



Biomassa de *Arthrospira platensis*: Uma abordagem para produção de bioetanol

JULICH, J.¹; WERLANG, E. B.²; SCHNEIDER, R. C. S.³; NEVES, F. F.⁴; MARTINEZ, A.⁵

PALAVRAS-CHAVE: *Arthrospira platensis*. Fermentação. *Escherichia coli* MS04. Bioetanol.

RESUMO

Um estudo com a biomassa de *Arthrospira platensis* foi realizado para otimizar a fermentação com *Escherichia coli* MS04 obtida por engenharia metabólica. A sacarificação enzimática foi utilizada para liberar a quantidade máxima de glicose utilizando duas amilases comerciais em sequência. Estes hidrolisados foram fermentados com bactérias etanologênicas, atingindo 5,5 % de etanol, o que corresponde a 52 % de conversão do teor de açúcares. O rendimento encontrado neste estudo mostrou que há potencial para a produção de bioetanol a partir de *A. platensis* com fermentação com *E. coli* MS04, mas as condições experimentais podem ser melhoradas.

***Arthrospira platensis* BIOMASS: AN APPROACH TO BIOETHANOL PRODUCTION**

KEYWORDS: *Arthrospira platensis*. Fermentation. *Escherichia coli* MS04. Bioethanol.

ABSTRACT

A study with *Arthrospira platensis* biomass was conducted to optimize the fermentation using metabolically engineered *Escherichia coli* MS04. The enzymatic saccharification was used to release the maximum amount of glucose using two commercial amylases in sequence. These hydrolysates were fermented with ethanologenic bacteria, achieving 5.5 % ethanol, which corresponds to 52 % conversion of the sugars content in the hydrolysate. The yield found in this study showed that there is potentiality to bioethanol production from *A. platensis* and fermentation with *E. coli* MS04, but experimental conditions can be improved.

¹ Pós-graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). E-mail: jennifer.julich@yahoo.com.br

² Centro de excelência em Produtos e Processos Oleoquímicos e Biotecnológicos da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). E-mail: elianawerlang@gmail.com

³ Departamento de Ciências, Humanidades e Educação da Universidade de Santa Cruz do Sul (Unisc). E-mail:

⁴ Departamento de Engenharia de Pesca e Ciências Biológicas da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC - Laguna). E-mail: fabio.neves@udesc.br

⁵ Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). E-mail: alfredo@bt.unam.mx

1 INTRODUÇÃO

À medida que os recursos de petróleo bruto estão se esgotando, há um esforço significativamente maior em pesquisas de alternativas viáveis aos combustíveis derivados de petróleo (HARUN; DANQUAH, 2011). A demanda e o preço dos incrementos de combustíveis fósseis e o impacto ambiental de sua combustão causaram preocupação e estimularam o desenvolvimento de etanol combustível a partir de fontes biológicas (FERNÁNDEZ-SANDOVAL et al., 2012).

O bioetanol é um combustível para combustão considerado um excelente candidato para substituição de combustível de petróleo em motores a gasolina não modificados, sendo obtido via processo de fermentação de biomassa renovável com alto teor de açúcares ou de polissacarídeos à base de amido (SOUZA et al., 2012). Algumas plantas reconhecidas como produtoras de etanol são cana-de-açúcar, milho, beterraba, sorgo sacarínico, mandioca entre outros, que contém açúcar ou amido em grande quantidade (HARUN; DANQUAH, 2011). Os resíduos contendo celulose e lignocelulose são matérias primas alternativas em potencial para produção de etanol, sendo encontrados na maioria dos resíduos agrícolas, industriais, florestais e municipais (FERNÁNDEZ-SANDOVAL et al., 2012).

Para produzir bioetanol a partir de resíduos vegetais, uma ruptura da parede celular deve ser realizada, já que a maioria dos carboidratos é aprisionada dentro da célula (celulose e hemicelulose), ou intracelularmente, como armazenamento de energia ou na estruturação dos tecidos fibrosos vegetais. Em um estágio adicional à produção tradicional de etanol a partir de açúcares, é necessário a hidrólise de polissacarídeos, liberando monossacarídeos, os quais são passíveis de fermentação em bioetanol. Muitas vezes, anterior a etapa de hidrólise é necessário um pré-tratamento da biomassa, facilitando o acesso dos agentes de hidrólise aos polissacarídeos e aumentando a área superficial para acesso as regiões dos polissacarídeos onde ocorre a clivagem da molécula formando monossacarídeos (hexoses e pentoses). Dependendo do pré-tratamento, a hidrólise da lignocelulose ocorre e tem-se uma maior disponibilidade da celulose para um processo de hidrólise seguinte (HERNÁNDEZ et al., 2015).

