UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de

Processos Químicos e Bioquímicos

PRODUÇÃO DE SOLVENTES VERDES A PARTIR DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Absai da Conceição Gomes

Orientadores: Nei Pereira Jr., *PhD*

Lidia Maria Melo Santa Anna, *DSc*

Rio de Janeiro

Novembro, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de

Processos Químicos e Bioquímicos

ABSAI DA CONCEIÇÃO GOMES

PRODUÇÃO DE SOLVENTES VERDES A PARTIR DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (*DSc*).

Orientadores:

Nei Pereira Jr., *PhD*

Lidia Maria Melo Santa Anna, *DSc*

Rio de Janeiro

2019

PRODUÇÃO DE SOLVENTES VERDES A PARTIR DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Absai da Conceição Gomes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (*DSc*).

Aprovada por:

Nei Pereira Jr., PhD (EQ/UFRJ) – Orientador/Presidente

Lidia Maria Melo Santa Anna, DSc (CENPES-PETROBRAS) – Co-Orientadora

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, DSc (DEB-EQ/UFRJ)

Adriana Ururahy Soriano, DSc (CENPES-PETROBRAS)

Paulo Luiz de Andrade Coutinho, DSc (ISI BIOSSÍNTÉTICOS-SENAI-RJ)

Rodrigo Pires do Nascimento, DSC (DEB-EQ/UFRJ)

João Monnerat Araujo Ribeiro de Almeida (SINOCHEM – E&P/BR)

Ficha Catalográfica

Gomes, Absai da Conceição.

Produção de solventes verdes a partir de frações polissacarídicas do bagaço de cana-de-açúcar / Absai da Conceição Gomes. 2019

141 f.: il.

Dissertação (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2019

Orientador: DSc. Nei Pereira Jr.

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Hidrolisados. 3. Fermentação ABE. 4. Pervaporação. 5. Butanol – Teses. I. Pereira Jr., Nei (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Título.

“Os passos de um homem bom são confirmados pelo Senhor e ele deleita-se no seu caminho.”

Salmos 37:23

Agradecimentos

Agradeço muito, primeiramente, ao meu Deus, o Todo-Poderoso, por me dar esta oportunidade de conquistar este penhor através de um laborioso tempo de trabalho e dedicação. Agradeço pela oportunidade de existir, de crescer, de estudar, de estar em Seus desígnios e projetos para a minha vida e pela obtenção de mais um degrau.

Agradeço à minha família, o que traz sentido à minha existência: minha formidável mãe Niuseth, minha querida esposa Simone e meus 4 filhos (Júnia, Jair, Jairo e Absai Jr.). À minha mãe pela excelente educação e criação em caminhos retos e condizentes com as Escrituras Sagradas, ensinando-me a ter honestidade, sinceridade e, acima de tudo caráter. Sempre será para mim um referencial. À minha esposa querida, por suportar horas de muita ocupação e empenho dedicados a este trabalho, cuidando com muito amor de mim e dos meus filhos e sempre me incentivando. O meu amor pela Simone é algo inexplicável e que poeta algum é capaz de descrever... Meus filhos são como pérolas, de valor inestimável e razão de minha existência. Incentivo-os sempre aos estudos, cobrando empenho e dando o exemplo, porque acredito que a educação é a força-motriz essencial para alavancar a locomotiva de uma vida eficaz em sociedade e promover o tão sonhado desenvolvimento pleno em nosso país. Dentro de minha família jamais poderia deixar de agradecer ao meu tio Djalma, por sempre me incentivar aos estudos, desde o Ensino Fundamental. Obrigado, tio, por ter sido o catalisador de minha vida acadêmica.

Agradeço ao Emérito Professor, Dr. Nei Pereira Jr., pela maestria na orientação deste trabalho. É um incentivador e, ouso dizer, criador de um espírito crítico e de sensibilidade à pesquisa de alto nível. Agradeço profundamente pelos momentos em que me trouxe muito ânimo e confiança no trabalho. Agradeço por ter o privilégio de ser orientado por um profissional de altíssimo nível que ele é.

