Produção de etanol de segunda geração através do bioprocessamento consolidado utilizando cana-de-açúcar integral como substrato

Palavras-Chave: etanol, bioprocessamento, fermentação

Autores(as):

João Pedro Borsoni Vasconcelos, FEQ – UNICAMP

Isabela Uematsu Zambello, FEQ – UNICAMP (Coorientadora)

Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano, FEQ – UNICAMP (Orientador)

INTRODUÇÃO:

Durante anos, o estudo e a implementação de biocombustíveis de segunda geração (2G) tem focado em um processo que envolve, inicialmente, um pré-tratamento termoquímico, seguido da hidrólise enzimática e por fim a fermentação dos açúcares em etanol por leveduras. Sendo esse processo caro e operacionalmente desafiador (Lynd et al., 2017; Slupska et al., 2019). Uma estratégia promissora para a superar esse impedimento envolve a produção de enzimas celulolíticas, hidrólise de biomassa e fermentação dos açúcares restantes em produtos desejados, tudo em uma única etapa do processo por meio de um microrganismo celulolítico. Esta estratégia é conhecida como CBP "consolidated bioprocessing" (Lynd et al., 2002).

A estratégia de bioprocessamento consolidado conta com ação de uma cocultura de bactérias, sendo elas a *Clostridium thermocellum* e *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. A primeira é uma bactéria anaeróbica e termofílica que produz enzimas enquanto fermenta simultaneamente os açucares provenientes da celulose e hemicelulose em etanol e outros produtos (Lynd et al., 2022; Paye et al., 2016; Holwerda et al., 2019; Kubis et al., 2022). Já a segunda, também é uma bactéria anaeróbica e termofílica, com capacidade de fermentar os açúcares solúveis (Beri et al., 2021). Para diferentes condições, a abordagem proposta pelo CBP se mostrou com rendimentos de solubilização da biomassa lignocelulósica maiores em comparação com o uso de celulase fúngica comercial (Zambello et al., 2024).

A bactéria *Clostridium thermocellum* é incapaz de fermentar pentoses, o que leva a um acúmulo de produtos solúveis da hidrólise de hemicelulose, que podem inibir a atividade de suas celulases. Por esse motivo, propõem-se inserir a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, que é um microrganismo fermentador de pentoses, para atuar conjuntamente, formando assim uma cocultura de bactérias (Beri et al., 2021).

Seguindo a mesma ideia, outras bactérias, com a capacidade de fermentar os açúcares que advém da hemicelulose, também se mostraram aptas a atuar nas condições de operação desejadas, como: *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* e *Herbinix hemicellulosylitica* (Beri et al., 2020). Tais bactérias foram implementadas tanto de forma a complementar a cocultura (formando uma tricultura), quanto substituindo a *T. thermosaccharolyticum*, formando novas coculturas.

Vale destacar que a viabilidade econômica da estratégia em estudo é considerada aceitável quando se utiliza altas quantidades de sólidos (biomassa), por exemplo, ≥ 15% em peso de sólidos (Zambello et al., 2024). Porém, o uso de altas concentrações de sólidos apresenta desafios operacionais, como a baixa atividade da água, dificuldades da homogeneização do meio e acúmulo de lignocelulose ao longo da fermentação.

Nesse contexto, este projeto de iniciação científica buscou avaliar a eficiência do CBP através do uso da cocultura padrão, formada pelas culturas de *C. thermocellum* e *T. thermoanaerobacterium*, e avaliar o impacto de variações no modelo

do CBP, como, alterações nas configurações dos equipamentos utilizados e implementação de novos microrganismos para atuarem de forma conjunta na fermentação.

METODOLOGIA:

1. Bactérias e condições de crescimento

C. thermocellum foi cultivado em MTC conforme descrito em Holwerda et al., 2012. O *T. thermosaccharolyticum* e o *T. saccharolyticum* foram cultivados em meio CTFüD contendo (g/L): citrato de sódio tribásico di-hidratado 3, sulfato de amônio 1.3, fosfato monobásico de potássio 1.5, cloreto de cálcio di-hidratado 0.13, xilose 5, extrato de levedura 4.5, cloreto de magnésio hexahidratado 2.6, sulfato ferroso heptahidratado 0.0011, L-cisteína-HCl 0.5, e sal sódico de MOPS 11.56. O *Herbinix hemicellulosylitica* foi preparado usando 50% (v/v) de CTFüD modificado com 1 g/L de xilose ao invés de celobiose e 50% (v/v) de meio de fermentação gasto.

