

PRODUÇÃO DE ETANOL 2G POR BIOPROCESSAMENTO CONSOLIDADO DE BAGAÇO DE CANA DE AÇUCAR COM CONSÓRCIO MICROBIANO

Márcio Daniel Nicodemos Ramos¹, Paulo Sérgio Santos Júnior¹;
Isadora Aparecida Campioni Pupin², Bruna Trindade de Carvalho³,
Johan Thevelein³, Thais Suzane Milessi^{1,2}.

¹Universidade Federal de São Carlos/Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Rod. Washington Luís, s/n, Monjolinho - 13565-905 - São Carlos-SP, Brasil,

marcio_daniel_ramos@hotmail.com, paulo.santos@estudante.ufscar.br, thais.milessi@ufscar.br

²Universidade Federal de São Carlos/Departamento de Engenharia Química, Rod. Washington Luís, s/n, Monjolinho - 13565-905 - São Carlos-SP, Brasil, isadoraacp@estudante.ufscar.br,

³NovelYeast bv/Open Bio-Incubator, Gaston Geenslaan, 3001, Heverlee, Leuven, Bélgica, bruna.carvalho@novelyeast.com, johan.thevelein@novelyeast.com

Resumo

O Bioprocessamento Consolidado (BPC) de etanol 2G é promissor na biorrefinaria, pois se baseia na produção de biocatalisadores, hidrólise enzimática e consumo de pentoses e hexoses em um mesmo reator. Para isso, busca-se um microrganismo ou um consórcio que consumam, eficientemente, os açúcares do material lignocelulósico pré-tratado e que são tolerantes a inibidores e a etanol. Para estudar um consórcio microbiano de leveduras recombinantes de alto desempenho, foram realizados BPC de bagaço de cana pré-tratados hidrotérmicamente em mini-reatores de 5 mL ($DO_0 = 100$; 12 h; 35°C; 150 rpm). Foram utilizadas duas cepas de *S. cerevisiae* (isoladas e em consórcio) que produzem 7 enzimas hidrolíticas (endoglucanase, celobiohidrolase I e II, β -glicosidase, xilanase, β -xilosidase e acetil-xilano esterase) denominadas AC14 e Cellusec 3. Notou-se que a cepa AC14 foi mais eficiente do que a Cellusec 3 e estatisticamente semelhante ao consórcio, tendo produzido 12.69 g/L. Esta cepa se mostrou mais robusta com maior viabilidade celular (98%) e produziu mais xilanases (2.2 UI/mL). Assim, a AC14 é mais interessante para o BPC de bagaço de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Biorrefinaria. Etanol 2G. Bioprocessamento consolidado. Consórcio microbiano.

Área do Conhecimento: Engenharias. Engenharia Química.

Introdução

A biorrefinaria utiliza a biomassa integralmente por meio de uma ampla gama de tecnologias para a produção sustentável de bioprodutos, incluindo os biocombustíveis. É considerada uma estratégia importante para a transição da matriz energética global de processos fósseis para sustentáveis (SINGH et al., 2022). Por outro lado, desenvolvimentos tecnológicos ainda são necessários para que estas tecnologias de segunda geração (2G) se tornem viáveis em larga escala. Considerando a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, o alto custo dos coquetéis enzimáticos necessários para liberar os açúcares fermentescíveis ainda é um dos principais gargalos do processamento da biomassa (RAMOS et al., 2022).

O Bioprocessamento Consolidado (BPC) de material lignocelulósico é uma tecnologia promissora, pois consiste na produção de enzimas, hidrólise de biomassa e fermentação dos açúcares no mesmo biorreator. Neste processo, é utilizado um microrganismo ou um consórcio de microrganismos que sejam capazes de produzir enzimas hidrolíticas e fermentar hexoses e pentoses, além de serem tolerantes a inibidores dos hidrolisados da biomassa e a etanol (PERIYASAMY et al., 2023). Diante dessa necessidade, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* AC14 foi desenvolvida por Claes et al. (2020) e se destaca por consumir xilose e secretar sete enzimas hidrolíticas, alcançando resultados promissores (PEREZ et al., 2023; RAMOS et al., 2023). Paralelamente, a levedura Cellusec 3 é outra cepa recombinante desenvolvida pelo mesmo grupo de pesquisa, tendo sido desenvolvida a partir da AC14 que produz as mesmas enzimas, mas modificada para super expressar celulasas e ter maior resistência à inibidores. Porém, a adição de modificações genéticas a uma cepa pode afetar suas

características intrínsecas. De acordo com Pupin et al. (2024), a Cellusec 3 é superior na produção de celulases, enquanto a AC14 produz hemicelulases de forma mais eficiente.