Agradeço à Dr$^{a.}$ Lidia Maria Melo Santa Anna, minha colega de trabalho e Co-Orientadora. Além disso uma amiga do coração. O tempo em que trabalhamos juntos no CENPES foi de grande aprendizado e encorajamento. Sim, aprendi muito com ela a lidar com os reveses e a trabalhar com dedicação para apresentar um trabalho confiável e de

qualidade. Fica aqui registrado o meu muito obrigado pela oportunidade de trabalhar com uma pessoa maravilhosa.

Quero fazer um agradecimento especial ao MSc. Douglas de França, que muito me ajudou na elaboração dos gráficos e também nas respostas aos referees durante a publicação do artigo científico gerado neste trabalho. Meu muito obrigado por ter ficado um bom tempo envolvido neste trabalho me ajudando.

Agradeço à Petrobras S.A. por permitir a realização de toda a parte experimental nos laboratórios da Gerência de Biotecnologia do CENPES (BIO), meu ambiente de inspiração e trabalho deste outubro de 2002. Sinto-me honrado em fazer parte do time de uma empresa do porte da Petrobras, que tem investido em Ciência e Tecnologia no país e contribuído de maneira exemplar para o desenvolvimento social e intelectual desta nação.

Agradeço às minhas gerentes Gina Vasquez Sebastian e Juliana Vaz Bevilaqua por acreditarem em meu potencial e permitirem o desenvolvimento deste trabalho na BIO. O incentivo de vocês foi fundamental para a conclusão deste projeto.

Agradeço muito a todos de minha equipe de trabalho do Grupo de Bioprocessos da BIO, que muito me ajudaram neste período: Lidia Maria Melo Santa Anna, Cláudia Julia Groposo Silveira, Aline Machado de Castro, Danuza Nogueira Moyses, Ana Paula Rodrigues Torres, José Nicomedes Júnior, Carlos Augusto Sodré e Felipe Mathias Oliveira. Vocês foram muito companheiros e amigos, uma equipe de alto nível profissional e humano.

Agradeço à Prof. Maria Isabel que muito me ajudou nos planejamentos de experimentos de otimização e validação da propagação para redução de custos. Além de ser uma excelente profissional, possui um coração muito bom e uma conduta maravilhosa como pessoa.

Não posso deixar jamais de agradecer os incentivos de meu amigo, Rev. Fabiano Antônio Ferreira, bacharel em Matemática e Português-Hebraico e Ph.D. em Teologia, pelos maravilhosos e inesquecíveis incentivos aos estudos, desde a minha trajetória no Nível Médio na Escola Técnica Federal de Química, a melhor fase acadêmica de minha vida. O que me encanta neste amigo é o seu otimismo e capacidade de sonhar alto. Ele tem conquistado muita sabedoria e tem sido um referencial para mim. A ele dedico também esta obra como eterno agradecimento.

Enfim... agradeço à minha amada Igreja em Acari, pertencente às Igrejas que Militam na Obra da Restauração de Tudo, meu berço original em termos de conhecimento da Palavra de Deus e da Verdadeira Vida. Sou muito orgulhoso e feliz por participar desta equipe de pessoas simples da sociedade brasileira, mas de um vultuoso valor espiritual, jamais visto. Tenho prazer em ser o pastor presidente desta Igreja e poder receber de todos os seus mais de 200 membros o apoio, o carinho, o respeito e, sobretudo, as orações aos Céus a meu favor. O fruto do empenho de vocês no tocante às intercessões é este trabalho concluído com muito esmero.

