aditivos, além de avaliar o impacto e a viabilidade tecno-econômica desta associação no processo de hidrólise.

5.1.8. Efeito da proteína de soja na hidrólise de diferentes substratos

Avaliou-se o efeito da proteína de soja na hidrólise do bagaço de cana hidrotérmico, cujo pré-tratamento foi realizado com 10 e 15% (m/v) de sólidos. Estes bagaços foram avaliados sem e com a posterior lavagem da biomassa após o pré-tratamento. Além disso, avaliou-se a sacarificação enzimática da celuflok e da avicel (celuloses microcristalinas que apresentam teores reduzidos de lignina). Os dados obtidos para a liberação de glicose e os ganhos, após 24 horas de hidrólise a 50°C, então apresentados na Figura 24 (a) e (b), respectivamente. As barras em preto na Figura 24(a) apresentam os dados dos controles (hidrólise sem o aditivo), enquanto que as barras em vermelho caracterizam a liberação de glicose na presença de 12% (m/m) de proteína de soja. O termo PT significa pré-tratamento.

A partir dos dados apresentados, percebe-se que os controles dos bagaços hidrotérmicos, sem e com lavagem, apresentaram concentrações de glicose similares. A presença da proteína de soja apresentou melhoria na conversão em todos os casos avaliados. No entanto, é importante destacar que com a adição do aditivo, os ganhos nas hidrólises das biomassas lavadas se mostraram superiores em relação aos não lavados (com a proteína), chegando a 40% para os lavados e 26 e 31% para os não lavados de 10 e 15%, respectivamente.

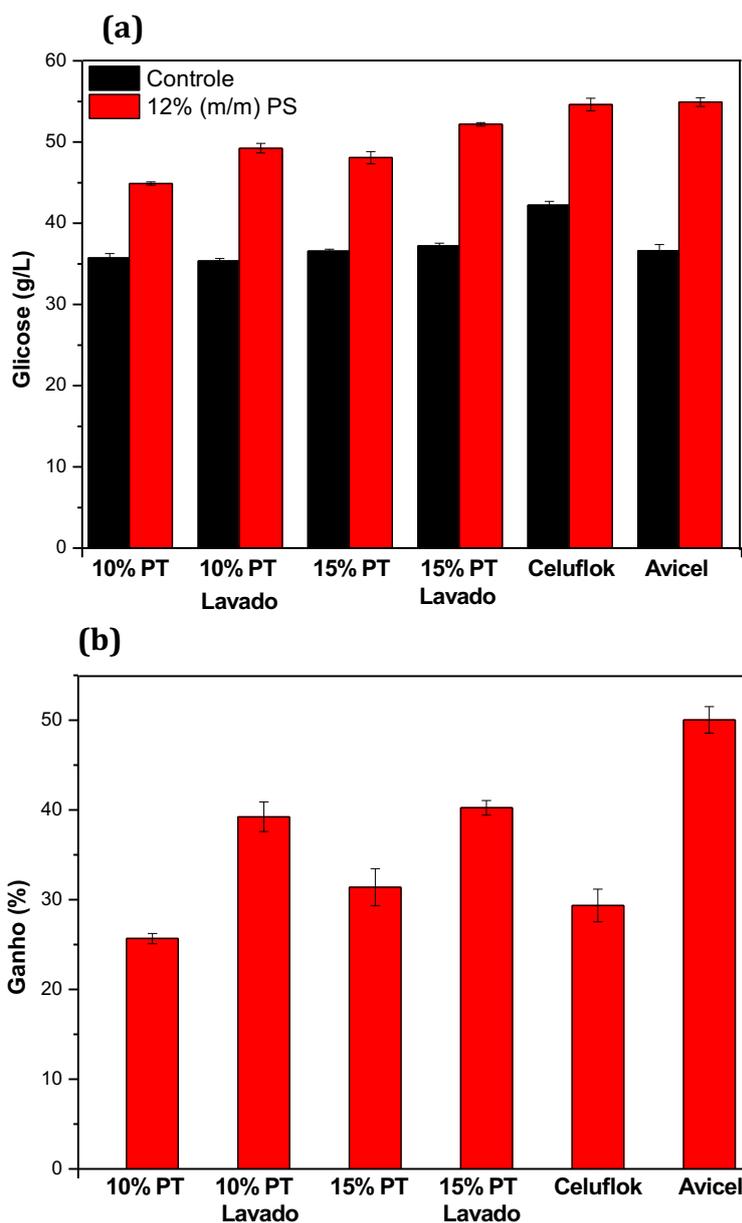


Figura 24. Avaliação do efeito da proteína de soja na hidrólise do bagaço hidrotérmica pré-tratado com 10 e 15% (m/v) de sólidos (lavado e sem lavar), e da celulose microcristalina pura (celuflok e avicel). As hidrólises foram realizadas com carga enzimática de 10 FPU/g, 15% sólidos, por 24h, 50°C e 30 rpm. As barras em preto representam os controles (hidrólise sem aditivo) e em vermelho a hidrólise com a proteína (12% (m/m)). (a) liberação de glicose; (b) ganho.

Em relação à hidrólise da celulose microcristalina, tanto para a celuflok quanto para a Avicel, a adição da proteína aumentou a conversão enzimática destes materiais, com o ganho chegando a 50% para a hidrólise da Avicel. Tal resultado contrasta com o que até o presente momento foi encontrado na literatura. A utilização da proteína de soja como aditivo na hidrólise de materiais lignocelulósicos é associada a redução da adsorção

improdutiva de enzimas na lignina (Brondi et al., 2019; Florencio et al., 2019, 2016). Nesse sentido, Florencio et al. (2019, 2016) observaram que a hidrólise da celuflok (material que pode ser considerado celulose pura, uma vez que possui um baixo teor de lignina) pela enzima Cellic CTec2[®] e por extratos enzimáticos produzidos *in house* apresentaram a mesma conversão na presença e ausência da proteína de soja na hidrólise. Assim, os autores creditaram o efeito do aditivo relacionado a interação deste com a lignina, reduzindo a adsorção improdutiva. Frente ao resultado aqui obtido, nos itens 5.2, 5.3 e 5.4 uma melhor avaliação do efeito e da interação da proteína de soja com a Cellic CTec3[®] e com o bagaço de cana será realizada.

5.1.9. Comparação do efeito das enzimas Cellic CTec2[®] e Cellic CTec3[®]

Avaliou-se o efeito dos coquetéis enzimáticos comerciais Cellic CTec2[®] e Cellic CTec3[®] na hidrólise do bagaço de cana hidrotérmico, pré-tratado com 10% de sólidos e sem a posterior lavagem deste. A hidrólise foi realizada por 24 h a 50°C. A Figura 25 apresenta os dados referentes a liberação de glicose (a) e aos ganhos (b). As barras em cores sólidas são referentes a Cellic CTec3[®], enquanto que as hachuradas referem-se a CTec2[®].

Em ambos os casos avaliados, a adição da proteína aumentou o rendimento da sacarificação, sendo que foi para a CTec3[®] que o ganho foi mais elevado (26% para a CTec3[®] e 16,5% pra a CTec2[®]). Florencio et al. (2019) realizaram a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado nas mesmas condições deste estudo e realizaram a sacarificação nas mesmas condições aqui especificadas para a Cellic CTec2[®] (sem e com a proteína de soja, 12% (m/m)). No entanto, os autores obtiveram ganhos superiores aos aqui reportados, chegando a valores próximos a 90%, enquanto que na Figura 25(b) o ganho da CTec2[®] foi de apenas 17%. Por outro lado, as concentrações de glicose obtidas também foram

diferentes, apresentando valores de 16 g/L para o controle e 30 g/L para a hidrólise com proteína em Florencio et al (2019), enquanto que na Figura 25 foram obtidos valores de 28 e 33 g/L para os controles e na presença do aditivo, respectivamente. Tal diferença pode ser resultado da atividade diferente das enzimas utilizadas, ou do bagaço de cana utilizado na hidrólise, proveniente de usinas diferentes.

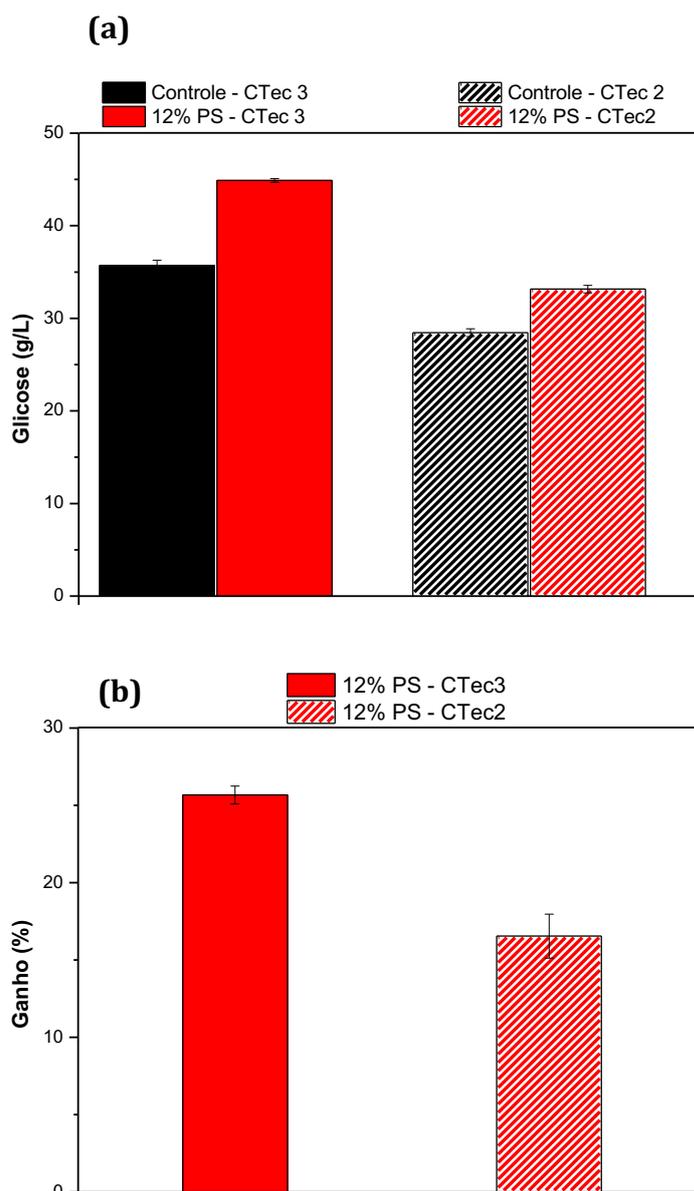


Figura 25. Avaliação do efeito da proteína de soja na hidrólise do bagaço hidrotérmica pré-tratado com 10 e 15% (m/v) de sólidos (lavado e sem lavar), e da celulose microcristalina pura (celufloc e avicel). As hidrólises foram realizadas com carga enzimática de 10 FPU/g, 15% sólidos, por 24h, 50°C e 30 rpm. As barras em preto representam os controles (hidrólise sem aditivo) e em vermelho a hidrólise com a proteína (12% (m/m)). (a) liberação de glicose; (b) ganho.