Diante do exposto, considerando a necessidade de se utilizar microrganismos de alta eficiência em BPC e a necessidade de se utilizar a biomassa como um todo, ou seja, tanto a fração celulósica quanto a fração hemicelulósica, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a performance das leveduras AC14 e Cellusec 3, assim como o consórcio delas, durante o BPC do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente.

Metodologia

Microrganismo e inóculo: Foram utilizadas duas cepas de *S. cerevisiae*: AC14 e Cellusec 3. Ambas são leveduras industriais tolerantes à inibidores que são capazes de fermentar xilose e que podem secretar endoglucanase, celobiohidrolase I e II, β -glicosidase, xilanase, β -xilosidase e acetil-xilano esterase (CLAES et al., 2020). O preparo do inóculo seguiu a metodologia de Ramos et al. (2023), onde uma alçada da cultura estoque foi espalhada em meio ágar sólido YP-BPC (peptona 20 g/L, extrato de levedura 10 g/L, ágar 15 g/L, glicose 20 g/L, xilose 20 g/L, xilana de sabugo de milho 10 g/L, celobiose 10 g/L e carboximetilcelulos 5 g/L) e incubados a 30°C por 48 h. Uma única colônia da placa foi ressuspensa em 75 μ L de água destilada estéril e espalhada com uma alça de Drigalski em uma nova placa de meio sólido YPDX-ágar (20 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedura, 15 g/L de ágar, 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose) e incubados a 30°C por 24 h. O “tapete celular” formado na placa de Petri foi completamente ressuspensa e inoculado em 300 mL de meio YPDX (YPDX-ágar sem ágar) em frascos Erlenmeyer de 1 L e incubado por 12 horas a 30 °C e 150 rpm. As células de levedura em fase de crescimento exponencial foram recuperadas por centrifugação (2500 rpm por 10 min a 4°C) e imediatamente utilizadas nos ensaios fermentativos.

Ensaio de BPC: Os experimentos de BPC foram realizados em minirreatores de 5 mL equipados com saída de CO₂, conforme descrito Mesquita et al. (2021). O processo foi monitorado medindo a massa de CO₂ produzida durante a fermentação. Os experimentos foram encerrados quando a estabilização da massa foi alcançada, indicando o fim da fermentação. Os microrganismos individualmente ou em consórcio microbiano (DO₀ final = 100; razão 1:1 de cada cepa nos consórcios) foram adicionados juntamente com as frações líquida (pH 5,5) e sólida (1% m/v) do bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente obtido em condições previamente definidas por Perez et al. (2023). Após o término de cada experimento, o meio fermentado foi centrifugado, e o sobrenadante coletado para quantificar atividade enzimática, substratos e produtos.

Métodos analíticos: As atividades enzimáticas das celulases totais, xilanase, β -glicosidase e β -xilosidase foram realizadas conforme descritos por Ramos et al. (2023) pela hidrólise de papel filtro Whatmam No. 1, xilana de madeira de bétula, celobiose e 4-nitrofenil β -D-glucopiranosídeo (p-NPX), respectivamente, a 50°C. Para o cálculo das atividades utilizou-se a Equação 1.

$$\text{Atividade enzimática (UI/mL)} = \frac{\left(\frac{\Delta P}{\Delta t}\right) \times V_R \times D}{MM \times V_E} \quad (1)$$

Onde: $\Delta P/\Delta t$ – Coeficiente angular da reta do produto versus tempo de reação (mg.mL⁻¹.min⁻¹); V_R – Volume reacional (mL); V_E – Volume da solução/suspensão enzimática (mL); MM – Massa molar do produto (mg. μ mol⁻¹); D – Diluição do extrato enzimático.