Resumo

GOMES, Absai da Conceição. Produção de solventes verdes a partir de frações polissacarídicas do bagaço de cana-de-açúcar. **Tese de Doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.**

Orientadores: Nei Pereira Jr., *PhD* e Lidia Maria Melo Santa Anna, *DSc*

Há uma demanda crescente por combustíveis e produtos químicos a partir de matérias-primas renováveis e que não competem com a produção de alimentos, como por exemplo as biomassas lignocelulósicas. No Brasil, o setor sucroalcooleiro é o que mais produz biomassa por ano, chegando a centenas de milhões de tonelada de bagaço de cana-de-açúcar. Os açúcares provenientes deste material podem ser fermentados por microrganismos, como *Clostridium acetobutylicum,* para produção de butanol, tendo como outros produtos a acetona e o etanol. No presente trabalho, o bagaço oriundo de uma usina no Centro-Oeste do Brasil foi primeiramente submetido a um pré-tratamento com ácido diluído para a solubilização de açúcares da hemicelulose. Após a separação da fração líquida denominada HH C5, o sólido residual foi submetido à hidrólise enzimática da celulose, gerando duas correntes de hidrolisado (HC C6 e HC C5+C6). Antes dos ensaios de fermentação, a composição do meio para o crescimento celular de *Clostridium acetobutylicum* foi otimizada pelo uso da técnica de planejamento experimental (DOE), levando a uma redução no número de componentes de 9 para 3. A composição final para a propagação celular ficou composta de peptona, extrato de levedura e glicose, nas seguintes concentrações: 6,0, 6,0 e 12,0 g/L, respectivamente. Houve redução nos custos com insumos para esta etapa em 76%. O hidrolisado que apresentou melhores resultados foi o HC C5+C6, a partir do qual foram obtidas concentrações finais de butanol de 8,7 g/L, sem a necessidade de suplementação de destoxificação das correntes de açúcar ou suplementação de nutrientes e consequente redução de custos. A produtividade volumétrica média (Q_P) e o rendimento médio ($Y_{P/S}$) de butanol alcançados foram de 0,27 g/L.h e 0,24 $g.g^{-1}$, respectivamente. A aplicação da pervaporação como técnica para a recuperação dos produtos durante a fermentação ABE foi eficiente, obtendo-se concentrações de butanol e acetona no permeado de 87 e 234 g/L, respectivamente. A remoção de ambos no meio fermentativo diminuiu a inibição das células e iniciou-se um novo ciclo de fase acidogênica, com consumo de mais xilose, produção de ácidos acético e butírico e, consequentemente, uma produção de solventes 17% maior. Os resultados abrem novas perspectivas para um mercado de U$ 3 bilhões/ano de Biorrefinaria de segunda geração, na medida em que contribui para a viabilidade da produção de moléculas importantes para a indústria de combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa residual de composição lignocelulósica.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, hidrolisados, fermentação ABE, pervaporação, butanol

Abstract

GOMES, Absai da Conceição. Produção de solventes verdes a partir de frações polissacarídicas do bagaço de cana-de-açúcar. **Tese de Doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019**.

Advisors: Nei Pereira Jr., *PhD* e Lidia Maria Melo Santa Anna, *DSc*

There is a growing demand for fuels and chemicals from renewable raw materials that do not compete with food production, for instance lignocellulosic biomass. In Brazil, the sugarcane sector produces large amount of biomass, reaching hundreds of millions of tonnes per year of sugarcane bagasse. Sugars from this material can be fermented by microorganisms such as *Clostridium acetobutylicum*, leading to butanol, acetone and ethanol production. In the present work, the bagasse originated from a Midwest Brazilian Plant was first subjected to a pre-treatment with diluted acid for the solubilization of sugars of the hemicellulose. After separating the liquid fraction called HH C5, the residual solid was subjected to enzymatic hydrolysis of cellulose, generating two currents of hydrolysate (HC C6 and HC C5+C6). Before the fermentation assays, the composition of the medium for cell growth of *Clostridium acetobutylicum* was optimized by the use of design of experiments (DOE), leading to a reduction in the number of components from 9 to 3. The final composition for cell propagation medium containing 6.0 g/L of peptone, 6.0 g/L of yeast extract and 12.0 g/L of glucose was responsible for 76% of saving costs. The hydrolysate that presented the best results was HC C5+C6, obtaining final butanol concentrations of 8.7 g/L without the need for detoxification of sugar streams or nutrient supplementation and consequent reduction of costs. The mean volumetric yield (Q_P) and the mean yield ($Y_{P/S}$) of butanol achieved were 0.27 g/L.h and 0.24 $g.g^{-1}$, respectively. The application of pervaporation as a technique for the recovery of products during the ABE fermentation was efficient, obtaining concentrations of butanol and acetone in the permeate of 87 and 234 g/L, respectively. The removal of both in the fermentative medium decreased cell inhibition and a new cycle of acidogenic phase was initiated, with consumption of more xylose, production of acetic and butyric acids and, consequently, 17% solvent production increasing. The results open new perspectives for a U$ 3 billion/year Second generation market just as it contributes to the viability of producing important molecules to the fuel and chemical industry from lignocellulosic waste biomass.