Durante a etapa de hidrólise, química ou enzimática, diferentes tipos de açúcares são gerados, os quais são dependentes da composição da biomassa utilizada. Através da utilização de resíduos vegetais, por exemplo, obtêm-se principalmente as pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose). No processo fermentativo, diversos microrganismos são capazes de utilizar glicose para produzir etanol, mas a maioria não utiliza a xilose e arabinose. Para tornar o processo economicamente viável, é necessário utilizar microrganismos capazes de converter todos os açúcares disponíveis na fração hemicelulósica em etanol e tolerar os compostos tóxicos gerados durante a hidrólise, alcançando assim maiores rendimentos (FERNÁNDEZ-SANDOVAL et al., 2012; PARRA-RAMÍREZ; MARTINEZ; CARDONA, 2018).

A fermentação microbiana utilizando resíduos sustentáveis de baixo custo para a produção de biocombustíveis renováveis tem sido amplamente estudada devido à sua contribuição para vantagens ambientais e benefícios comerciais (SOO et al., 2017). No estudo de Parra-ramírez, Martinez, Cardona (2018) uma linhagem de *E. coli* metabolicamente modificada é utilizada para consumir glicose e xilose de um hidrolisado de palha de milho para produção de etanol. A cepa possui um alto potencial, permitindo eficientemente a utilização de todos

os açúcares obtidos a partir de materiais lignocelulósicos, aumentando a viabilidade técnica e econômica dos processos e agregando valor a todos os resíduos agrícolas com estas características.

Desta forma, objetivou-se a produção de bioetanol a partir de biomassa de microalga *Arthrospira platensis* considerando o aumento da proporção da biomassa na escala laboratorial em *shaker* com agitação orbital, uma vez que a conversão realizada a partir de 20 g de amostra em 10% do meio foi previamente otimizada em mini-fermentador (WERLANG et al., 2020) utilizando a mesma cepa etanologênica metabolicamente modificada da bactéria *Escherichia coli* MS04.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 BIOMASSA DE *Arthrospira platensis*

A. platensis foi cultivada em um sistema semicontínuo em um raceway na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Laguna, Brasil. A coluna de água foi mantida a 0,15 m de profundidade e o volume de cultura foi de 1200 L e um fluxo 0,3 m s⁻¹. O pH do meio de cultura foi de 10,24 ± 0,90. O meio de cultura continha água doce e foi composto por 10 g L⁻¹ de NaHCO₃, 1 g L⁻¹ de fertilizante solúvel NPK 18:6:18 e NaCl (30 g L⁻¹).

2.2 FERMENTAÇÃO

A produção de etanol foi feita conforme adaptação do método descrito por Fernández-Sandoval et al. (2012). O hidrolisado foi obtido seguindo as mesmas etapas e proporções testadas anteriormente por Julich et al. (2019), variando-se as quantidades (em massa) de biomassa. Esta mesma amostra de biomassa foi previamente analisada por Julich et al. (2019) e em média apresentou 27,93 ± 0,67 % de carboidratos totais. A concentração de enzima CTec2 foi a qual se obteve a maior conversão de açúcares no hidrolisado, de 12 FPU. Sequencialmente foi realizada a fermentação para produção de etanol utilizando o hidrolisado como fonte de carbono. Para tal, utilizou-se juntamente com o hidrolisado uma cepa bacteriana metabolicamente modificada de *E. coli*, MS04, conforme descrito em Werlang et al. (2020), que foi adicionada no tempo zero ao hidrolisado.

O pré-inóculo da *E. coli* foi preparado transferindo uma alçada da estirpe conservada de um criotubo (glicerol 80%) para um tubo de ensaio com 4 mL de caldo Luria Bertani suplementado com 4 µL do antibiótico Kanamicina (30 mg mL⁻¹), permanecendo em *shaker* com agitação orbital durante 4 h a 37 °C e 300 rpm. O inóculo que foi utilizado nas fermentações foi preparado em 200 mL de meio mínimo suplementado com acetato de sódio (2 g L⁻¹), citrato de sódio (0,1 g L⁻¹) e glicose (20 g L⁻¹) e em pH 6,8, acrescido desse pré-inóculo, que permaneceu em *shaker* durante 20 h a 37 °C e 150 rpm para crescimento celular. Após esse período, a concentração do inóculo no meio foi medida em espectro a 600 nm, considerando que o fermentado inicial deve ter 0,1 de densidade óptica (OD). Após o inóculo foi centrifugado por 10 min, a 4 °C e a 3.500 rpm, para obtenção dos *pellets* que foram separados e acrescido de 5 mL de água estéril para dissolução, com auxílio de vortex.