A concentração de células livres (Cx) foi determinada por turbidimetria e a viabilidade da levedura foi quantificada pelo azul de metileno (SANDRI et al., 2023). As concentrações de etanol, glicerol, xilitol, xilose e glicose foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme Sandri et al. (2023).

Cálculos: Os parâmetros fermentativos (produtividade de etanol - Q_P; conversão de substrato - X e rendimento de etanol - Y,%) foram calculados conforme Equações 2 e 3 (RAMOS et al. 2023). O teste de Tukey (nível de confiança de 95%) foi realizado no software Origin®Pro 8.5 para avaliar a significância diferenças entre os resultados.

$$Y = \frac{\text{Concentração de etanol produzido}}{\text{Concentração de etanol máximo teórico}} \times 100 \quad (2)$$

$$Q_P = \frac{C_{Pf} - C_{Pi}}{\Delta t_f} \quad (3)$$

Onde: C_{Pf} - Concentração de produto formado no tempo t ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); C_{Pi} - Concentração de produto no início do processo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); Δt_f - Tempo de processo (h). Para o cálculo do $Y_{P/S}$, os valores de concentração de etanol máximo teórico foram estimados por fatores estequiométricos de etanol para mono, di e polissacarídeos (0,511; 0,538 e 0,57 g/g, respectivamente) (BARROS-RIOS et al., 2015).

Resultados

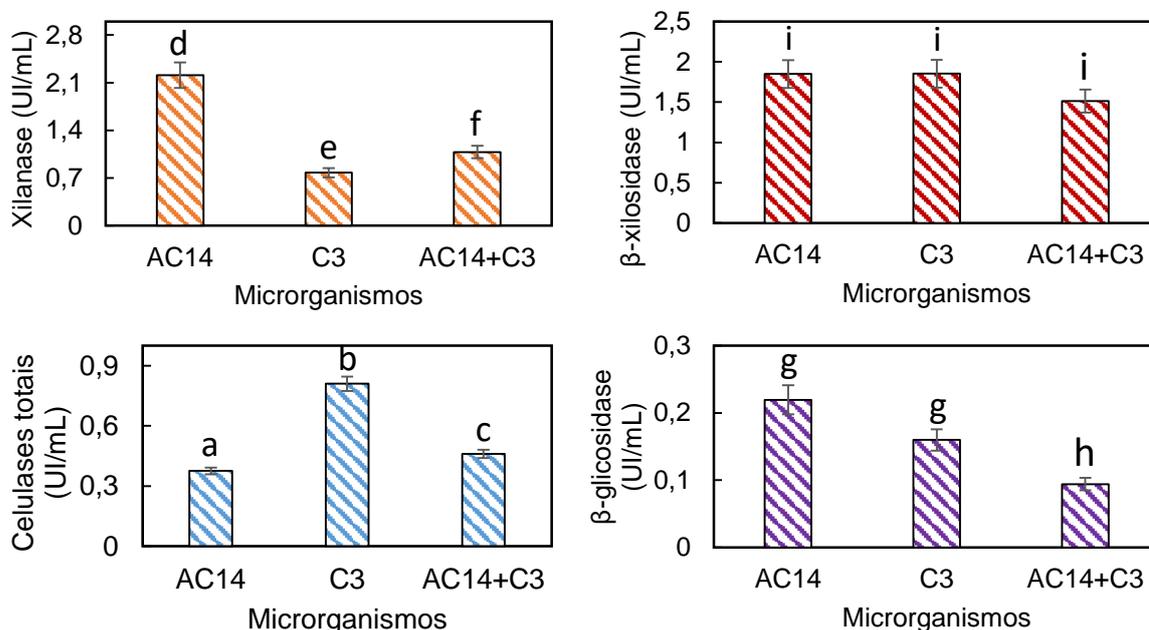
Foram conduzidos três ensaios fermentativos de BPC com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente. Os microrganismos utilizados em cada ensaio variaram, sendo: AC14, Cellusec 3 ou o consórcio de ambos. Na Tabela 1, são apresentadas a concentração de etanol gerado nos três sistemas, além do rendimento, produtividade e a viabilidade celular final. Para avaliar os diferentes sistemas, foram também quantificadas as atividades enzimáticas que são apresentadas na Figura 1.