Keywords: sugarcane bagasse, hydrolysates, ABE fermentation, pervaporation, butanol.

Sumário

Ficha Catalográfica **4**

Agradecimentos **6**

Resumo **9**

Abstract **10**

Sumário **11**

Lista de Tabelas **16**

Lista de Siglas e Abreviaturas **18**

Capítulo 1

Apresentação do Tema de Tese **21**

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica **26**

2.1. Estrutura da biomassa lignocelulósica 27

2.1.1. Celulose 28

2.1.2. Hemicelulose 28

2.1.3. Lignina 29

2.1.4. Extrativos e cinzas 31

2.2. Processos de fracionamento da biomassa lignocelulósica 32

2.2.1. Tipos de pré-tratamento da biomassa 33

2.2.2. Hidrólise enzimática 34

2.3. Histórico da fermentação ABE: da descoberta à Biorrefinaria 38

2.4. Fermentação ABE 40

2.5. Propriedades e aplicações do butanol 44

2.6. Uso da pervaporação para recuperação dos solventes 46

2.7. Mercado e rotas tecnológicas de produção do butanol 48

2.8. Produção de cana-de-açúcar, bagaço e estimativa do potencial de produção de biobutanol no Brasil 55

2.9. Considerações gerais 56

Capítulo 3

Justificativa e Objetivos 58

3.1. Objetivo Geral 59

3.2. Objetivos Específicos 59

Capítulo 4

Materiais e Métodos 60

4.1. Microrganismo 61

4.2. Ativação e propagação do microrganismo e meios de cultura empregados 63

4.3. Planejamentos de experimento para a otimização do meio de propagação 64

4.4. Propagação em biorreator 68

4.5. Obtenção dos hidrolisados lignocelulósicos 69

4.6. Fermentações ABE 70

4.6.1. Fermentação com meios quimicamente complexos 70

4.6.2. Fermentação com os hidrolisados 72

4.6.3. Cálculo dos parâmetros de bioprocessos 72

4.7. Processo de pervaporação para recuperação de solventes 73

4.8. Avaliações analíticas 74

4.8.1. Análise dos carboidratos, ácidos orgânicos e solventes 74

4.8.2. Análise de polifenóis totais 76

4.8.3. Análise da concentração celular 77

4.9. Avaliação estatística 79

Capítulo 5

Resultados e Discussão 80

5.1. Perfil de crescimento e calibração para análise de concentração celular 80

5.2. Primeiro delineamento experimental-PB12 82

5.2.1. Análise dos efeitos com relação à concentração celular 86

5.2.1. Análise dos efeitos com relação ao consumo de xilose 87

5.2.2. Análise dos efeitos com relação ao consumo de glicose 92

5.2.3. Análise dos efeitos com relação à produção de ácido acético 92

5.2.4. Análise dos efeitos com relação à produção de ácido butírico 92
5.3. Segundo delineamento experimental – DCCR 94
5.4. Validação das condições otimizadas 97
5.5. Ensaios de fermentação com meios quimicamente complexos 99
5.6. Caracterização e fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos 103
5.6.1. Hidrolisado hemicelulósico (HH C5) 103
5.6.2. Hidrolisado celulósico (HC C6) 105
5.6.3. Hidrolisado HC C5+C6 108
5.6.4. Estudo da necessidade de adição de nutrientes para a etapa fermentativa 111
5.2. Aplicação da pervaporação para a recuperação de butanol 117
Conclusões
6.1. Conclusões 126
6.2. Propostas para trabalhos futuros 129