Na Figura 25 percebe-se, também, o efeito superior da CTec3[®] na hidrólise, uma vez que, para uma mesma carga enzimática, esta resultou em uma maior liberação de glicose do que a CTec2[®]. Isso ocorre pois, conforme já foi anteriormente relatado (item 5.1.3), a Cellic CTec3[®] apresenta, além de maior FPAse (atividade enzimática total medida em papel de filtro), uma maior quantidade de enzimas acessórias, que agem de forma sinérgica com as celulases, aumentando a performance deste coquetel na sacarificação enzimática (Sun et al., 2015).

5.1.10. Hidrólise em biorreator

A fim de avaliar o efeito da hidrólise com a proteína de soja como aditivo em um sistema com condições mais próximas a realidade industrial, a hidrólise do bagaço de cana hidrotérmico foi realizada em um reator de 500 mL do tipo tanque agitado, equipado com dois impelidores do tipo orelha de elefante. A representação esquemática do reator utilizado, assim como suas dimensões características, foram previamente apresentadas na Figura 10. A carga de sólidos da hidrólise foi de 15% (m/v), carga enzimática de 10 FPU/g de substrato, 24 horas de hidrólise a 50°C e avaliou-se as seguintes condições, conforme apresentado pela Figura 26: (1) controle (sem aditivo, representado pela barra preta), (2) hidrólise com 12% (m/m) de proteína de soja (barras vermelhas), (3) 0,1% (m/v) de Tween 80 (barras azuis) e (4) 0,1% Tween com 1% de proteína de soja (barras azuis hachuradas). O item (a) representa as concentrações de glicose, enquanto que (b) apresenta os ganhos.

Conforme os dados obtidos pelos experimentos nestas mesmas condições, realizados em frascos de 5 mL (item 5.1.7), os resultados aqui apresentados, seja pela utilização dos aditivos separadamente ou associados, aumentaram a conversão enzimática do material lignocelulósico. Para a hidrólise com 12% de proteína de soja o ganho obtido

(25%) se mostrou próximo ao do frasco de 5 mL (26%). No entanto, para a hidrólise com o Tween e com os aditivos associados, os ganhos obtidos pelo biorreator reduziram em relação aos frascos, passando de 19 para 8% quando apenas o Tween foi utilizado e de 24% para 16% quando os aditivos foram associados.

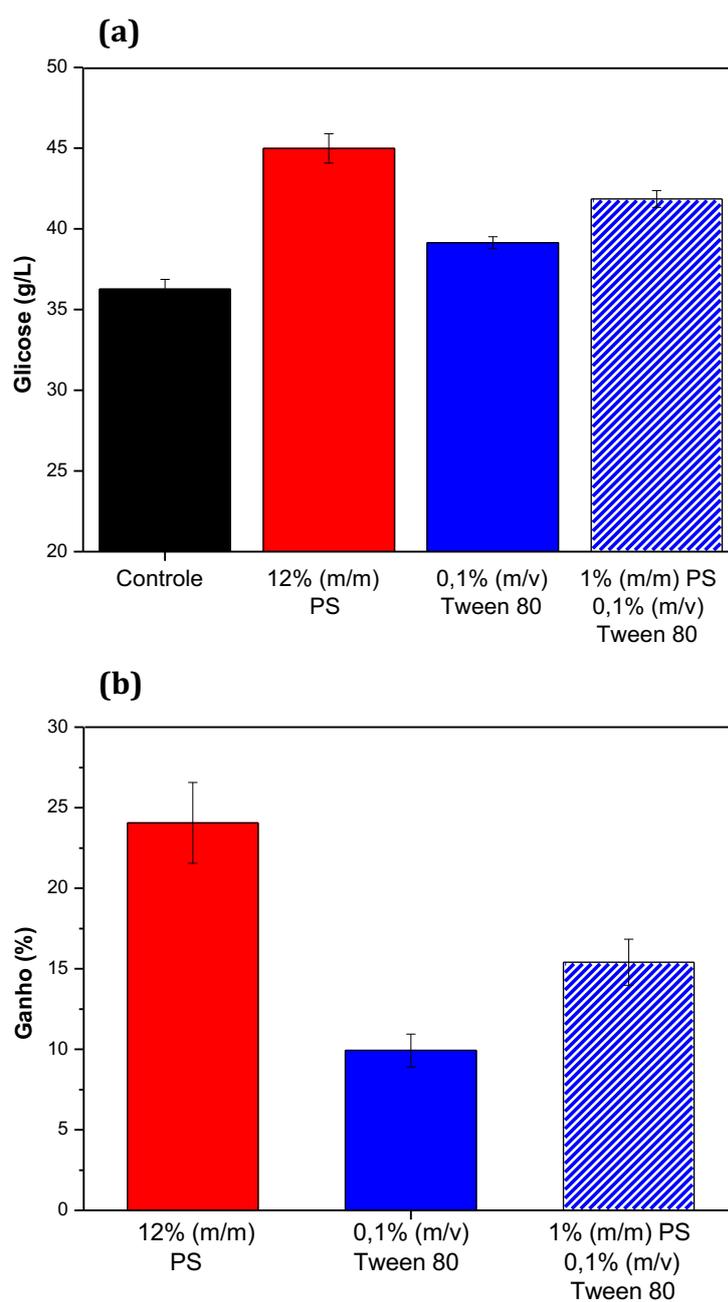


Figura 26. Hidrólise enzimática em biorreator. Carga de bagaço de 15% (m/v), 10 FPU/g de sólidos de enzima, por 24 horas, 50°C e 250 rpm. Barra preta representa o controle, as vermelhas referem-se a utilização de 12% de proteína de soja, as azuis possuem 0,1% de Tween 80 e as hachuradas em azul são referentes a associação do aditivos Tween (0,1%) e proteína de soja (1%). (a) Liberação de glicose e (b) ganhos.

No entanto, deve-se destacar que as condições experimentais utilizada no reator podem ser futuramente otimizadas, de modo a melhorar o desempenho do processo de hidrólise, por meio de parâmetros como a velocidade de agitação e do modo de operação. Na literatura, por exemplo, a batelada alimentada é apresentada como uma estratégia interessante. Segundo Modenbach & Nokes (2013), operações em batelada alimentada permitem reduzir a viscosidade inicial do meio reacional, reduzindo, assim, problemas relacionados a agitação da solução e difusão. Martins et al. (2015) realizaram a hidrólise do bagaço de cana durante 24 horas, com 15 FPU/g de sólidos e avaliaram, para uma carga de sólidos final fixa em 15% (m/v), os modos de operações batelada e batelada alimentada. Para o primeiro caso, a conversão enzimática foi de 63,9%, enquanto que para a batelada alimentada, aumentou-se a conversão para 69,5%.

5.1.11. Efeito da proteína de soja na atividade enzimática

O efeito da proteína de soja na atividade e na estabilidade da Cellic CTec 3[®] foi avaliado objetivando determinar se o aditivo afetava o desempenho das enzimas durante o processo de sacarificação enzimática. Para tanto, mediu-se a FPAse da enzima, na presença e ausência da proteína de soja, logo após a incubação destas com o tampão (tempo 0) e após 24 horas de incubação a 50° C. A atividade residual foi calculada como a porcentagem da atividade remanescente medida, em comparação com o controle (enzima e tampão no tempo 0). A Figura 27 apresenta as atividades residuais logo após a incubação da enzima com o aditivo (barra vermelha) e após deixar a enzima (com e sem proteína de soja – barras hachuradas em preto e vermelho, respectivamente) por 24 horas a 50°C e 30 rpm.

Os resultados mostram que a adição do aditivo não acarretou redução na atividade enzimática no início da incubação (tempo zero), uma vez que a atividade residual foi de

100% (valor de atividade igual ao controle). Após 24 horas de incubação, as atividades sem e com proteína de soja diminuíram, apresentando valores residuais de 70,2 e 79,5%, respectivamente. No entanto, é importante destacar que a adição da proteína de soja fez com que essa redução na atividade fosse menor, ou seja, a proteína fez com que as enzimas se mantivessem mais estáveis após 24 horas.

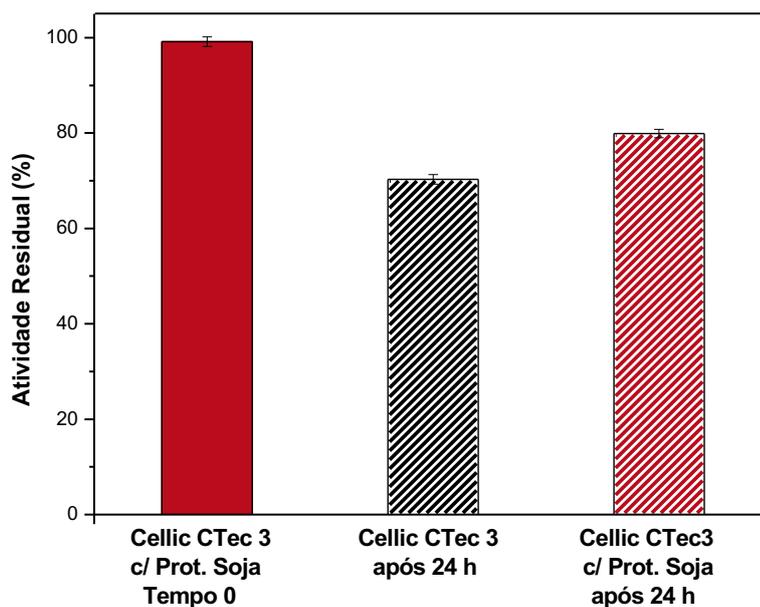


Figura 27. Determinação da atividade enzimática (FPAse) da enzima Cellic CTec3[®], no tempo zero (barra com cor cheia) e após 24 horas de incubação (barras hachuradas), com e sem proteína de soja. A Atividade residual corresponde a porcentagem de atividade obtida em relação ao controle (tempo zero, sem proteína de soja).