As fermentações foram realizadas nos mesmos frascos utilizados para as hidrólises. Antes da inoculação, foram adicionados ao hidrolisado 0,1 mL de betaína (como osmoprotetor), 5 mL de sais de amônio (como fonte de nitrogênio) e 2 mL de acetato de sódio (2 g L⁻¹) (necessário para funcionamento da via bioquímica para produção de etanol) e o pH foi ajustado para 6,8 com KOH 2 mol L⁻¹ (corresponde de 7 a 8 mL). As culturas foram

incubadas a 37 °C e 200 rpm até o substrato ser totalmente consumido. Alíquotas do meio foram coletadas a cada 4 h até 12 horas e em 24 horas. As alíquotas foram centrifugadas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de índice de refração (DIR) da marca Shimadzu (Model 20A, Japão) para verificação do consumo do substrato.

As condições de análise no HPLC/DIR, utilizando uma coluna RHM Monosaccharide H⁺ (300 mm x 7,8 mm) com partículas de 4,6 µm foram temperatura do forno de 85 °C, fase móvel água ultrapura, fluxo 0,5 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL (LAMB et al., 2018).

2.3 AUMENTO DE ESCALA LABORATORIAL

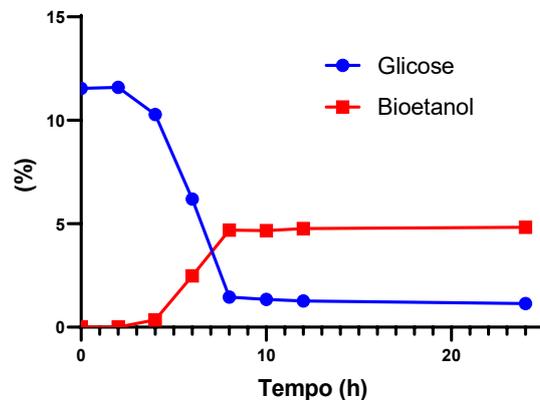
O aumento da escala foi iniciado com 20 g de biomassa em proporção de 10 % ao meio. As variáveis como proporção massa/volume, temperatura, tempo e proporção dos outros agentes químicos e biológicos foram mantidas. Em seguida, o aumento da escala foi analisado através de experimentos com 40 g de biomassa para um volume de 400 mL, 80 g de biomassa para um volume de 800 mL e 120 g de biomassa para um volume de 1200 mL. Todas as amostras foram analisadas em HPLC. Os resultados de produção de açúcares e etanol foram submetidos à análise de variância com o software Prisma graph pad 8.4.2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do acompanhamento do consumo de glicose e produção de bioetanol, para as condições experimentais, partindo de 20 g de biomassa de *A. platensis* em um volume de 200 mL de meio obteve-se um rendimento final de aproximadamente 5% de etanol (Figura 1).

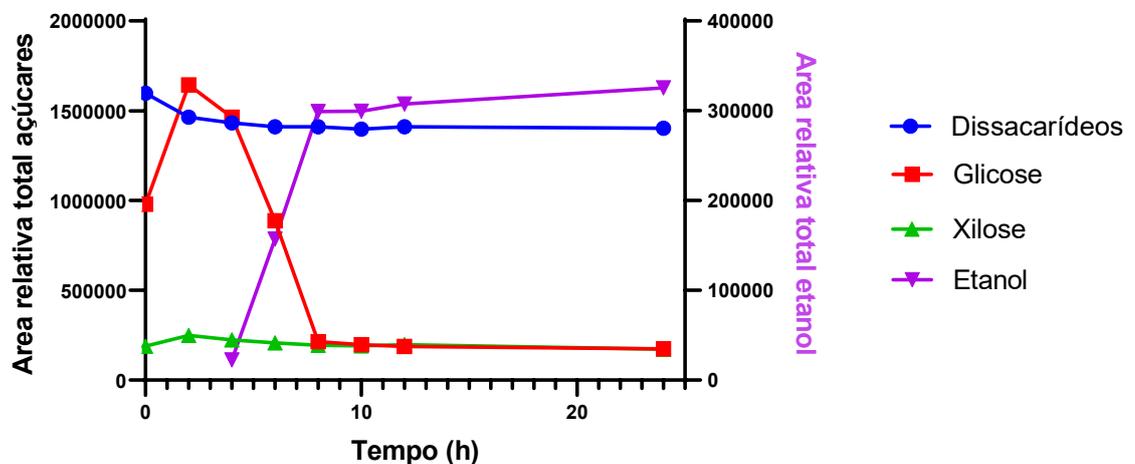
Os percentuais de glicose obtidos na etapa de hidrólise foram de aproximadamente 11,5 %, no início da reação de fermentação, decaindo aos poucos e iniciando a produção de etanol em 4 h de reação, chegando a um rendimento final em 24 horas de aproximadamente 5 % de etanol.