Lista de Figuras

Figura 1: Unidades de monolignóis de lignina. 1: álcool p-cumarílico; 2: álcool coniferílico; 3: álcool sinapílico. Fonte: Buranov & Mazza (2008). 29

Figura 2: Complexo lignina/fenólico-carboidrato. Fonte: Buranov et al. (2008). 30

Figura 3: Reações entre os carboidratos (xilose e glicose) e o ácido presente na etapa de pré-tratamento do bagaço, com geração dos furanos. (A) Formação de Furfural pela desidratação da xilose. (B) Formação de 5-HMF pela desidratação da glicose. Fonte: Gomes (2009) 37

Figura 4: Estruturas químicas dos compostos fenólicos, ácido ferúlico e ácido p-cumárico, presentes na lignina do bagaço de cana-de-açúcar. Fonte: PubChem (2019). 37

Figura 5: Representação esquemática de obtenção microbiana de produtos químicos a partir de fontes renováveis, dentro do conceito de Biorrefinaria. Fonte: Sauer (2016). 40

Figura 6: Diagrama esquemático simplificado da rota metabólica de Clostridium sp. para conversão de açúcares a acetona, etanol e butanol. Fonte: Kumar et al. (2011). 41

Figura 7: Consumo global de butanol por finalidade. Fonte: Nexant (2013). 48

Figura 8: Consumo global de butanol por região. Fonte: Nexant (2013). 49

Figura 9: Preços do barril de petróleo de 2010 a 2019. Fonte: Investing.com (2019). 52

Figura 10: Etapas de produção de biobutanol que estão sendo desenvolvidas em escala piloto através do Projeto ButaNext, da empresa Green Biologics. Fonte: ButaNext (2019). 53

Figura 11: Fluxograma simplificado do processo de produção fermentativa ABE. 54

Figura 12: Fotografia de microscópio ótico da cepa de Clostridium acetobutylicum DSM 6228. ... 61

Figura 13: Etapas de ativação e propagação de Clostridium acetobutylicum em frasco. 63

Figura 14: Etapas para a propagação de Clostridium acetobutylicum em biorreator. 69

Figura 15: Esquema das estratégias de fracionamento do bagaço para a produção de hidrolisados das frações hemicelulósica (C5) e celulósica (C6). 70

Figura 16: Etapas de pré-ativação e ativação (em frascos), propagação e fermentação (em biorreator) 72

Figura 17: Fluxograma simplificado da unidade de PV para recirculação do meio com dois módulos de membrana em série. 74

Figura 18: Sistema cromatográfico utilizado para a quantificação dos substratos, ácidos orgânicos e solventes 75

Figura 19: Cromatograma típico de uma solução contendo os açúcares (glicose e xilose), ácidos orgânicos (lático, acético e butírico) e solventes (acetona, etanol e butanol). 76

Figura 20: Curva de calibração para determinação da concentração celular de Clostridium acetobutylicum durante os ensaios. 79

Figura 21: Crescimento de Clostridium acetobutylicum em meio RCM, em biorreator de 1,3L. Condições: Temperatura de 37°C e agitação de 50 rpm. 81

Figura 22: Curva de crescimento celular e determinação de □.....81

Figura 23: Cinética da etapa de propagação celular do ensaios do ponto central. Os valores são resultados das médias das concentrações celulares em cada tempo.....84

Figura 24: Perfis cinéticos dos ensaios do ponto central quanto à formação de ácido acético e ácido butírico.....86

Figura 25: Curvas de contorno para a variável de resposta concentração celular (em g/L) em função de glicose, extrato de levedura e peptona (também em g/L).....96

Figura 26: Perfis cinéticos das médias de concentração celular dos ensaios em triplicata de propagação com o meio otimizado e com o meio comercial para validação. 97