Wang et al. (2014) estudaram o efeito da BSA na estabilidade da enzima *Acremonium cellulase*. Os autores obtiveram efeito similar ao aqui observado pela Figura 27, uma vez que a BSA não afetou a atividade enzimática no tempo 0, além de manter a enzima mais estável do que o controle para os tempos de 24 e 48 horas de incubação. O estudo concluiu que a BSA aumenta a sacarificação enzimática atuando tanto no aumento da estabilidade das enzimas, quanto na redução da adsorção improdutiva. De modo similar, Rocha-Martin et al. (2017) mostraram que o PEG4000 (polietilenoglicol) também aumenta a atividade e estabilidade enzimática. Os autores investigaram o efeito

do aditivo em componentes individuais das celulases (endoglucanase, beta-glicosidase e celobiohidrolase) e salientaram que o polímero, além de aumentar a atividade das enzimas endoglucanase e beta-glicosidase, também mantiveram elas mais estáveis em relação ao controle para tempos de até 72 horas de incubação.

Florencio et al. (2019) avaliou o efeito da proteína de soja na estabilidade tanto da FPAse da Cellic CTec2[®], quanto das enzimas endoglucanase, beta-glicosidase, celobiohidrolase e xilanase. Apesar de relatarem o efeito positivo do aditivo na hidrólise, os autores não observaram o aumento da estabilidade após 24 horas de incubação da proteína com a enzima, contrastando com o que foi aqui apresentado. Possivelmente a proteína de soja pode estar melhorando a estabilidade de algum componente presente no coquetel enzimático comercial Cellic CTec3[®] que não é presente na CTec2[®], como, por exemplos, algumas LPMO's. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para melhor investigar este efeito.

5.2. Análise Elementar CHN

A análise Elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi realizada com o objetivo de se obter possíveis evidências da interação do aditivo com a biomassa. Como a proteína de soja possui nitrogênio em sua estrutura molecular (Pauling et al., 1951; Richardson, 1981), um aumento no teor de nitrogênio nas amostras após a incubação pode ser um indicativo da adsorção desta pelo bagaço.

A Figura 28 apresenta os teores de nitrogênio nas amostras incubadas com diferentes concentrações de proteína, onde 0 (zero – barra preta) representa o teor de nitrogênio no controle. Desse modo, percebe-se que a medida que a concentração de aditivo nas amostras aumentou, o teor de nitrogênio nestas também foi elevado em relação ao controle. Tal fato também foi observado por Brondi et al. (2019), que realizaram a

análise elementar após adsorver o bagaço pré-tratado por explosão a vapor com 8, 12 e 20% de proteína de soja. Os autores relataram que o aumento na concentração de proteína acarretou o aumento na porcentagem de nitrogênio das amostras em relação ao controle. A BSA apresentou o mesmo efeito, sendo este aditivo muito relatado na literatura por reduzir a adsorção improdutiva, ligando-se na lignina do material lignocelulósico ao invés das enzimas celulolíticas (Brethauer et al., 2011; Kim et al., 2015; Kumar & Wyman, 2009; Méndez Arias et al., 2017). Desse modo, os dados da Figura 28 representam um indicativo da interação do aditivo com o bagaço.

Buscou-se realizar esta mesma análise para o bagaço adsorvido com as frações solúveis da proteína. No entanto, estas não estão aqui apresentadas, pois as quantificações foram semelhantes ao controle. Isso pode ser devido a baixa concentração da fração solúvel ou pode ser resultado da não interação desta com o material. Assim, outros estudos seriam necessários para melhor investigar a interação bagaço-fração solúvel da proteína de soja.

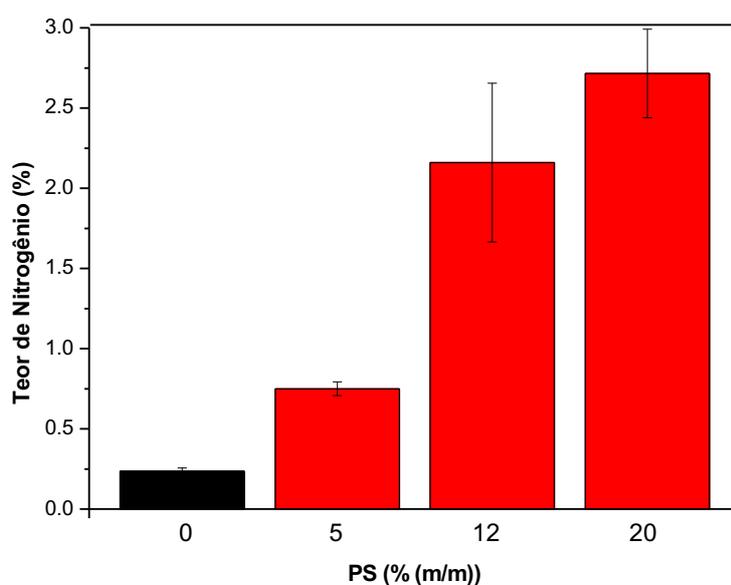


Figura 28. Quantificação do teor de nitrogênio (%) nas amostras após a incubação do bagaço por 24 horas com diferentes concentrações de proteína de soja. A barra em preto representa o controle (incubação sem a proteína).

5.3. Caracterização do conjunto biomassa-aditivo por FTIR

5.3.1. Efeito de diferentes cargas de proteína de soja na adsorção

Para avaliar a interação da proteína de soja com o bagaço de cana-de-açúcar, realizou-se análises de FTIR. Por meio da identificação das bandas correspondentes as principais frações do material lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina) e da comparação dos espectros obtidos, pode-se avaliar se a proteína está, de fato, interagindo com o bagaço e em quais regiões da biomassa essa ligação ocorre. A Figura 29 apresenta a comparação dos espectros de FTIR do bagaço pré-tratado sem o aditivo e deste após 24 horas de incubação com diferentes cargas de proteína de soja (8, 12 e 16%), além do espectro da proteína isolada.

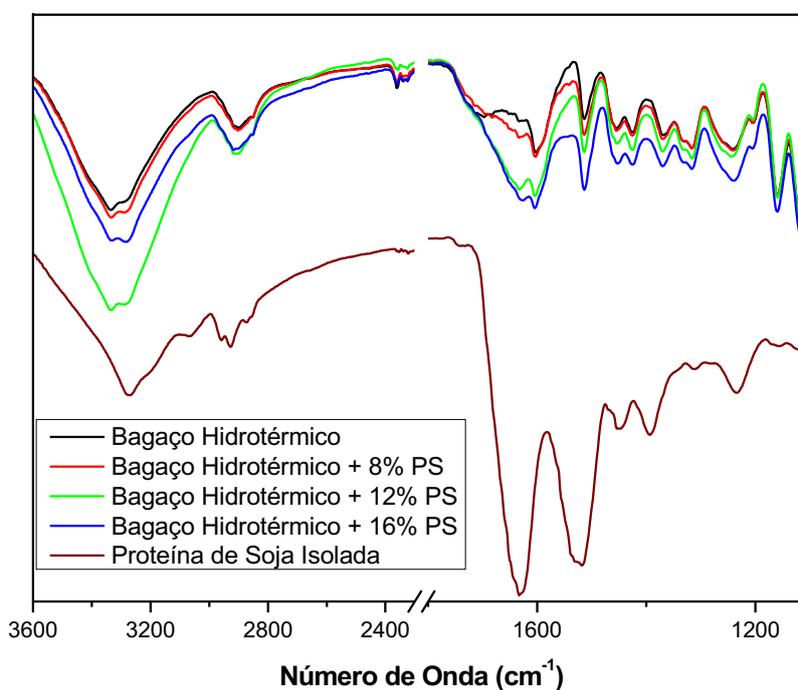


Figura 29. Espectros obtidos por FTIR do bagaço de cana (15% sólidos) incubado por 24 horas, a 50°C, na ausência e presença da proteína de soja, em diferentes concentrações.

A partir dos espectros apresentados pode-se observar que a medida que a concentração de proteína de soja aumentou, houve bandas que aumentaram sua intensidade em relação ao espectro do bagaço sem proteína. Esse aumento na intensidade ocorreu principalmente em regiões onde a proteína de soja isolada também apresentava picos com altas intensidades, sendo esta uma evidência da interação entre a biomassa e o aditivo. A Tabela 9 apresenta as principais bandas que sofreram alterações após a incubação do bagaço com a proteína, além de informar se estas bandas eram comuns ao espectro da proteína isolada.

Por meio da análise da Tabela 9 verificou-se que a maioria das alterações espectrais observadas após a incubação do bagaço com a proteína de soja ocorreram em regiões típicas de componentes estruturais da lignina, sendo este um forte indicativo de que a proteína está interagindo com a lignina do bagaço de cana-de-açúcar. Esta constatação está de acordo com o que foi reportado por Florencio et al. (2019, 2016) e Brondi et al. (2019), que observaram que a proteína de soja era adsorvida principalmente pela lignina do bagaço pré-tratado. Tais constatações foram feitas pelos autores por meio da avaliação de dados de FTIR, do efeito da proteína na atividade das enzimas e da hidrólise de materiais sem lignina (celulose microcristalina). Os dados obtidos por esta análise, associados ao fato de que a proteína de soja aumentou o rendimento da hidrólise, podem indicar que tal aditivo, além de aumentar a estabilidade enzimática também está atuando na redução da adsorção improdutiva de celulasas, interagindo com a lignina da biomassa no lugar das enzimas, o que aumentaria a concentração de enzimas livres no meio reacional, aumentando, assim, a liberação de glicose.

Tabela 9. Alterações estruturais observadas após a análise por FTIR

Comprimento de onda (cm⁻¹)	Tipo de alteração na banda em relação ao controle (bagaço)	Componente da biomassa ou da proteína associado
3280	Aumento da intensidade	Grupos O-H e N-H presentes tanto na biomassa (celulose, lignina e hemicelulose) quanto na proteína de soja (Chen et al., 2013; Guo et al., 2009)
1695	Ausência para os espectros com 10 e 14% de proteína	Estiramento de ligações C=O presentes na lignina (Xu et al., 2013)
1628	Aumento da intensidade	Ligações C-Fenóis presentes na lignina (Pereira et al., 2016); Banda relativa ao Amido I (C=O) presente na proteína de soja (Chen et al., 2013)
1605	Aumento da intensidade	Vibração estrutural dos anéis aromáticos da lignina (Harrison et al., 2013)
1520	Aumento da intensidade	Vibração estrutural dos anéis aromáticos da lignina (Harrison et al., 2013); Banda relativa ao Amido II (ligações C-N e N-H) presente na proteína de soja (Chen et al., 2013)
1450	Aumento da intensidade	Deformação de ligações C-H presentes na lignina e na proteína de soja (Harrison et al., 2013)
1422	Aumento da intensidade	Deformação C-H presente na lignina (Xu et al., 2013)
1235	Aumento da intensidade	Estiramento C-O presente na fenóis relacionados a lignina (Corrales et al., 2012); Ligações C-N presente na proteína de soja (Chen et al., 2013)

5.3.2. Avaliação da interação da proteína de soja solúvel com a biomassa lignocelulósica

Buscou-se avaliar, também, se havia interação da fração solúvel da proteína de soja com o bagaço de cana de açúcar. Para tanto, realizou-se o FTIR do bagaço adsorvido com

as frações solúveis da proteína, no entanto, nenhuma alteração significativa nos espectros em relação ao espectro controle (somente bagaço) foi detectada. A Figura 30 apresenta o espectro do controle (preto) juntamente com o bagaço adsorvido com 1,26 g/L de proteína solúvel (vermelho) que foi extraída a partir de uma solução com concentração inicial de proteína de 100 g/L.