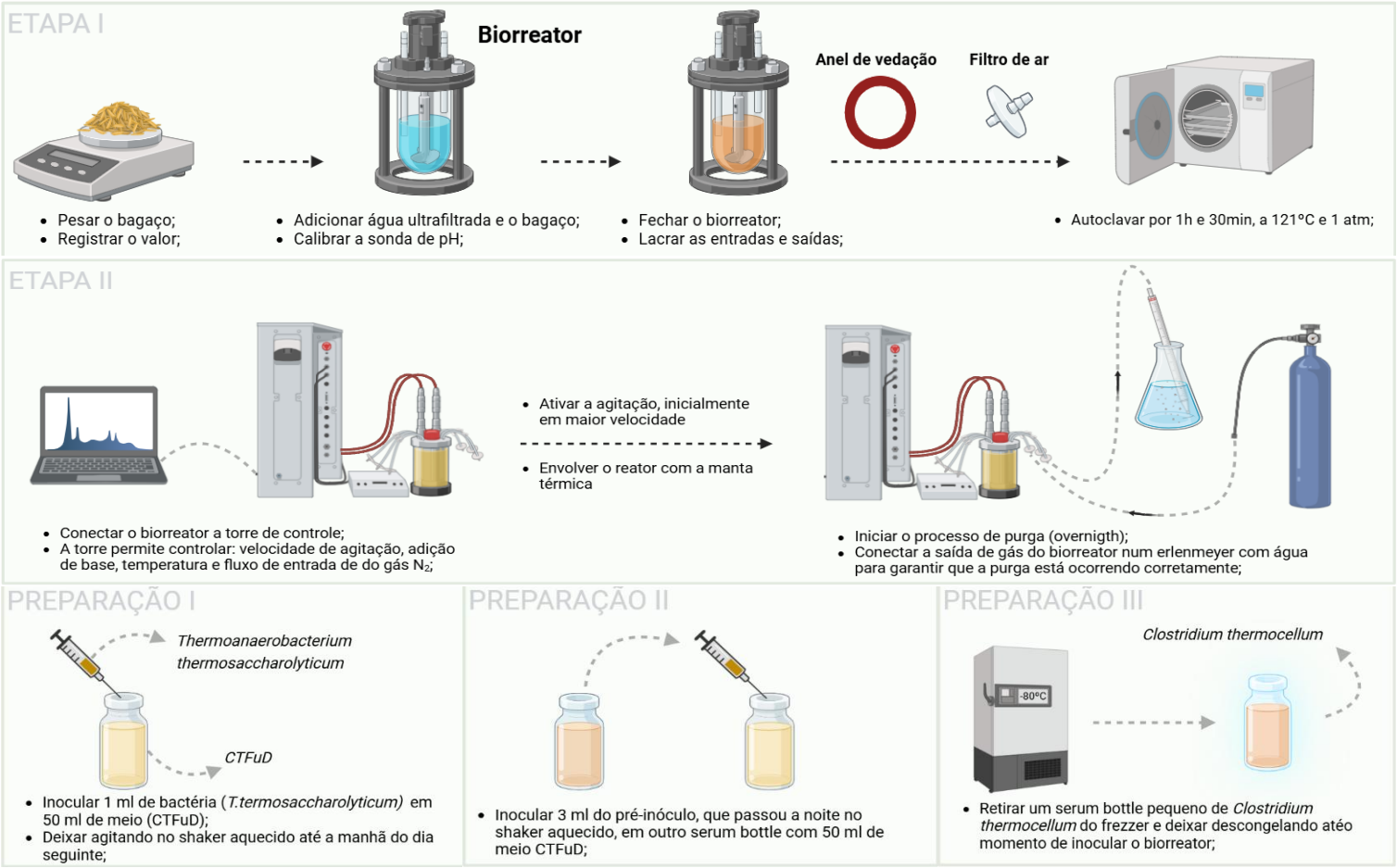
As cepas foram cultivadas a 55 °C e em condições anaeróbias purgando frascos selados contendo o meio com 20 ciclos alternados de vácuo e nitrogênio de 45 segundos cada.