Figura 27: Cinética de fermentação ABE, tendo glicose como substrato em meio quimicamente complexo. Composição do meio conforme Tabela 15. Temperatura: 37°C e 50 rpm em biorreator de 1L. 100

Figura 28: Cinética de fermentação ABE, tendo xilose como substrato em meio quimicamente complexo. Composição do meio conforme Tabela 15. Temperatura: 37°C e 50 rpm em biorreator de 1L. 101

Figura 29: Cinética de fermentação ABE de hidrolisado HC C6. Temperatura: 37°C e 50 rpm, em biorreator de 1L.....107

Figura 30: Cinética de fermentação ABE de hidrolisado HC C5+C6. Temperatura: 37°C e 50 rpm, em biorreator de 1L. 110

Figura 31: Cinéticas da fermentação ABE de hidrolisado HC C5+C6 com aporte de nutrientes (em preto) e sem (vermelho). Temperatura: 37°C e 50 rpm, em biorreator de 1L. 113

Figura 32: Fermentação ABE de hidrolisado HC C5+C6, com aplicação de pervaporação. (1) Biorreator de 3,6L; (2) Sistema de controle do biorreator; (3) Bomba de recirculação do meio fermentativo; (4) Células planas de silicone; (5) Unidade de vácuo; (6) Cristalizador. 118

Figura 33: Cinética de fermentação ABE de hidrolisado HC C5+C6, com aplicação da pervaporação após 16h do início do processo (linha hachurada). As linhas em vermelho representam as concentrações de butanol e acetona no permeado. Temperatura: 37°C e 50 rpm, em biorreator de 3,6L. 119

Figura 34: Membranas de silicone utilizadas em série no ensaio de pervaporação na fermentação ABE de hidrolisado HC C5+C6 ao final de 30 horas de utilização. (a) primeira célula; (b) segunda célula. 121

Figura 35: Perfil do fluxo permeado total da PV com o tempo. 122

Figura 36: Perfis do fluxo permeado de butanol e acetona com o tempo. 122

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição química aproximada do bagaço de cana-de-açúcar. Fonte: Szczerbowski et al. (2014). *27*

Tabela 2: Composição química de bagaço de cana-de-açúcar do interlaboratorial entre as instituições brasileiras e o NREL. Fonte: Sluiter et al. (2016). *32*

Tabela 3: Características dos diferentes pré-tratamentos aplicados em materiais lignocelulósicos. Fonte: Alvira et al. (2010). *33*

Tabela 4: Enzimas celulolíticas e modo de atuação das mesmas em um sistema cooperativo na degradação da celulose. Fonte: Barcelos (2011). *35*

Tabela 5: Produção de butanol a partir de glicose de xilose por espécies do gênero Clostridium. Fonte: Bramono et al. (2011). *44*

Tabela 6: Propriedades físico-químicas do butanol. Fonte: PubChem (2019). *45*

Tabela 7: Propriedades de combustíveis. Fonte: Fournier et al. (2016). *45*

Tabela 8: Capacidade instalada das empresas produtoras de butanol por continente. *50*

Tabela 9: Empresas chinesas que produzem biobutanol em escala comercial. Fonte: Natalense (2013). *51*

Tabela 10: Balança comercial brasileira de butanol. Fonte: MDIC (2019). *56*

Tabela 11: Composição do meio de ativação BHI *62*

Tabela 12: Composição do meio RCM comercial, do fornecedor Acumedia. Fonte: Lu et al. (2013). *62*

Tabela 13: Limites de cada variável estudada no planejamento de experimentos PB12. ..... *65*

Tabela 14: Matriz completa PB12 com 12 ensaios, 3 pontos centrais e 2 controles. PP: Peptona; E: Extrato de levedura; Cist: Cisteína; AS: Acetato de sódio. *66*

Tabela 15: Matriz do planejamento fatorial completo DCCR. *67*

Tabela 16: Meios A, B, C e D preparados em frascos de penicilina e esterilizados separadamente. Fonte: Sun & Liu (2012). *71*

Tabela 17: Diluições da suspensão para leituras de absorvância em comprimento de onda de 600 nm *78*