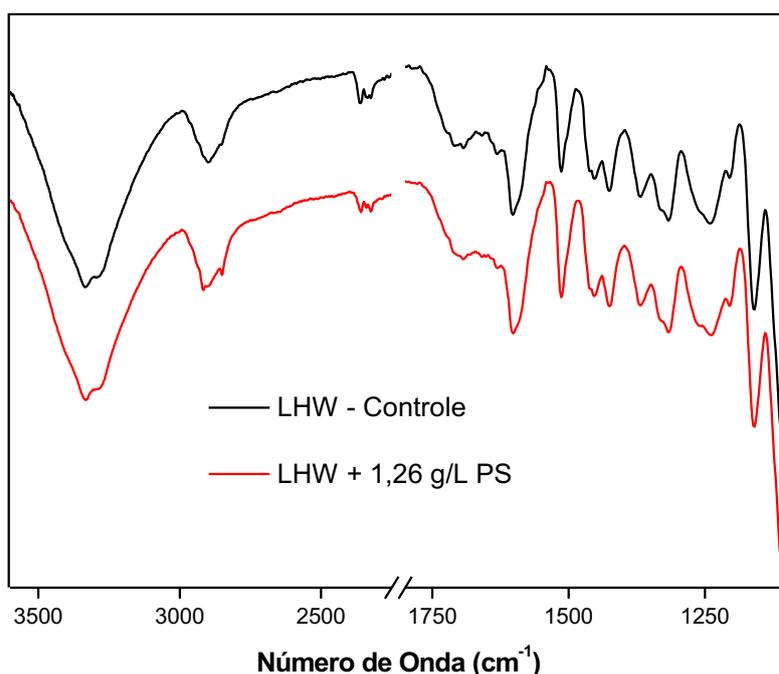


Figura 30. Espectros obtidos por FTIR do bagaço de cana (15% sólidos) incubado por 24 horas, a 50°C, na ausência e presença da proteína de soja solúvel, para a concentração de 1,26 g/L.

5.3.3. Avaliação do tipo de interação da proteína de soja com o bagaço de cana

Objetivando-se melhor entender a interação da proteína de soja com a lignina da biomassa, realizou-se ensaios de adsorção nos quais o aditivo foi incubado com o bagaço em tampões com diferentes pHs. Como já foi relatado, a proteína de soja apresenta ponto isoelétrico (pI) no pH 4,5. Desse modo, se a proteína é adicionada em um pH inferior ao seu pI, esta apresentará cargas positivas em sua superfície. Em pHs superiores, a superfície irá adquirir cargas negativas. De acordo com Ko et al., (2015c), a lignina

apresenta uma superfície negativamente carregada, desse modo, se a interação entre a proteína de soja e a lignina for do tipo eletrostática, esta deverá ser favorecida em pHs abaixo do pI do aditivo. A avaliação da interação biomassa-aditivo em diferentes pHs foi realizada utilizando-se a espectroscopia de FTIR. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 31.

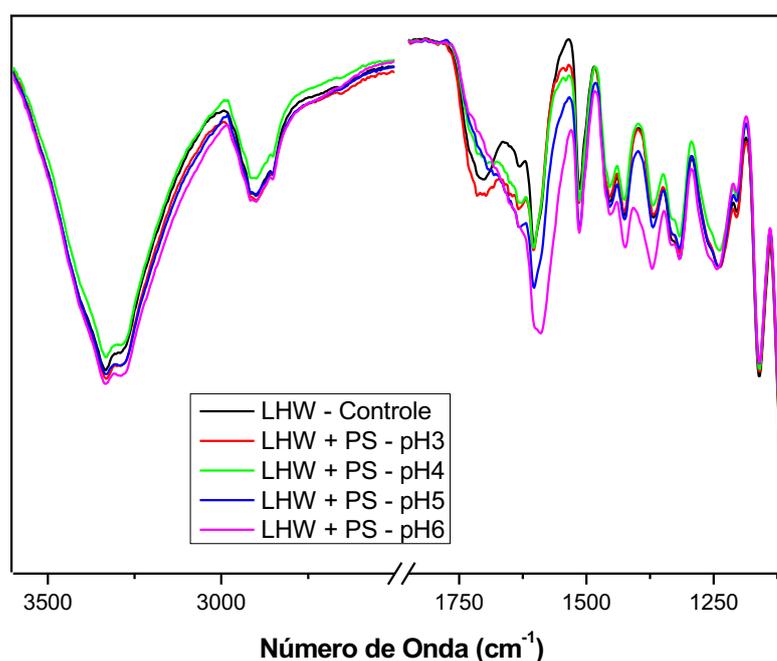


Figura 31. Espectros obtidos por FTIR do bagaço de cana (15% sólidos) incubado por 24 horas, a 50°C, na ausência e presença da proteína de soja (12%), em diferentes pHs.

A análise dos espectros indica que à medida que o pH aumentou, a intensidade de bandas presentes na região característica da lignina (1700 – 1200 cm^{-1}) também aumentaram em relação ao controle (bagaço sem aditivo), sendo este um efeito contrário ao esperado caso as interações principais do aditivo com a lignina fossem do tipo eletrostática.

Outra forma de se avaliar o efeito de interações eletrostáticas na adsorção da proteína no bagaço seria realizando a adsorção em diferentes concentrações de sal (NaCl) (Ko et al., 2015c). Em altas concentrações de sal, os íons presentes em solução interagem

com os íons presentes na lignina e na proteína, reduzindo a interação eletrostática entre estes. O efeito da interação biomassa-aditivo em diferentes concentrações de sais foi avaliado por FTIR. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 32, sendo que a análise destes mostrou que, conforme já foi relatado anteriormente, a adição da proteína de soja intensificou várias bandas presentes em regiões típicas da lignina, no entanto, a adsorção em diferentes concentrações de sais pouco alterou os espectros. Com exceção da banda presente em 3280 cm^{-1} , que pode apresentar diferentes intensidades em virtude das diferentes umidades do bagaço analisado, as demais bandas de todos os espectros que apresentaram proteína de soja encontram-se praticamente sobrepostas. Isso constitui mais uma evidência de que as interações eletrostáticas possuem pouco efeito na adsorção da proteína na lignina e que, provavelmente, são as interações hidrofóbicas as principais responsáveis por adsorver a proteína de soja na lignina do bagaço.

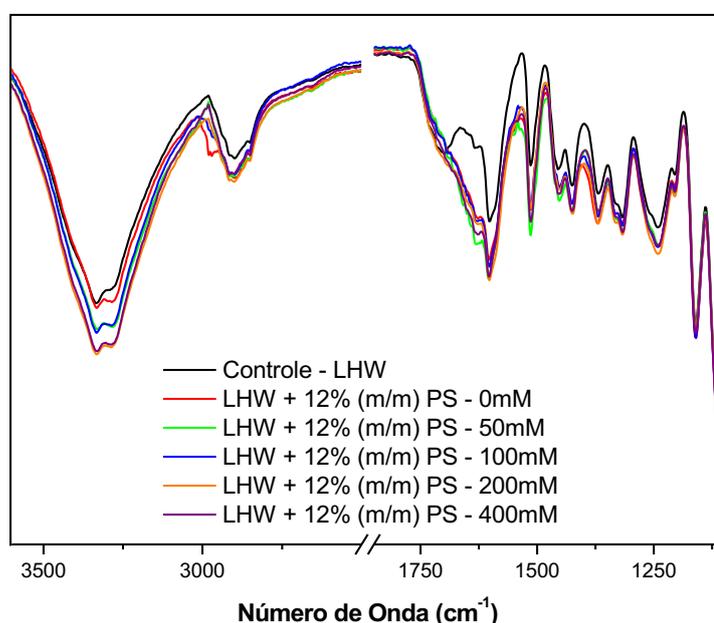


Figura 32. Espectros obtidos por FTIR do bagaço de cana incubado por 24 horas, a 50°C , na ausência e presença da proteína de soja, em diferentes concentrações de NaCl.

5.4. Adição da proteína de soja no contexto da biorrefinaria integrada de etanol 1G-2G: Análise Tecno-Econômica Reversa

5.4.1. Análise tecno-econômica reversa

A fim de se averiguar o efeito da adição da proteína de soja no contexto de uma biorrefinaria integrada de etanol 1G-2G, realizou-se a análise tecno-econômica reversa. Esta foi realizada baseando-se na simulação da biorrefinaria desenvolvida no ambiente EMSO por pesquisadores do LaDABio/DEQ-UFSCar (Furlan et al., 2016; Longati et al., 2018). Esta análise permitiu a comparação dos dados experimentais obtidos e apresentados nos tópicos anteriores desta dissertação com os dados simulados. Algumas das análises que serão apresentadas a seguir foram realizadas considerando-se como índice econômico o Valor Presente Líquido (VPL) da biorrefinaria igual a zero, permitindo, assim, a obtenção de metas de desempenho a serem atingidas experimentalmente de modo que o processo de produção do etanol lignocelulósico com a adição da proteína de soja durante a hidrólise enzimática se viabilize economicamente. A adição da proteína de soja na simulação ocorreu conforme relatado no tópico 4.9.

Assim, após a introdução da proteína na simulação, avaliou-se o efeito das variáveis carga de sólidos e de enzimas na mínima conversão necessária para que a biorrefinaria passe a ser economicamente viável ($VPL = 0$), dada uma certa concentração de proteína de soja a ser utilizada no processo. A Figura 33 apresenta os dados desta análise, onde as linhas tracejadas representam 80% de conversão, enquanto que as contínuas são relativas a 90% de conversão, sendo que as linhas pretas representam o caso sem proteína de soja, enquanto que as linhas amarelas, azuis, verdes, vermelhas e roxas são relativas as concentrações de 1, 5, 8, 12 e 15% (m/m) de proteína de soja utilizada na hidrólise. O tempo de reação considerado no reator de hidrólise foi de 24 horas e o custo da adição do

aditivo no processo foi considerado zero. Os dados relativos a 15% (m/m) de proteína foram obtidos até uma fração mássica de sólidos de 15% pois valores acima deste apresentaram problemas de convergência na simulação.