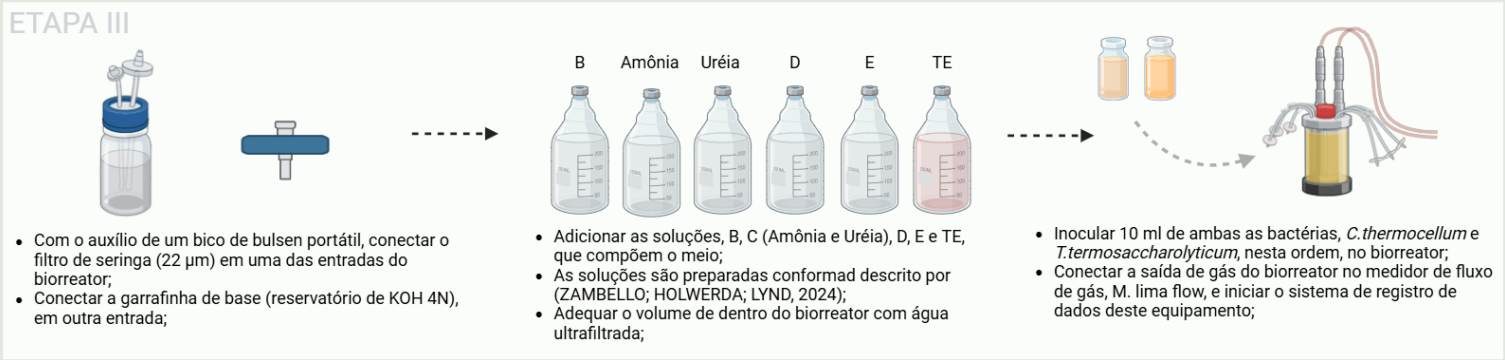
2. Processamento da matéria prima

O bagaço foi doado pela Usina IRB, São Pedro – SP. O material foi coletado em 16 de junho de 2022. Este foi secos em temperatura ambiente e local coberto e posteriormente moídos até tamanho de partícula final de 0,5 mm em moinho Retsch (Haan, Germany).

3. Fermentações em biorreatores

As fermentações foram realizadas em biorreatores de bancada de 500ml da marca Applikon. O esquema a seguir, de autoria própria, detalha todas as etapas empregadas para realizar a fermentação em biorreatores.





Feito todas essas etapas, a fermentação ocorre ao longo de 10 dias.

Também foram feitas fermentações em pequenos volumes, em serum bottles de 125 ml. Neste caso, o procedimento utilizado é semelhante ao descrito nas etapas anteriores, onde as principais diferenças são que não há o monitoramento do pH e temperatura. O frasco, após ser inoculado, é deixado sob agitação e temperatura constantes dentro de um shaker (Thermo), por 7 dias, à temperatura de 55º e 250 rpm.

1. **Diferentes conformações dos impelidores**

Foram utilizados dois tipos de impelidores, hélice e turbinas de pás retas verticais, apresentados na Figura 1. A descrição de cada conjunto de impelidores usadas nas diferentes configurações estão apresentadas na Tabela 1.

Configuração	Tipo de impelidor	Tamanho	Quantidade
1	PRV	Único	1
	Hélice	Média	2
2	PRV	Único	2
	Hélice	Média	1
3	PRV	Único	1
	Hélice	Média	1
	Hélice	Grande	1
4	PRV	Único	2
	Hélice	Grande	1

Tabela 1 *- Descrição de cada configuração de impelidores usados no teste descrito na Figura 4.*

Figura 1 *– Foto das variações de impelidores usados. O primeiro é um impelidor de hélice grande. O segundo é um impelidor de hélice médio. O terceiro é um impelidor de pás retas, de tamanho único.*

4. **Métodos analíticos**

Os ensaios analíticos realizados são de três protocolos diferentes. A análise da parte sólida, "quantitative saccharification" (QS), é feita para medir o quanto do substrato adicionado foi solubilizado em açúcares solúveis, sendo avaliado em fração de carboidratos solubilizados, baseados na massa inicial e final. A análise da parte líquida, "liquid quantitative saccharification" (LQS), é feita para medir o quanto do açúcar solúvel disponível não foi consumido, sendo avaliado como carboidratos solubilizados residuais (g/L). Com a parte líquida também é feita a medição da quantidade de cada produto gerado da após a fermentação, em (g/L). Cada tipo de análise segue um protocolo de preparação de acordo com Zambello et al (2024), onde todas as amostras foram analisadas no HPLC (Shimadzu).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A rodada com o *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* foi realizada em um serum bottle, utilizando bagaço de cana-de-açúcar moído como substrato. Nestas condições, de acordo com a Figura 2, observa-se que a cocultura em teste, C. therm + T. sacch (aprox. 35% de FCS), possui uma capacidade de solubilização do substrato inferior em comparação com a cocultura padrão, C. therm + T. therm (> 40% de FCS). Referente ao consumo dos açúcares solubilizados, a cocultura padrão também apresentou um maior consumo, restando apenas 0,20 g/L carboidratos solúveis residuais. Quanto a formação de produtos, não se observou uma diferença significativa.