Tabela 18: Resultados de concentração celular do primeiro planejamento de experimentos, PB12. C1 e C2 são ensaios controle. PP: peptona, EL: extrato de levedura, Cist: cisteína e AS: Acetato de sódio. As informações do ponto central estão em negrito. A coluna em amarelo indica as concentrações máximas obtidas na maioria dos ensaios. *83*

Tabela 19: Consumo de glicose e xilose em cada ensaio do PB12, em base mássica, calculado pela razão entre a diferença de concentração entre os tempos 12 h e 0 h e a concentração no tempo inicial. *85*

Tabela 20: Efeito da concentração celular (a) e xilose (b) na etapa de propagação em função do tempo a 90% de confiança. Em vermelho são os efeitos estatisticamente significativos (p-valor < 0,10). *89*

Tabela 21: Efeito da concentração de glicose (a) e ácido acético (b) na etapa de propagação em função do tempo a 90% de confiança. Em vermelho são os efeitos estatisticamente significativos (p-valor < 0,10). 90

Tabela 22: Efeito da concentração de ácido butírico na etapa de propagação em função do tempo a 90% de confiança. Em vermelho são os efeitos estatisticamente significativos (p-valor < 0,10). 91

Tabela 23: Respostas obtidas no planejamento PB12 e condições propostas para cada variável para o planejamento DCCR. 93

Tabela 24: Condições dos ensaios do DCCR e concentração celular avaliada em função do tempo. PP: Peptona; EL: Extrato de levedura e Gli: Glicose..... 95

Tabela 25: Resultados de concentração celular, em g/L, dos ensaios de validação. 97

Tabela 26: Resultados das médias, desvios padrão e valor predito pelo modelo para comparação – concentração celular (g/L) em 12h..... 98

Tabela 27: Comparação dos custos para o preparo de 1 litro de meio de propagação usando o meio comercial RCM e o otimizado..... 99

Tabela 28: Comparação dos resultados obtidos neste trabalho (colunas em azul) com a literatura. As colunas A, B e C referem-se ao uso de glicose; assim como as colunas D e E referem-se ao uso de xilose. 102

Tabela 29: Análise composicional do hidrolisado hemicelulósico HH C5. 103

Tabela 30: Análise composicional do hidrolisado HC C6..... 105

Tabela 31: Análise composicional do hidrolisado HC C5+C6. 108

Tabela 32: Comparação entre a demanda de cátions e ânions como nutrientes para a etapa de fermentação entre os dados de literatura (Sun & Liu, 2012 e Monot et al., 1982) e a composição real nos hidrolisados HC C6 e HC C5+C6 (em mg/L), considerando a diluição. 112

Tabela 33: Comparação entre dados da literatura com os resultados obtidos no presente trabalho para a fermentação ABE de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar. 116

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABE: Acetona-Butanol-Etanol;

ABIQUIM: Associação Brasileira da Indústria Química;

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas;

Acetil-CoA: Acetil Coenzima A;

AFEX: **A**mmonia **F**iber **Ex**pansion;

ANOVA: Análise de Variância;

ATP: Adenosina Trifosfato;

°C: graus Celsius;

CBM: Carbohydrate-Binding Module;

CENPES: Centro de Pesquisas da Petrobras S.A.;

CGGE: Centro de Estudos Estratégicos;

CO: Monóxido de Carbono;

CO_2: Dióxido de Carbono;

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento;

CONIMIX: Misturador/Reator em formato de cone;

CTBE: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol;

CTC: Centro de Tecnologia Canavieira;

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional;

DDGS: *Dried Distiller's Grains with Solubles*;

DSMZ: Deutsche Sammulung von Mikroorganismen und Zellkulturen;

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;

$FeSO_4.7H_2O$: Sulfato Ferroso Heptahidratado;

FOB: Free On Board;

g: grama;

h: hora;

ha: hectare;

H_2: Hidrogênio;

HCl: Ácido Clorídrico;