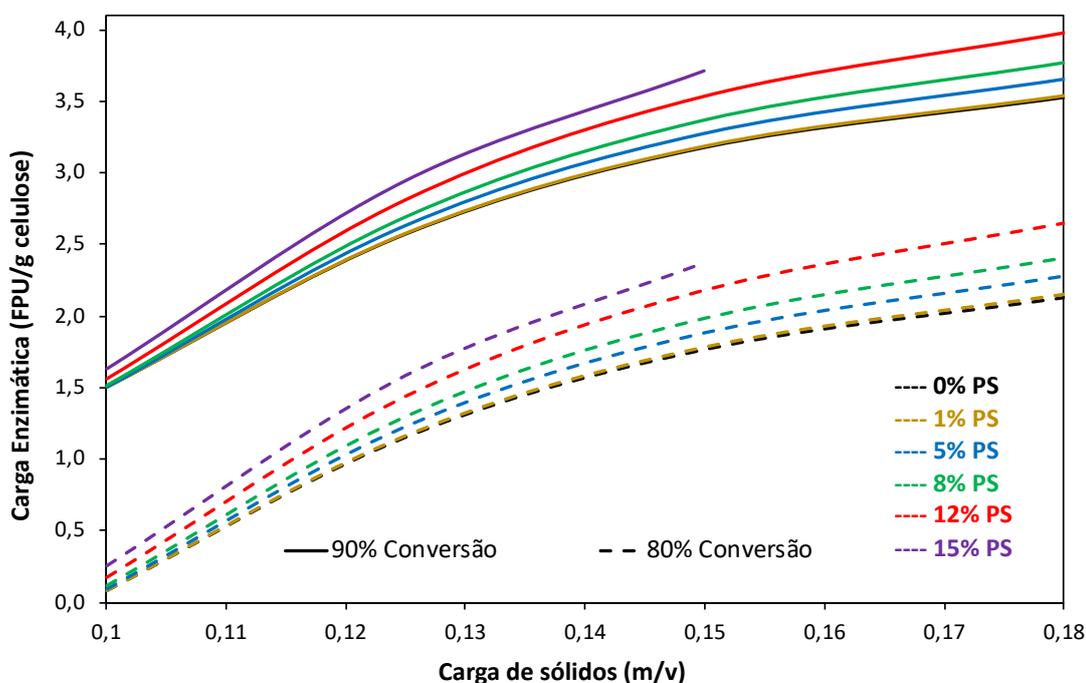


Figura 33. Curvas isoeconômicas para VPL=0, avaliando o efeito das variáveis carga de sólidos, carga de enzimas, concentração de aditivo e conversão da biomassa, para 24 horas de hidrólise enzimática, considerando custo zero da proteína para a biorrefinaria. As linhas tracejadas referem-se a 80% de conversão, enquanto que as contínuas referem-se a 90%. Cada cor está associada a uma concentração diferente de aditivo na hidrólise.

Assim, na Figura 33, as linhas coloridas internas ao gráfico apresentam a mínima conversão necessária, dada uma certa carga de sólidos e de enzima, para que o Valor Presente Líquido (VPL) da planta industrial seja zero, e o processo passe a ser economicamente viável. Ou seja, para uma carga de bagaço de 15% na hidrólise e carga enzimática de 2,2 FPU/g de celulose (aproximadamente 1,1 FPU/g de bagaço), a mínima conversão necessária para que a adição de 12% de proteína de soja passe a ser viável é de 80% (linha tracejada em vermelho). Para 15% de sólidos e 3,5 FPU/g de celulose (1,75 FPU/g de bagaço), a conversão requerida passa a ser de 90% para a hidrólise com 12% de aditivo. Experimentalmente, 12% (m/m) de proteína, durante 24 horas de hidrólise,

para uma carga de sólidos de 15% liberaram 30,5 g/L de glicose, para 5 FPU/g de bagaço (aproximadamente 10 FPU/g de celulose) e 45 g/L para 10 FPU/g de bagaço (20 FPU/g de celulose), que correspondem, respectivamente, a conversões enzimáticas de 33 e 48%. Ou seja, os dados obtidos experimentalmente ainda estão distantes da viabilização econômica da adição da proteína na etapa de hidrólise, uma vez que as conversões ainda estão baixas e as cargas enzimáticas utilizadas estão muito elevadas.

Para os dados experimentais de 5 e 10 FPU/g de sólidos anteriormente relatados, avaliou-se na simulação o VPL do processo, sendo este igual a $-2,17 \times 10^8$ e $-4,51 \times 10^8$ US\$, respectivamente, o que evidencia que estas condições ainda estão longe da viabilidade. Desse modo, a partir dos dados obtidos, tem-se que aumentar a eficiência do uso da proteína de soja no processo, além de reduzir a carga enzimática a ser utilizada na hidrólise é um fator fundamental de modo a viabilizar o uso do aditivo. Baixas cargas enzimáticas são requeridas frente ao alto custo das enzimas celulolíticas (Klein-Marcusamer et al., 2012). Assim, reduzir o custo destas também auxiliaria no aumento da conversão do processo, uma vez que custos menores possibilitariam a utilização de maiores cargas enzimáticas, aumentando a conversão da biomassa. É importante ressaltar que a enzima utilizada na simulação não representa um coquetel enzimático comercial, sendo que seu custo foi baseado no estudo de Klein-Marcusamer et al. (2012) que consideraram o valor de 14,10 US\$/kg como sendo o preço da enzima.

A partir dos dados apresentados no gráfico, tem-se, também, que o aumento da carga de sólidos permite trabalhar com cargas enzimáticas maiores, para uma mesma conversão. No entanto, para cargas de proteína maiores do que 5%, não foi possível realizar a simulação com frações mássicas de bagaço superiores a 0,18. Desse modo, assim como o observado pelo planejamento experimental, trabalhar com altas cargas de sólidos se faz vantajoso ao processo.

5.4.2. Efeito do custo da proteína na biorrefinaria

Na Figura 34, avaliou-se o efeito do custo da proteína de soja (0, 0,1, 1 e 3 US\$/kg) no VPL da biorrefinarias, para diferentes cargas de aditivo utilizadas no processo. Para tanto, fixou-se a conversão em 90%, o tempo de hidrólise em 24h, 1 FPU/g de celulose e 15% sólidos.

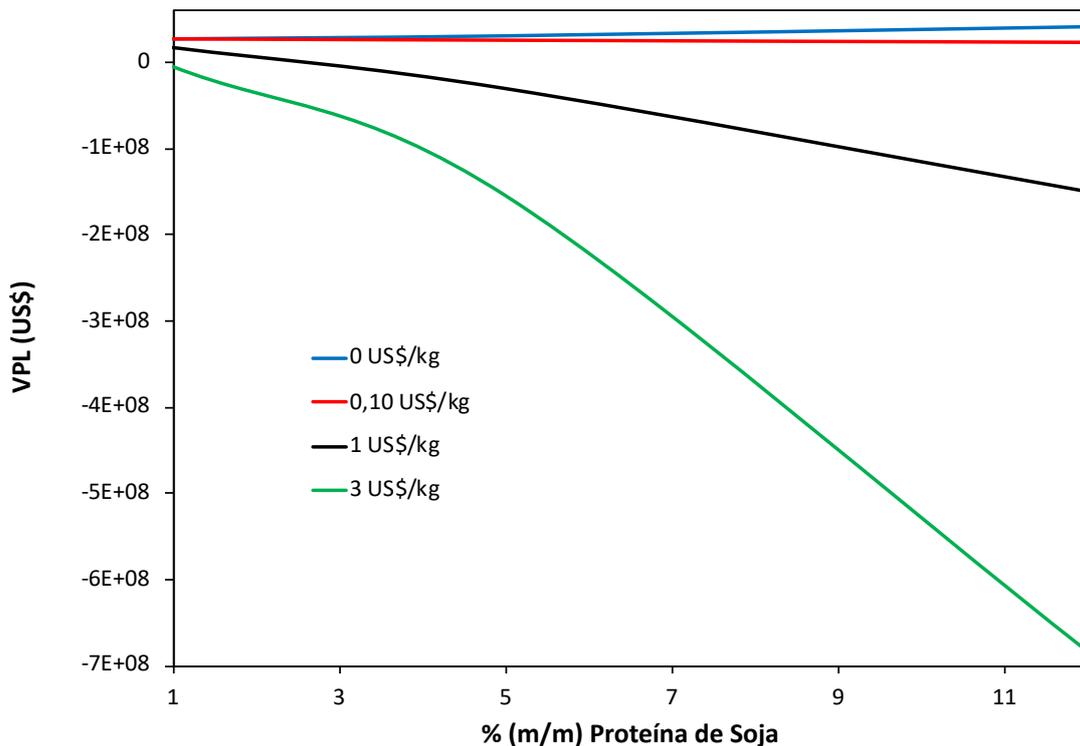


Figura 34. Efeito do custo da proteína de soja (0, 0,1, 1 e 3 US\$/kg) no VPL da biorrefinaria concentração de proteína de soja no VPL e na carga de sólidos, para 24 horas de hidrólise, 1 FPU/g celulose, 15% sólidos e considerando-se uma conversão fixa de 90% da celulose em glicose.

Conforme esperado, a medida que o preço do aditivo e sua concentração aumentaram no processo, estas variáveis impactaram negativamente o VPL, afastando-se da viabilidade econômica. Para os custos zero e de 0,10 US\$/kg, o VPL foi positivo em todas as faixas de concentração do aditivo estudadas. Para 3 US\$/kg, em todas as concentrações o VPL se mostrou negativo.

Brondi et al. (2019) indicou que a proteína de soja isolada possui um valor médio de 3 US\$/kg. Tal valor ainda é muito elevado para que se possa viabilizar a adição da proteína ao processo. Uma forma de reduzir os custos da adição da proteína seria integrar a produção da biorrefinaria de etanol com a de biodiesel de soja, onde a proteína seria um subproduto do processo disponível na unidade.

5.4.3. Efeito da carga enzimática e de proteína de soja no VPL para diferentes conversões

A Figura 35 avalia o efeito da concentração de proteína de soja para cargas enzimáticas de 1 e 2,5 FPU/g de celulose (linhas contínuas e tracejadas, respectivamente) para diferentes valores de conversão enzimática (50, 70, 80 e 90%), para o tempo de 24 horas, 15% sólidos e custo zero da proteína no processo.

A análise da Figura 35 permite observar que o aumento da carga enzimática afeta de forma negativa o VPL do processo uma vez que, dada uma mesma conversão, 2,5 FPU/g celulose apresentou sempre menor VPL do que 1 FPU/g. Isso se deve ao alto custo das enzimas celulolíticas que impactam fortemente o processo. Outra constatação é que, mesmo em baixas cargas enzimáticas, como 1 FPU/g de celulose (0,5 FPU/g bagaço), conversões menores do que 70% apresentaram VPL negativo em todas as faixas de concentração de aditivo estudadas.