Figura 1 - Curvas de produção de bioetanol e de consumo de glicose na fermentação utilizando 20 g de biomassa de *A. platensis* e a bactéria *E. coli* MS04



No gráfico da Figura 2, realizou-se uma comparação das áreas dos cromatogramas obtidos no acompanhamento da análise da fermentação, quanto aos percentuais de dissacarídeos, glicose e xilose que são disponibilizados pela hidrólise enzimática e a produção de etanol realizada com o uso da bactéria *E. coli*.

Figura 2 - Comparação dos açúcares durante a fermentação com relação a área dos cromatogramas obtidos por HPLC.

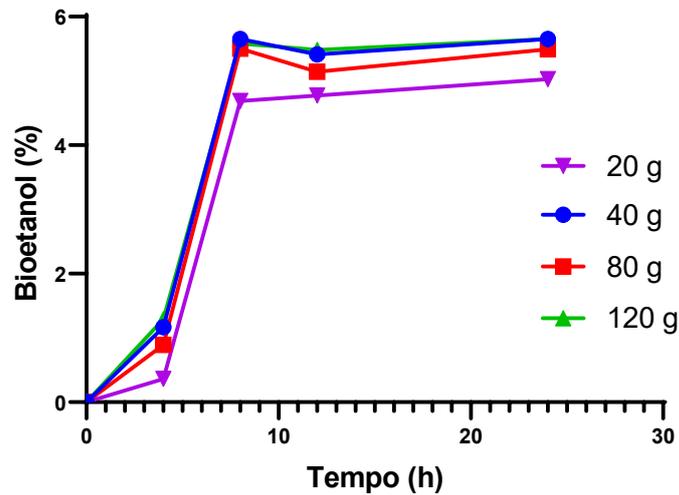


Em 2 horas de fermentação pode-se notar um aumento da glicose do meio, possivelmente pela conversão de dissacarídeos, sendo que só a partir deste ponto, em 4 horas observa-se a produção de etanol, que em 8 horas já atinge valores próximos ao seu limite. Já a xilose sofre uma pequena alteração, não sendo possível observar o consumo na fermentação.

Além destes açúcares a biomassa de *A. platensis* pode ter outros monossacarídeos que compõem os exopolissacarídeos (rhamnose, frutose e xilose). No entanto, como característica de cianobactérias, a forma de acúmulo de carboidratos é principalmente glicogênio conforme apresentado por Phéllippé et al. (2019).

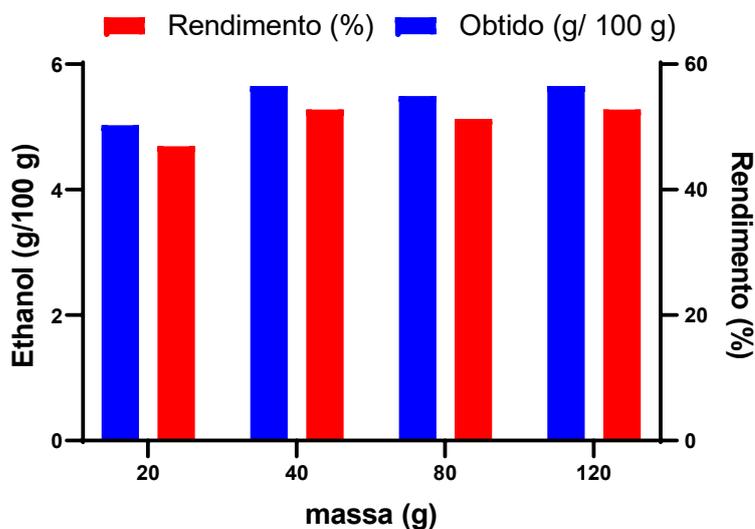
Ao avaliar o aumento da escala de produção, observa-se a manutenção na proporção de 10 % de biomassa em relação ao volume de meio (Figura 3), com percentuais semelhantes, produzindo em média 5,5 % de etanol em todos os volumes testados, não havendo diferença estatística entre os teores obtidos.