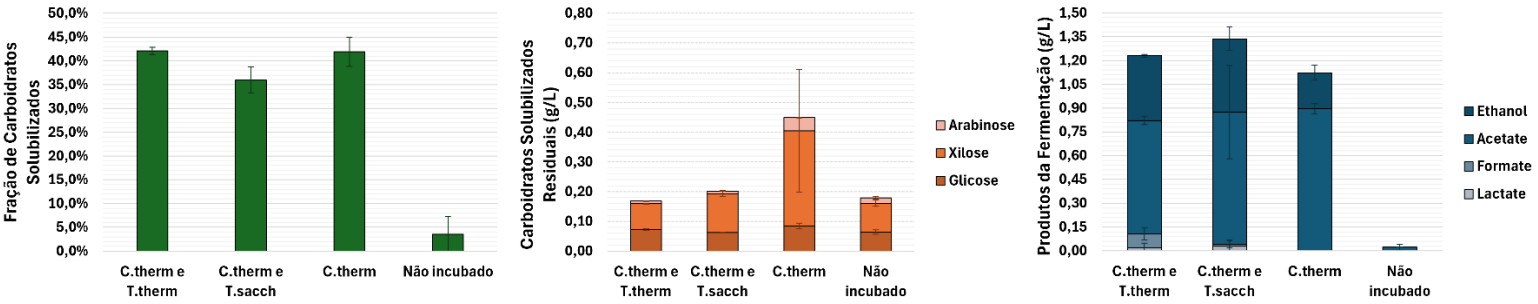


Figura 2 *– Dados analíticos do teste de fermentação com a bactéria Thermoanaerobacterium saccharolyticum.* Nos gráficos, têm-se a seguinte abreviação: "C. therm" - *Clostridium thermocellum;* "T. therm" - *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum;* "T. sacch" - *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*.

A rodada com o *Herbinix hemicellulosylitica* foi realizada nos biorreatores, utilizando bagaço de cana-de-açúcar moído como substrato. Neste cenário, baseado na Figura 3, observou-se que a implementação da bactéria *Herbinix*, tanto como substituta da *T. therm*, quanto em conjunto com as demais presentes na cocultura padrão, não resultou em nenhuma alteração significativa nos quesitos analisados.

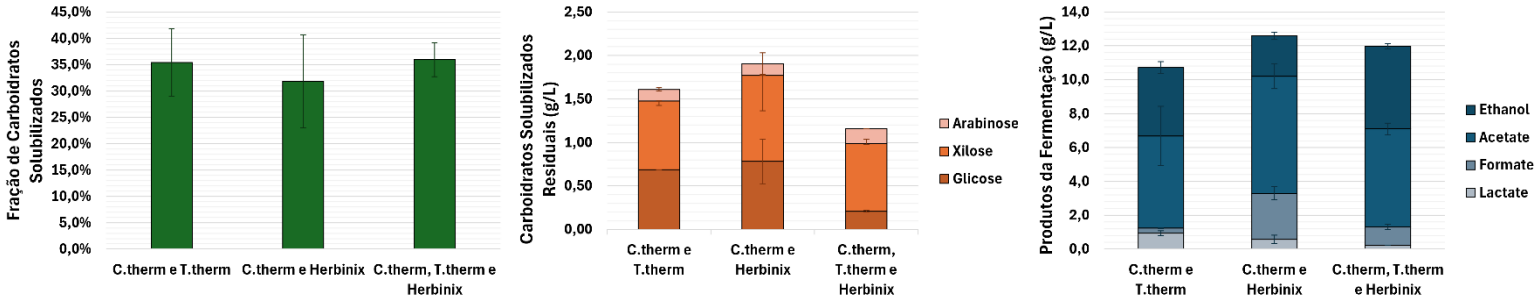


Figura 3 *- Dados analíticos do teste de fermentação com a bactéria Herbinix hemicellulosylitica.* Nos gráficos, têm-se a seguinte abreviação: "C. therm" - *Clostridium thermocellum;* "T. therm" - *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum;* "Herbinix - *Herbinix hemicellulosylitica*.