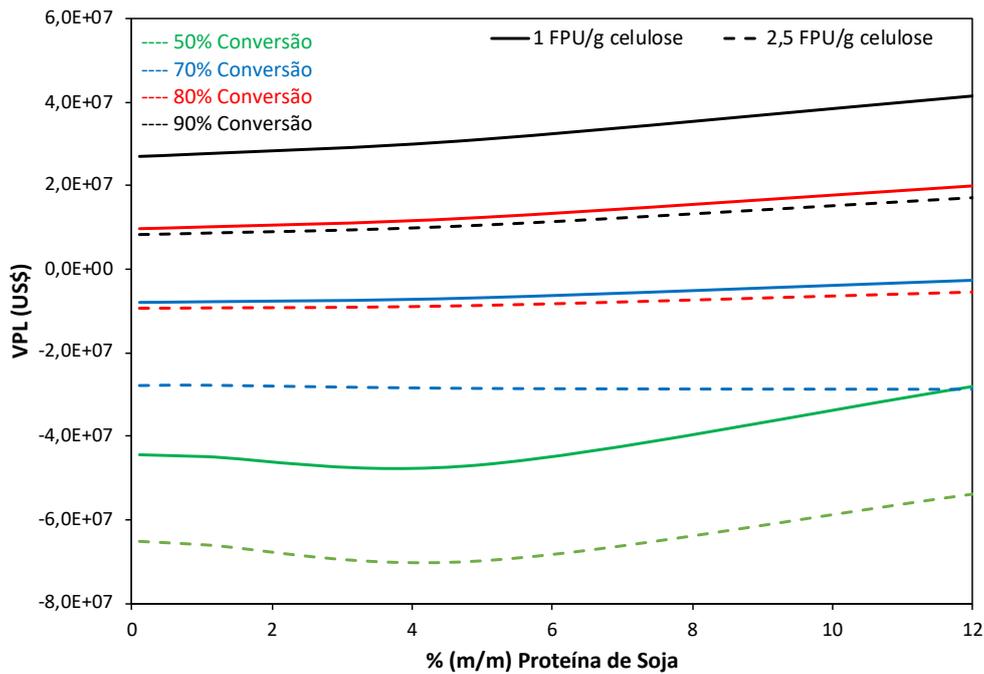


Figura 35. Efeito da carga enzimática (1 e 2,5 FPU/g), da conversão (50, 70, 80 e 90%) e da concentração de proteína de soja no VPL da biorrefinaria, fixando-se a carga de sólidos em 15% e custo zero da proteína para a biorrefinaria.

Um resultado interessante de ser destacado foi que o aumento da concentração de proteína de soja, de modo geral, acarretou um aumento no VPL do processo, auxiliando na viabilidade da biorrefinaria. Conforme evidenciado pela Figura 36, isso provavelmente está ocorrendo, pois, o aumento da concentração de proteína acarreta um aumento na energia elétrica total produzida e na energia excedente da planta industrial. Esse aumento ocorre, pois, conforme relatado anteriormente, a proteína, após a hidrólise, segue para queima nas caldeiras da biorrefinaria, onde gera-se energia elétrica. Os dados apresentados foram obtidos para 24 horas de hidrólise com 1 FPU/g celulose, 15% sólidos, 90% conversão e $VPL = 0$.

Esse resultado mostra que, desde que o custo da proteína de soja seja zero na biorrefinaria, trabalhar com cargas altas do aditivo, como por exemplo o teor de 12% definido experimentalmente, impactaria de forma positiva o processo, melhorando não apenas a conversão da hidrólise, como também a quantidade de energia gerada pela planta

industrial. Vale ressaltar que o efeito de cargas de proteína de soja maiores que 15% não puderam ser avaliados devido a problemas de conversão na simulação.

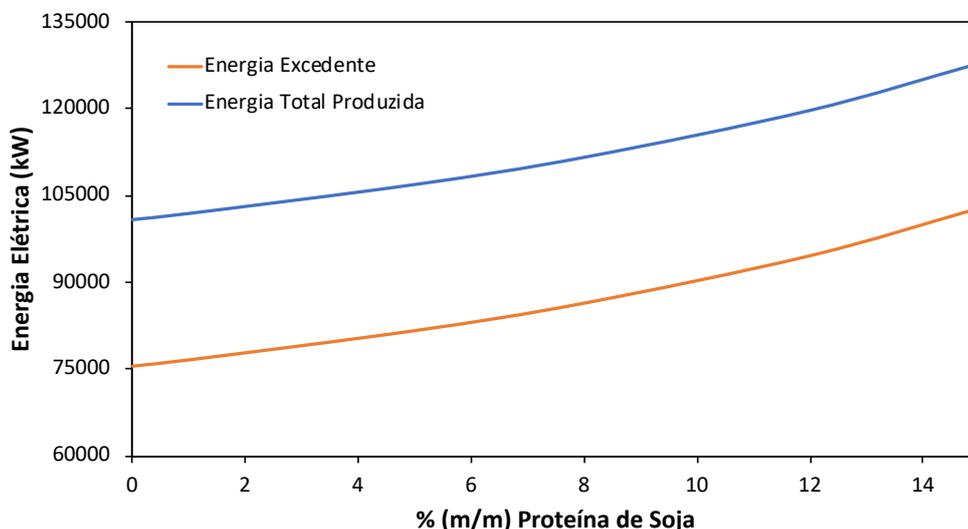


Figura 36. Energia elétrica total produzida e energia excedente em função da carga de aditivo, para 24 horas de hidrólise com 15% sólidos e 1 FPU/g de celulose, para VPL = 0, 90% de conversão e custo zero da proteína de soja para a biorrefinaria.

5.4.4. Efeito do tempo de hidrólise no VPL

Avaliou-se o efeito do tempo de hidrólise no VPL da biorrefinaria, para diferentes conversões e fixando-se a carga de sólidos em 15%, 1 FPU/g de celulose e 12% (m/m) de proteína de soja. Os dados obtidos estão representados na Figura 37.

Para uma dada conversão fixa, o aumento do tempo de hidrólise afetou negativamente o VPL do processo. No entanto, de modo geral, conforme pode ser observado na Figura 18 apresentada anteriormente, o aumento no tempo de hidrólise acarreta o aumento na conversão do material lignocelulósico. Se, por exemplo, em 24 horas de hidrólise a conversão foi de 60% (VPL = - 25.848.555 US\$) e em 48 horas ela passou para 70% (VPL = - 20.005.560 US\$), tem-se que aumentar o tempo de hidrólise se faz vantajoso pois o VPL se torna menos negativo. No entanto, em 24 horas de hidrólise com 70% de conversão, o VPL foi de -2.569.443 US\$, enquanto que para 48 horas com

80% de conversão, o VPL foi de -8.510.122 US\$ e, nesse caso, o aumento no tempo de hidrólise não se faz vantajoso pois torna o VPL da planta mais negativo. Desse modo, o aumento do tempo de hidrólise, apesar de aumentar a conversão, deve ser avaliado com cautela, uma vez que nem sempre esse aumento é refletido de forma positiva na viabilidade econômica do processo.

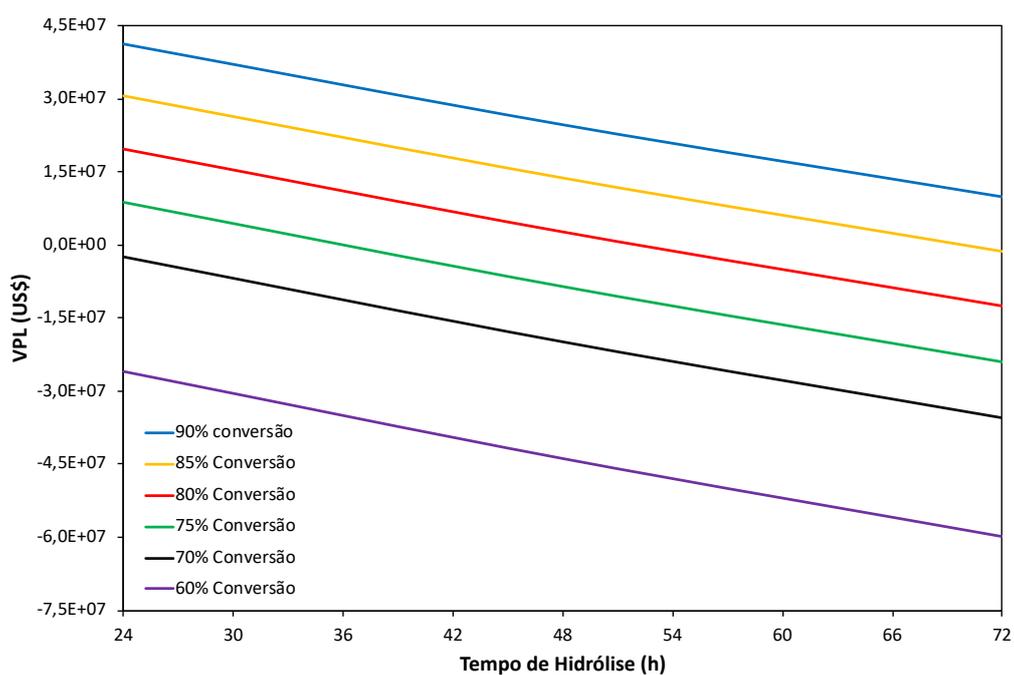


Figura 37. Efeito do tempo de hidrólise no VPL para diferentes conversões enzimáticas, fixando-se a carga de sólidos em 15%, 1 FPU/ g de celulose e 12% de proteína de soja.

6. CONCLUSÕES

Aumentar a eficiência do processo de hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas é uma etapa fundamental para que seja possível viabilizar economicamente a produção em escala industrial do etanol de segunda geração. Dessa forma, os dados aqui obtidos mostraram que a proteína de soja se mostrou um aditivo eficiente para o aumento da liberação de glicose do bagaço de cana de açúcar pré-tratado hidrotermicamente.

O planejamento experimental realizado mostrou que trabalhar com altas cargas de sólidos se faz importante para garantir o aumento na concentração de glicose durante a sacarificação da biomassa vegetal. No entanto, altas cargas de sólidos aplicadas em processos em batelada implicam em problemas de transporte de massa, agitação e inibição das enzimas pelos produtos formados, o que acarreta redução na conversão da biomassa, conforme foi demonstrado. Após a realização do planejamento, foi possível otimizar as variáveis carga de sólidos e de proteína de soja em 15% (m/v) e 12% (m/m), respectivamente.

O perfil temporal demonstrou que a adição de proteína de soja possibilitou o aumento de até 26% na liberação de glicose, além de possibilitar a redução do tempo de hidrólise em 66% ou a redução em 50% da carga enzimática da hidrólise. Tal fato é de grande importância para processos industriais, onde objetiva-se aumentar sempre o rendimento e reduzir o tempo de operação. Os dados obtidos mostraram, também, que foi para o tempo de 24 horas que a proteína de soja apresentou efeito mais pronunciado em relação a hidrólise sem o aditivo.