Tabela 1 – Parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC usando diferentes microrganismos (AC14, Cellusec 3 ou consórcio). DO_0 100, 35 °C e pH 5,5, 150 rpm. O teste de Tukey foi realizado separadamente para cada parâmetro (dados da mesma coluna) e diferentes índices de letras significam que os valores são significativamente diferentes (95% de confiança).

Microrganismos	Etanol produzido (g/L)	Y (%)	Q_P (g/L/h)	Viabilidade celular final
AC14	12.69 ± 0.52 ^a	95.18 ± 3.17 ^c	1.06 ± 0.05 ^e	98.15 ± 1.40 ^g
Cellusec 3	9.83 ± 0.40 ^b	73.73 ± 2.46 ^d	0.82 ± 0.04 ^f	91.89 ± 1.31 ^h
AC14+Cellusec 3	13.14 ± 0.53 ^a	98.56 ± 3.28 ^c	1.10 ± 0.05 ^e	92.86 ± 1.32 ^h

Fonte: os autores.

Figura 1 - Atividades enzimáticas finais dos ensaios de BPC usando diferentes microrganismos (AC14, Cellusec 3 ou consórcio). DO_0 100, 35 °C e pH 5,5, 150 rpm. O teste de Tukey foi realizado separadamente para cada parâmetro e diferentes de letras significam que os valores são significativamente diferentes (95% de confiança). C3: Cellusec 3.



Fonte: os autores.

Ao analisar a produção de etanol 2G nos três sistemas (Tabela 1), nota-se que a concentração obtida no BPC com AC14 (12.7 g/L) foi maior que do ensaio com apenas Cellusec 3 e estatisticamente igual a concentração obtida pelo consórcio. Diante desses dados, percebeu-se que as três conformações são aplicáveis ao BPC, mas que a AC14 foi a mais interessante nas condições estudadas. Conseqüentemente, o mesmo comportamento é observado para os demais parâmetros avaliados, rendimento e produtividade. Já a viabilidade celular se manteve satisfatoriamente superior a 90% em todas as condições estudadas.

As atividades enzimáticas finais de cada BPC são dados importantes para comparar os sistemas fermentativos. Ao analisar os valores obtidos (Figura 1), de forma geral, também notou-se uma superioridade da levedura AC14 na produção de enzimas, exceto na produção de celulases totais uma vez que a Cellusec 3 foi modificada para produzir esta enzima mais eficientemente.

Discussão

Dentre as três conformações de BPC estudadas, o processo utilizando apenas a cepa AC14 foi o mais interessante. Os dados obtidos com a cepa AC14 corroboram com os dados obtidos por Perez et al. (2023) que reportaram 13.0 g/L de etanol a partir do BPC de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotêrmicamente. Paralelamente, até onde vai nosso conhecimento, não existe trabalho relatado na literatura que aplicou a Cellusec 3 em BPC, principalmente de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotêrmicamente, de forma que tal processo pode ser melhor estudado em trabalhos futuros. Alguns trabalhos já estudaram consórcios microbianos para BPC. Chen et al. (2018), por exemplo, estudaram um sistema composto por duas linhagens de levedura projetadas: Y5/XynII-XylA (co-expressando dois tipos de xilanases) e Y5/EG-CBH-BGL (co-expressando três tipos de celulases). O BPC foi com palha de milho pré-tratada por explosão a vapor, produzindo 1,61 g/L de etanol, o que atingiu 64,7% do rendimento teórico de etanol durante 144 h. Quando utilizaram somente o microrganismo que produz celulases, foram gerados 1.19 g/L de etanol. Por outro lado, só com a levedura produtora de xilanases, obtiveram 0,26 g/L. Ao comparar os dados obtidos no presente estudo, a concentração de etanol obtida aqui foi superior e em menos tempo de processo, sendo bastante interessante para aplicação no BPC.