Figura 3 - Comparação do percentual de produção de bioetanol nos experimentos com diferentes biomassas
($p > 0,05$)



Quanto ao rendimento de bioetanol obtido em relação a massa de biomassa utilizada, foi possível encontrar aproximadamente 52 % de conversão (Figura 4).

Figura 4 - Rendimento percentual de obtenção de bioetanol em a partir da massa de glicose da biomassa de *A. platensis*.



A partir do experimento realizado é possível inferir que valores maiores de conversão dependem das condições experimentais, como controle rígido de pH e temperatura, fatores que podem ser alcançados em um biorreator especial para viabilizar reações de fermentação, uma vez que Werlang et al. (2020) encontrou alta conversão (92 %) com a mesma cepa, porém em um mini-fermentador de bancada e uma amostra de biomassa com alto teor de carboidratos (> 40 %). Assim, a cepa de *E. coli* mostrou seu potencial de conversão da biomassa estudada, podendo-se melhorar este resultado com base nas condições experimentais e no teor de carboidratos da biomassa. Observou-se que esta biomassa já tem sido estudada para a produção de etanol e já apresentou viabilidade técnica. Com uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* por exemplo, Rempel et al. (2019) alcançou 83,3 % de eficiência na conversão.

Observa-se que o aumento da massa de partida não interfere no rendimento ($p > 0,05$) e que uma biomassa com maior teor de monossacarídeos após a hidrólise pode ser um aspecto relevante para alcançar um resultado que viabilize o uso da *A. platensis* para produção de etanol. Conforme Werlang et al. (2020), há potencial no uso da *E. coli* para transformação da biomassa de *A. platensis*, no entanto, na condição de produção desta biomassa é necessário manter condições que levam ao aumento no acúmulo de carboidratos com controle de pH, temperatura e dos nutrientes presentes no meio de cultura. Os experimentos realizados por Werlang et al. (2020) foram em um mini-fermentador na Universidad Autonoma do México, portanto em condições experimentais laboratoriais previamente otimizadas para a conversão de biomassa pela *E.coli* MS04, as quais podem ser melhoradas na Universidade de Santa Cruz do Sul para a conversão de um volume maior de biomassa, buscando a possibilidade de produção em escala piloto.

4 CONCLUSÃO

Os percentuais de etanol encontrados nos experimentos com o aumento de escala de 20 até 120 g foram de 5,5 % de etanol e não apresentaram diferença significativa. Considerando o valor teórico esperado para esta biomassa foi possível encontrar aproximadamente 52 % de eficiência do processo. Sendo assim, foi possível obter bioetanol a partir da biomassa de *A. platensis* com o uso da cepa de *E. coli* MS04 na fermentação, no entanto as condições experimentais podem ser modificadas e controladas para o aumento da conversão.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa IC, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código 001; Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) – Protocolo 310228/2019-0 e ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) – Número 01.0144.00/2010.

REFERÊNCIAS

FERNÁNDEZ-SANDOVAL, M. T. et al. Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 1291-1300, 2012.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, p. 1079-1084, 2011.

HERNÁNDEZ, D. et al. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 939-945, 2015.

JULICH, J. et al. Estudo da hidrólise enzimática de biomassa de microalga empregando uma sequência de enzimas. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 9, n. 2, p. 77-84, 2019.

LAMB, C. de C. et al. Bioethanol production from rice hull and evaluation of the final solid residue. **Chemical Engineering Communications**, v. 205, n. 6, p. 833-845, 2018.

PARRA-RAMÍREZ, D.; MARTINEZ, A.; CARDONA, C. A. Technical and economic potential evaluation of the strain *Escherichia coli* MS04 in the ethanol production from glucose and xylose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 140, p. 123-129, 2018.

PHÉLIPPÉ, M. et al. Characterization of the polysaccharides chemical diversity of the cyanobacteria *Arthrospira platensis*. **Algal research**, v. 38, p. 101426, 2019.

REMPEL, A. et al. Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: An energy efficient approach. **Bioresource technology**, v. 288, p. 121588, 2019.

SOO, C.-S. et al. Co-production of hydrogen and ethanol by *Escherichia coli* SS1 and its recombinant. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 64-70, 2017.

SOUZA, M. P. et al. As microalgas como uma alternativa para a produção de biocombustíveis. Parte 1: bioetanol. **Tecno-Lógica (UNISC)**, v. 16, n.2, p. 108-116, 2012.

WERLANG, E. B. et al. Bioethanol from hydrolyzed *Spirulina (Arthrospira platensis)* biomass using ethanologenic bacteria. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2020.