A avaliação do efeito da fração solúvel da proteína de soja na hidrólise, além da associação da proteína com o Tween 80 apresentaram resultados promissores, mostrando que é possível reduzir a carga de proteína no processo e obter ganhos interessantes. No

entanto, estudos mais aprofundados se fazem necessário para melhor otimizar estas estratégias.

Além disso, os dados de hidrólise aliados aos obtidos pela análise dos espectros de FTIR, análise CHN e as medidas de atividade e estabilidade enzimática sugerem que a proteína, além de provavelmente estar interagindo com a lignina da biomassa, impedindo a adsorção improdutivo de celulasas, também atua no aumento da estabilidade enzimática. Testes preliminares indicaram que as interações entre a lignina e a proteína devem ser principalmente do tipo hidrofóbica.

A análise tecno-econômica realizada a partir da simulação da biorrefinaria de etanol 1G-2G, desenvolvida no simulador EMSO, sugere que aumentar a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica durante a hidrólise, além da redução da carga enzimática a ser utilizada no processo, são fatores fundamentais para que seja possível viabilizar economicamente a produção do etanol lignocelulósico, utilizando a proteína de soja como aditivo durante a hidrólise. Além disso, o custo associado a proteína de soja afeta de forma negativa a sua adição no processo, sendo fundamental a sua redução. Uma alternativa para se tentar reduzir o preço da proteína seria por meio da integração de biorrefinarias produtoras de etanol com as de biodiesel de soja, onde a proteína seria um subproduto do processo, disponível dentro da unidade. Ademais, verificou-se que trabalhar com cargas altas de proteína (12% m/m) afeta positivamente o processo, uma vez que esta é queimada nas caldeiras, gerando mais energia elétrica para a unidade industrial.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ◆ Avaliar o efeito da proteína de soja extraída em laboratório na etapa de hidrólise enzimática da biomassa, de modo a se aproveitar todas as frações proteicas existentes no grão de soja. As proteínas compradas comercialmente são processadas para diferentes aplicações. Essas etapas de processamento podem acarretar perdas de frações proteicas que poderiam ter resultados importantes na hidrólise. Desse modo, o processamento da proteína em laboratório poderia melhorar o desempenho desta na hidrólise;
- ◆ Realizar a hidrólise em batelada alimentada, otimizando os parâmetros do processo, como, por exemplo, estratégia de alimentação e velocidade de agitação;
- ◆ Otimizar a hidrólise da proteína de soja associada com o Tween e avaliar o efeito da tecno-econômico da adição do surfactante no contexto da biorrefinaria 1G-2G;
- ◆ Avaliar o efeito tecno-econômico da utilização da proteína de soja na hidrólise no contexto de uma biorrefinaria integrada de bioetanol-biodiesel;
- ◆ Melhor avaliar o efeito da proteína de soja na hidrólise, estudando seu efeito na viscosidade do meio reacional, consumo de potência do reator e na atividade e estabilidade das enzimas endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidase e das LPMO's.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akimkulova, A., Zhou, Y., Zhao, X., Liu, D., 2016. Improving the enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated wheat straw by metal ion blocking of non-productive cellulase adsorption on lignin. *Bioresour. Technol.* 208, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.059>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Ballesteros, M., 2012. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioalcohol Prod. Convers. Lignocellul. Biomass* 159–177. <https://doi.org/10.1533/9781845699611.2.159>
- Bhagia, S., Dhir, R., Kumar, R., Wyman, C.E., 2018. Deactivation of Cellulase at the Air-Liquid Interface Is the Main Cause of Incomplete Cellulose Conversion at Low Enzyme Loadings. *Sci. Rep.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19848-3>
- Börjesson, J., Engqvist, M., Sipos, B., Tjerneld, F., 2007a. Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.003>
- Börjesson, J., Peterson, R., Tjerneld, F., 2007b. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 754–762. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.06.006>
- Boussarsar, H., Rogé, B., Mathlouthi, M., 2009. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresour. Technol.* 100, 6537–6542. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.019>
- Brethauer, S., Studer, M.H., Yang, B., Wyman, C.E., 2011. The effect of bovine serum albumin on batch and continuous enzymatic cellulose hydrolysis mixed by stirring or shaking. *Bioresour. Technol.* 102, 6295–6298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.016>
- Brondi, M.G., Vasconcellos, V.M., Giordano, R.C., Farinas, C.S., 2019. Alternative Low-Cost Additives to Improve the Saccharification of Lignocellulosic Biomass 461–473.
- Cai, C., Qiu, X., Zeng, M., Lin, M., Lin, X., Lou, H., Zhan, X., Pang, Y., Huang, J., Xie, L., 2017. Using polyvinylpyrrolidone to enhance the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by reducing the cellulase non-productive adsorption on lignin. *Bioresour. Technol.* 227, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.002>
- Cannella, D., Hsieh, C.W.C., Felby, C., Jørgensen, H., 2012. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. *Biotechnol. Biofuels* 5, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-26>
- Chang, V.S., Holtzapple, M.T., 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84–86, 5–37. <https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:5>
- Chen, X., Ru, Y., Chen, F., Wang, X., Zhao, X., Ao, Q., 2013. FTIR spectroscopic characterization of soy proteins obtained through AOT reverse micelles. *Food Hydrocoll.* 31, 435–437. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.017>
- Cherubini, F., 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* 51, 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Clark, J.H., Deswarte, F.E.I., 2008. The Biorefinery Concept-An Integrated Approach. *Introd. to Chem. from Biomass* 1–20. <https://doi.org/10.1002/9780470697474.ch1>
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), 2016. Acompanhamento da safra brasileira - Cana-de-Açúcar 76.
- Corrales, R.C.N.R., Mendes, F.M., Perrone, C., Sant'Anna, C., de Souza, W., Abud, Y., Bon, E.P.D.S., Ferreira-Leitão, V., 2012. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO₂ and SO₂. *Biotechnol. Biofuels* 5, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-36>
- da Silva Martins, L.H., Rabelo, S.C., da Costa, A.C., 2015. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 191, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.024>
- Deak, N.A., Lusas, E.W., Rhee, K.C., 2008. 19 – Soy Protein Products, Processing, and Utilization, in: *Soybeans*. pp. 661–724. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-64-6.50022-6>
- Derringer, G., Suich, R., 1980. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J. Qual. Technol.* <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Dias, M.O.S., Junqueira, T.L., Cavalett, O., Pavanello, L.G., Cunha, M.P., Jesus, C.D.F., Maciel, R., Bonomi, A., 2013. Applied Energy Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Appl. Energy* 109, 72–78.

- <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.03.081>
- Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., 2017. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microb. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12726>
- Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F., 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 353–364. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00134-5)
- Fengel, D., Wegener, G., 1989. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions., *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.* <https://doi.org/10.1007/BF02608943>
- Fischer, M., 2006. Limiting factors for the enzymatic accessibility of soybean protein.
- FitzPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M.F., Whitney, R.A., 2010. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresour. Technol.* 101, 8915–8922. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.125>
- Florencio, C., Badino, A.C., Farinas, C.S., 2019. Addition of Soybean Protein Improves Saccharification and Ethanol Production from Hydrothermally Pretreated Sugarcane Bagasse.
- Florencio, C., Badino, A.C., Farinas, C.S., 2016. Soybean protein as a cost-effective lignin-blocking additive for the saccharification of sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 221, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.039>
- Furlan, F.F., 2016. METODOLOGIA PARA GUIAR O DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO INDUSTRIAL DE NOVAS TECNOLOGIAS UNINDO ENGENHARIA ECONÔMICA E ENGENHARIA DE (BIO)PROCESSOS E SISTEMAS: APLICAÇÃO À PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).
- Furlan, F.F., Costa, C.B.B., Secchi, A.R., Woodley, J.M., Giordano, R.C., 2016a. Retro-Techno-Economic Analysis: Using (Bio)Process Systems Engineering Tools to Attain Process Target Values. *Ind. Eng. Chem. Res.* 55, 9865–9872. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b01757>
- Furlan, F.F., Costa, C.B.B., Secchi, A.R., Woodley, J.M., Giordano, R.C., 2016b. Retro-Techno-Economic Analysis: Using (Bio)Process Systems Engineering Tools to Attain Process Target Values. *Ind. Eng. Chem. Res.* 55, 9865–9872. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b01757>
- Furlan, F.F., Filho, R.T., Pinto, F.H., Costa, C.B., Cruz, A.J., Giordano, R.L., Giordano, R.C., 2013. Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: Is it worth being flexible? *Biotechnol. Biofuels* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-142>
- Furlan, F.F., Giordano, R.C., Costa, C.B.B., Secchi, A.R., Woodley, J.M., 2015. Process Alternatives for Second Generation Ethanol Production from Sugarcane Bagasse, *Computer Aided Chemical Engineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63577-8.50070-X>
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Gouveia, E.R., Nascimento, R.T. do, Souto-Maior, A.M., Rocha, G.J. de M., 2009. Validation of Methodology for the Chemical Characterization of Sugar Cane Bagasse. *Quim. Nova* 32, 1500–1503. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600026>
- Guo, G.L., Hsu, D.C., Chen, W.H., Chen, W.H., Hwang, W.S., 2009. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.012>
- Harrington, E.C., 1965. Desirability Function. *Ind. Qual. Control.*
- Harris, P. V., Xu, F., Kreel, N.E., Kang, C., Fukuyama, S., 2014. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.015>
- Harrison, M.D., Zhang, Z., Shand, K., O'Hara, I.M., Doherty, W.O.S., Dale, J.L., 2013. Effect of pretreatment on saccharification of sugarcane bagasse by complex and simple enzyme mixtures. *Bioresour. Technol.* 148, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.099>
- Hodge, D.B., Karim, M.N., Schell, D.J., McMillan, J.D., 2009. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152, 88–107. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8217-0>
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V.G., 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biofuels* 5, 45. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-45>
- Hua, Y., Cui, S.W., Wang, Q., Mine, Y., Poysa, V., 2005. Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours. *Food Res. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.006>
- Joelsson, E., Erdei, B., Galbe, M., Wallberg, O., 2016. Techno-economic evaluation of integrated first- and second-generation ethanol production from grain and straw. *Biotechnol. Biofuels* 9, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0423-8>
- Johnson, E., 2016. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. *Biotechnol. Biofuels* 10, 164–174. <https://doi.org/10.1002/bbb.1634>

- Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Joshi, B., Raj, M., Dinita, B., Jarina, S., Rajani, J., 2011. Lignocellulosic ethanol production : Current practices and recent developments. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 6, 172–182.
- Junqueira, T.L., Chagas, M.F., Gouveia, V.L.R., Rezende, M.C.A.F., Watanabe, M.D.B., Jesus, C.D.F., Cavalett, O., Milanez, A.Y., Bonomi, A., 2017. Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0722-3>
- Kaar, W.E., Holtzapple, M.T., 1998. Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 419–427. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980820\)59:4<419::AID-BIT4>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980820)59:4<419::AID-BIT4>3.0.CO;2-J)
- Kim, Y., Kreke, T., Ko, J.K., Ladisch, M.R., 2015. Hydrolysis-determining substrate characteristics in liquid hot water pretreated hardwood. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 677–687. <https://doi.org/10.1002/bit.25465>
- Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B.A., Blanch, H.W., 2012. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1083–1087. <https://doi.org/10.1002/bit.24370>
- Ko, J.K., Kim, Y., Ximenes, E., Ladisch, M.R., 2015a. Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 252–262. <https://doi.org/10.1002/bit.25349>
- Ko, J.K., Um, Y., Park, Y.C., Seo, J.H., Kim, K.H., 2015b. Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4201–4212. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6595-0>
- Ko, J.K., Ximenes, E., Kim, Y., Ladisch, M.R., 2015c. Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 447–456. <https://doi.org/10.1002/bit.25359>
- Kristensen, J.B., Börjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., Jørgensen, H., 2007. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 888–895. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.014>
- Kristensen, J.B., Felby, C., Jørgensen, H., 2009. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels* 2, 11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-11>
- Kumar, L., Arantes, V., Chandra, R., Saddler, J., 2012. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresour. Technol.* 103, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.091>
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1544–1557. <https://doi.org/10.1002/bit.22203>
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2008. An improved method to directly estimate cellulase adsorption on biomass solids. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.12.005>
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 124, 1081–1099. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2_91
- Lee, J., 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56, 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00073-4)
- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2013. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol. Biofuels* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>
- Li, J., Li, S., Fan, C., Yan, Z., 2012. The mechanism of poly(ethylene glycol) 4000 effect on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 89, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.019>
- Longati, A.A., Lino, A.R.A., Giordano, R.C., Furlan, F.F., 2018. Defining research & development process targets through retro-techno- economic analysis : The sugarcane biorefinery case 263, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.102>
- Lou, H., Wang, M., Lai, H., Lin, X., Zhou, M., Yang, D., Qiu, X., 2013. Reducing non-productive adsorption of cellulase and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate. *Bioresour. Technol.* 146, 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.115>
- Lusas, E.W., Riaz, M.N., 1995. Soy protein products: processing and use. *J. Nutr.* 125, 573S–580S.
- Mandarino, J.M.G., Hirakuri, M.H., Roessing, A.C., 2015. Tecnologia para Produção de Óleo de Soja: Descrição das Etapas, Equipamentos, Produtos e Subprodutos. Embrapa Soja, Londrina, PR 100.

- <https://doi.org/ISSN 1516-781X>
- Méndez Arias, J., de Oliveira Moraes, A., Modesto, L.F.A., de Castro, A.M., Pereira, N., 2017a. Addition of Surfactants and Non-Hydrolytic Proteins and Their Influence on Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Bagasse. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181, 593–603. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2234-1>
- Méndez Arias, J., de Oliveira Moraes, A., Modesto, L.F.A., de Castro, A.M., Pereira, N., 2017b. Addition of Surfactants and Non-Hydrolytic Proteins and Their Influence on Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Bagasse. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181, 593–603. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2234-1>
- Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Modenbach, A.A., Nokes, S.E., 2013. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. *Biomass and Bioenergy* 56, 526–544. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.031> Review
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Mukasekuru, M.R., Hu, J., Zhao, X., Sun, S.F., Pascal, K., Ren, H., Zhang, J., 2018. Enhanced High-Solids Fed-Batch Enzymatic Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse with Accessory Enzymes and Additives at Low Cellulase Loading. *ACS Sustain. Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01972>
- Naik, S.N., Goud, V. V., Rout, P.K., Dalai, A.K., 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Paiva, E.J. de, 2008. Otimização De Processos De Manufatura Com Múltiplas Respostas Baseada Em Índices De Capacidade 118.
- Pauling, L., Corey, R.B., Branson, H.R., 1951. The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 37, 205–211. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.4.205>
- Pereira Ramos, L., 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova* 26, 863–871. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600015>
- Pereira, S.C., Maehara, L., Machado, C.M.M., Farinas, C.S., 2016. Physical-chemical-morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2G ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques. *Renew. Energy* 87, 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.10.054>
- Phitsuwan, P., Sakka, K., Ratanakhanokchai, K., 2013. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and Bioenergy.* <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.08.027>
- Pimenta, C.D., Messias Borges, S., Valério Antonio Pamplona, S., Ricardo Batista, P., Fabricio Maciel, G., 2014. Aplicação das metodologias Desirability e Simplex para otimização das propriedades mecânicas em arames de aço temperados. *Production* 598–610. <https://doi.org/10.1590/0103-6513.094812>
- Pino, M.S., Rodríguez-Jasso, R.M., Michelin, M., Flores-Gallegos, A.C., Morales-Rodríguez, R., Teixeira, J.A., Ruiz, H.A., 2018. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. *Chem. Eng. J.* <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.057>
- Rahikainen, J.L., Martin-Sampedro, R., Heikkinen, H., Rovio, S., Marjamaa, K., Tamminen, T., Rojas, O.J., Kruus, K., 2013. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. *Bioresour. Technol.* 133, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.075>
- Richardson, J.S., 1981. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34, 167–339. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60520-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60520-3)
- Rocha-Martín, J., Martínez-Bernal, C., Pérez-Cobas, Y., Reyes-Sosa, F.M., García, B.D., 2017. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 244, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.132>
- Rodríguez-Zúñiga, U.F., Neto, V.B., Couri, S., Crestana, S., Farinas, C.S., 2014. Use of spectroscopic and imaging techniques to evaluate pretreated sugarcane bagasse as a substrate for cellulase production under solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 2348–2362. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0678-0>

- Saini, J.K., Patel, A.K., Adsul, M., Singhanian, R.R., 2016. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. *Renew. Energy* 98, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.089>
- Santos, F.A., 2013. Avaliação Do Pré-Tratamento Hidrotérmico De Palhas De Cana-De-Açúcar Para Produção De Etanol de Segunda Geração. Universidade Federal de Viçosa.
- Santos, F.A., Queiroz, J.H. De, Colodette, J.L., Manfredi, M., Queiroz, M.E.L.R., Celso, S., Soares, F.E.F., 2014. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana de açúcar visando à produção de etanol celulósico. *Quim. Nova* 37, 56–62.
- Silva, C.O.G., Vaz, R.P., Filho, E.X.F., 2018. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*. <https://doi.org/10.1002/bbb.1832>
- Sinha-Ray, S., Zhang, Y., Yarin, A.L., Davis, S.C., Pourdeyhimi, B., 2012. Solution blowing of soy protein fibers, in: ACS Symposium Series. <https://doi.org/10.1021/bk-2012-1105.ch020>
- Sipos, B., Dienes, D., Schleicher, Á., Perazzini, R., Crestini, C., Siika-aho, M., Réczey, K., 2010. Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol). *Enzyme Microb. Technol.* 47, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.05.010>
- Soares, R.P., Secchi, a R., 2003. {EMSO}: {A} new environment for modelling, simulation and optimization. *Comp. Aid. Chem. Eng.* 14, 947–952. [https://doi.org/10.1016/S1570-7946\(03\)80239-0](https://doi.org/10.1016/S1570-7946(03)80239-0)
- Souza, S.P., Seabra, J.E.A., 2013. Environmental benefits of the integrated production of ethanol and biodiesel. *Appl. Energy* 102, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.09.016>
- Squinca, P., 2017. Produção de endoglucanases por *Aspergillus niger* utilizando biomassa liquefeita. Universidade Federal de São Carlos.
- Sun, F.F., Hong, J., Hu, J., Saddler, J.N., Fang, X., Zhang, Z., Shen, S., 2015a. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.020>
- Sun, F.F., Hong, J., Hu, J., Saddler, J.N., Fang, X., Zhang, Z., Shen, S., 2015b. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 79–80, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.020>
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review, *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Valdivia, M., Galan, J.L., Laffarga, J., Ramos, J.L., 2016. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. *Microb. Biotechnol.* 9, 585–594. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12387>
- Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- Vasconcellos, V.M., Tardioli, P.W., Giordano, R.L.C., Farinas, C.S., 2016. Addition of metal ions to a (hemi)cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *N. Biotechnol.* 33, 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.12.002>
- Wang, H., Kobayashi, S., Hiraide, H., Cui, Z., Mochidzuki, K., 2015. The effect of nonenzymatic protein on lignocellulose enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 287–299. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1242-2>
- Wang, Z., Li, Y., Jiang, L., Qi, B., Zhou, L., 2014. Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate subjected to heat treatment. *J. Chem.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/475389>
- Wei, W., Wu, S., 2017. Enhanced enzymatic hydrolysis of eucalyptus by synergy of zinc chloride hydrate pretreatment and bovine serum albumin. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.133>
- Wyman, C.E., 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.* 50, 3–15. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90214-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90214-3)
- Xin, D., Yang, M., Chen, X., Zhang, Y., Ma, L., Zhang, J., 2017. Improving the Hydrolytic Action of Cellulases by Tween 80: Offsetting the Lost Activity of Cellobiohydrolase Cel7A. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 11339–11345. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02361>
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., Wang, D., 2013. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Appl. Energy* 104, 801–809.

- <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.019>
- Yang, B., Wyman, C.E., 2006. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 611–617. <https://doi.org/10.1002/bit.20750>
- Yu, Q., Zhuang, X., Lv, S., He, M., Zhang, Y., Yuan, Z., Qi, W., Wang, Q., Wang, W., Tan, X., 2013. Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.099>
- Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., Faruq, G., 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 66, 751–774. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zampiere, D., 2011. Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum*. Universidade de Caxias do Sul.
- Zhang, H., Fan, M., Li, X., Zhang, A., Xie, J., 2018. Enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by ferric chloride catalyzed organosolv pretreatment and Tween 80. *Bioresour. Technol.* 258, 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.004>
- Zhang, Y., Liu, Y.Y., Xu, J.L., Yuan, Z.H., Qi, W., Zhuang, X.S., He, M.C., 2012. High solid and low enzyme loading based saccharification of agricultural biomass. *BioResources.* <https://doi.org/10.15376/biores.7.1.0345-0353>
- Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., Wang, D., Jenkins, B., 2008. Non-ionic surfactants and non-catalytic protein treatment on enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 146, 231–248. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8035-9>
- Zhu, L., O'Dwyer, J.P., Chang, V.S., Granda, C.B., Holtzapple, M.T., 2008. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresour. Technol.* 99, 3817–3828. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.033>