A viabilidade celular final das células (Tabela 1) foi alta para os três sistemas fermentativos estudados, sendo acima de 90%. Porém, notou-se que a levedura AC14 é mais robusta às condições do BPC comparada à Cellusec 3, sendo mais resistente aos inibidores do hidrolisado e ao etanol produzido durante o BPC. Por isso, quando foi estudado o consórcio microbiano (AC14+C3), a viabilidade foi inferior do que aquela obtida somente com AC14. Na literatura, já foi reportado que a *S. cerevisiae* AC14, de fato, é bastante tolerante tanto na forma livre quanto na forma imobilizada (PEREZ et al., 2023; RAMOS et al., 2023). Isso pode ser explicada por ser uma cepa recombinante engenheirada a partir da cepa industrial *Ethanol Red* que é uma cepa amplamente usada para produção de etanol 1G (CLAES et al., 2020). Por outro lado, a menor robustez da Cellusec 3 pode ter acontecido porque modificações genéticas podem modificar características importantes da levedura (MEIJNEN et al., 2016). Nesse caso, a superexpressão de celulases devem ter reduzido a resistência da cepa.

Ao analisar os valores obtidos para as atividades enzimáticas (Figura 1), de forma geral, também notou-se uma superioridade da levedura AC14, exceto na produção de celulases totais. As xilanases geradas pela AC14 (2.2 UI/mL) foram 3 vezes maior que a Cellusec 3 e 2 vezes maior que o consórcio, tendo sido, provavelmente, o principal motivo da superioridade da AC14. A β -xilidase (1.8 UI/mL) foi estatisticamente igual para todos os ensaios, não tendo influenciado na diferença entre as concentrações de etanol produzido. Celulases totais (0.4 UI/mL) foi a única enzima menos produzida pela cepa AC14 quando comparado com os outros sistemas fermentativos. A β -glicosidase (0.3 UI/mL), por sua vez, foi estatisticamente igual entre as cepas isoladas e superior ao consórcio. Ao analisar esses valores, foi notado que a atividade de xilanases foi preponderante para que o BPC com AC14 fosse mais eficiente do que os outros sistemas. Porém, cabe destacar que o presente estudo foi conduzido em baixa carga de sólidos (1%) e que para o BPC ser aplicado industrialmente é preciso aumentar esta quantidade de material, aumentando, conseqüentemente, a concentração de celulose. Sendo assim, em trabalhos futuros, a cepa Cellusec 3 pode ser bastante interessante, pois será necessária maior atividade enzimática de celulases totais. Adicionalmente, comparando esse estudo com outros, as atividades enzimáticas reportadas na literatura têm ordens de grandeza menores do que as obtidas aqui. Amoah et al. (2017), por exemplo, desenvolveram uma levedura que secretava

celulases e xilanases, obtendo 0,2 e 0,4 UI/g em base úmida, enquanto aqui foram apresentadas 4.7 e 2.4 UI/g de célula.

Conclusão

Diante da necessidade de se desenvolver um Bioprocessamento Consolidado aplicável industrialmente, buscou-se um microrganismo ou um consórcio microbiano mais eficiente na produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana, comparando as cepas AC14 e Cellusec 3 individualmente ou em consórcio. A cepa *S. cerevisiae* AC14 foi mais eficiente do que a cepa Cellusec 3 e estatisticamente semelhante ao consórcio, tendo produzido 12.7 g/L de etanol. Esta cepa se mostrou mais robusta com maior viabilidade celular (98%) e produziu mais xilanases (2.2 UI/mL). Assim, a AC14 é mais interessante para o BPC de bagaço de cana-de-açúcar nas condições estudadas, embora a Cellusec 3 se mostrou uma excelente produtora de celulase, de forma que o consórcio destas leveduras também seja aplicável, principalmente em condições com maiores cargas de sólido.

Referências

BARROS-RIOS, J.; ROMANÍ, A.; GARROTE, G.; ORDAS, B. Biomass, sugar, and bioethanol potential of sweet corn. **GCB Bioen.**, v. 7, p. 153–60, 2015.