Ao longo do acompanhamento das fermentações da pesquisa, percebeu-se que, para fermentações com grandes cargas de sólidos (bagaço de cana-de-açúcar moído), a homogeneização do meio era pouco efetiva. Isto é, grande parte do bagaço ficava depositado, e praticamente estático, nas paredes dos biorreatores. Sendo assim, foi proposto adicionar mais um impelidor no eixo de rotação de cada biorreator. Visualmente foi possível notar que houve de fato uma melhora na homogeneização do meio. Porém, ao se comparara as porcentagens solubilização do bagaço (QS), apresentados na Figura 4, com a mesma cocultura utilizada, na Figura 3, observa-se que a adição de um impelidor resultou em uma redução significativa. Este comportamento se deve, possivelmente, ao aumento do cisalhamento das bactérias, devido ao aumento da área total das pás dos impelidores.

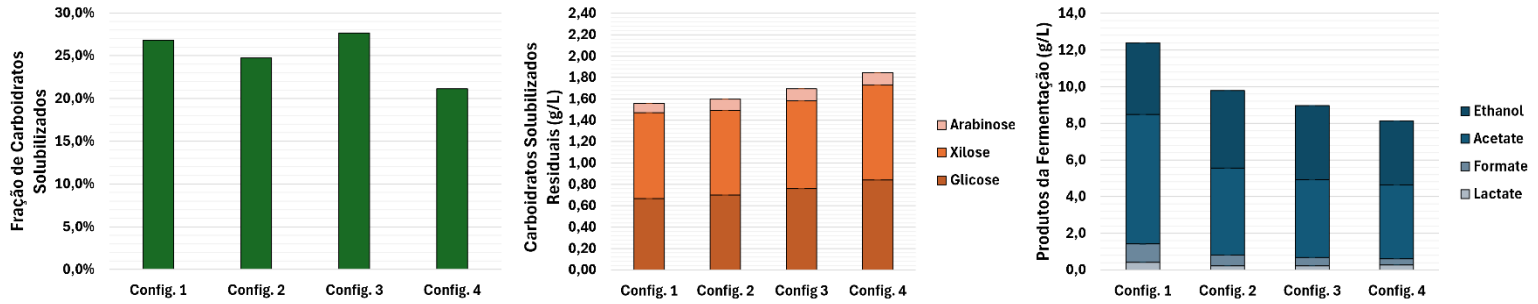


Figura 4 *- Dados analíticos do teste de fermentação em 4 diferentes configurações dos impelidores utilizados na agitação interna do biorreator. A cocultura utilizada neste teste era composta de Clostridium thermocellum e Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum.*

CONCLUSÕES:

A partir das rodadas de fermentação feitas, conclui-se que a abordagem de produção de etanol de segunda geração por meio de um bioprocessamento consolidado utilizando as coculturas de bactérias, *Clostridium thermocellum* e *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, foi avaliada com sucesso. De fato, o uso *da T. thermosaccharolyticum* em conjunto com a *C. thermocellum*, se mostrou mais apta a solubilização do bagaço, em comparação com as duas outras

bactérias, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* e *Herbinix hemicellulosylitica*. Além disso, a alteração da configuração padrão do CBP não foi capaz de promover uma melhora no desempenho da fermentação. Sendo assim, a cocultura padrão se mostrou ser a melhor opção para o método de CBP, e uma potencial alternativa para a produção de etanol de segunda geração.

BIBLIOGRAFIA:

Lynd, R. L. **The grand challenge of cellulosic biofuels**. Nature Biotechnology, 35, 10, 2017.

Lynd, R. L. **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology**, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002.

Lynd, R. L. et al**. Toward low-cost biological and hybrid biological/ catalytic conversion of cellulosic biomass to fuels. Energy Environ**. Sci., 15, 938, 2022.

Beri, D. et al**. Coculture with hemicellulose-fermenting microbes reverses inhibition of corn fiber solubilization by Clostridium thermocellum at elevated solids loadings. Biotechnology for Biofuels**, 14, n. 24, 2021.

Zambello I. et al. **Characterization of sugarcane bagasse solubilization and utilization by thermophilic cellulolytic and saccharolytic bacteria at increasing solid loadings.** Bioresource Technology, 2024.

Beri D. et al. **Development of a thermophilic coculture for corn fiber conversion to etanol**, Nature Communications, 2020.

Holwerda E.K., et al. **A defined growth medium with very low background carbon for culturing Clostridium thermocellum**. J Ind Microbiol Biot., 39 (6): 943–7, 2012.