CHEN, L.; DU, J.-L.; ZHAN, Y.-J.; LI, J.-A.; ZUO, R.-R.; TIAN, S. Consolidated bioprocessing for cellulosic ethanol conversion by cellulase–xylanase cell-surfaced yeast consortium. **Prep. Biochem. Biotech.**, v. 48, n. 7, p. 653–661, 9 ago. 2018. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1487846>.

CLAES, A.; DEPARIS, Q.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Simultaneous secretion of seven lignocellulolytic enzymes by an industrial second-generation yeast strain enables efficient ethanol production from multiple polymeric substrates. **Metab. Eng.**, v. 59, p. 131–41, 2020.

MEIJNEN, J. P.; RANDAZZO, P.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; BRINK, J. V. D.; VANDECRUYS, P.; STOJILJKOVIC, M.; DUMORTIER, F.; ZALAR, P.; BOEKHOUT, P.; CIMERMAN, N. G.; KOKOSAR, J.; STAJDOHAR, M.; CURK, T.; PETROVIC, U.; THEVELEIN, J. M. Polygenic analysis and targeted improvement of the complex trait of high acetic acid tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotec. Biof.**, v. 9, p. 5, 2016.

MESQUITA, T. J. B.; SANDRI, J. P.; DE CAMPOS GIORDANO, R.; HORTA, A. C. L.; ZANGIROLAMI, T. C. A high-throughput approach for modeling and simulation of homofermentative microorganisms applied to ethanol fermentation by *S. cerevisiae*. **Ind. Biotechnol.**, v. 17, p. 13–26, 2021.

PEREZ, C. L.; MILESSI, T. S.; SANDRI, J. P.; RAMOS, M. D.; CARVALHO, B. T.; CLAES, A.; DEMEKE, M. M.; THEVELEIN, J. M.; ZANGIROLAMI, T. C. (2023). Evaluation of consolidated bioprocessing of sugarcane biomass by a multiple hydrolytic enzyme producer *Saccharomyces* yeast. **Bioenergy Res.**, v. 16, n. 4, p. 1973-1989, 2023.

PERIYASAMY, S.; ISABEL, J. B.; KAVITHA, S.; KARTHIK, V.; MOHAMED, B. A.; GIZAW, D. G.; SIVASHANMUGAM, P.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol—a review. **Chem. Eng. J.**, v. 453, p. 139783, 2023.

PUPIN, I. A. C.; SANTOS JÚNIOR, P. S.; COSTA, S. M. P.; RAMOS, M. D. N.; SOUZA, J. P. M.; THEVELEIN, J. M.; MILESSI, T. S. Selection of a recombinant yeast producing hydrolytic enzymes for biomass consolidated bioprocessing. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL, 1, 2024, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: COBBIND, 2024. p. 1-3.

RAMOS, M. D. N.; SANDRI, J. P.; CLAES, A.; CARVALHO, B. T.; THEVELEIN, J. M.; ZANGIROLAMI, T. C.; MILESSI, T. S. Effective application of immobilized second generation industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain on consolidated bioprocessing. **New Biotechnol.**, v. 78, p. 153-161, 2023.

RAMOS, M. D. N.; MILESSI, T. S.; CANDIDO, R. G.; MENDES, A. A.; AGUIAR, A. Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: Current status and perspectives. **Energy Sustain. Dev.**, 68, 103-119, 2022.

SANDRI, J. P.; RAMOS, M. D.; PEREZ, C. L.; MESQUITA, T. J.; ZANGIROLAMI, T. C.; MILESSI, T. S. Bioreactor and process design for 2G ethanol production from xylose using industrial *S. cerevisiae* and commercial xylose isomerase. **Biochem. Eng. J.**, v. 191, p. 108777, 2023.

SINGH, N.; SINGHANIA, R. R.; NIGAM, P. S.; DONG, C. D.; PATEL, A. K.; PURI, M. Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. **Bioresour. Technol.**, v. 344, p. 126415, 2022.

Agradecimentos

Esse estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES, Código Financeiro 001). Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - processos n.º 140340/2024-6 e 407716/2021-1, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo n.º 2023/15508-1.