HH C5: Hidrolisado Hemicelulósico – Fração rica em pentoses;

HC C6: Hidrolisado Celulósico – Fração rica em hexoses;

HC C5+C6: Hidrolisado Hemicelulósico e Celulósico – Fração rica em pentose e hexoses;

5-HMF: 5-Hidroximetilfurfural;

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*;

IBP: Instituto Brasileiro de Petróleo;

INPI: Instituto Nacional de Propriedade Industrial;

IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares;

Kg: Quilograma;

KH_2PO_4: Dihidrogenofosfato de Potássio;

K_2HPO_4: Hidrogenofosfato de Potássio;

kL: Quilolitro;

KPa: Quilo Pascal;

L: Litro;

LPMO: Lytic polyssacharide monooxygesases;

mg: miligrama;

$MgSO_4$: Sulfato de Magnésio;

min: minuto;

MJ: Mega Joule;

mL: mililitro;

mm: milímetro;

%m/m: Relação massa/massa;

$MnSO_4$: Sulfato de Manganês;

MSR: Metodologia de Superfície de Resposta;

%m/v: Relação massa /volume;

NaCl: Cloreto de Sódio;

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo;

NBR: Norma Brasileira

NH_4OH: Hidróxido de Amônio;

nm: nanômetro;

NREL: National Renewable Energy Laboratory;

OD_{600}: Densidade Ótica a 600 nm de comprimento de onda;

OGM: Organismos geneticamente modificados;

PB: Plackett & Burman;

pH: potencial hidrogeniônico;

PI: Propriedade Intelectual;

PVC: Poli (Cloreto de Vinila);

PVDF: Fluoreto de polivinilideno;

Q_P: Produtividade volumétrica;

R^2: Coeficiente de determinação;

RCM: Reinforced *Clostridium* Media;

RID: Refractive Index Detector (detector de índice de refração);

rpm: rotação por minuto;

SAP: super absorbent polymers;

SHF: *Separate Hydrolysis and Fermentation*;

SSCF: *Simultaneuous Saccharification and Co-Fermentation;*

SSF: *Simultaneous Saccharification and Fermentation;*

ton: toneladas;

US$: Dólar americano

%v/v: Relação volume/volume;

X: Concentração de células.

$Y_{P/S}$: Rendimento de produto formado (P) por substrato (S) consumido, em massa;

Φ: diâmetro de partícula, mm;

α: alfa;

λ: comprimento de onda, nm.

Capítulo 1

Apresentação do Tema de Tese

A demanda por combustíveis e produtos químicos alternativos e sustentáveis, baseados em fontes renováveis já é uma realidade nos dias atuais e tende a aumentar drasticamente no futuro (Pachapur *et al.*, 2016). Hoje a indústria de biocombustíveis produz primordialmente etanol de milho ou cana-de-açúcar e biodiesel, originado de óleos vegetais e gorduras animais. No entanto, a produção destes biocombustíveis a partir das matérias primas citadas, podem competir com a produção de alimentos para a humanidade e também para os animais. Em contraste com esta realidade, a biomassa lignocelulósica (resíduos agrícolas e de florestas) oferece um enorme potencial como fonte para produção de biocombustíveis e químicos porque é o material mais abundante no mundo, além de ser um subproduto da produção de alimentos (WEBER *et al.*, 2010).

No Brasil, alguns setores se destacam pelo uso das biomassas: o de celulose e papel, alimentos e o sucroalcooleiro. Este último setor se sobressai aos demais por ser o responsável pela geração de centenas de milhões de toneladas de biomassa anualmente, como bagaço e palha de cana-de-açúcar (CONAB, 2019). Cabe ressaltar que grande parte das inovações tecnológicas introduzidas na indústria sucroalcooleira esteve focada, durante muitos anos, na base agrícola, como o melhoramento de variedades de cana, mecanização de colheitas, defensivos agrícolas, fertilizantes químicos e outros produtos. Desta forma, a base agroindustrial, que compreende as etapas de processamento da cana, sua transformação e as operações adjacentes, ficou carente de incentivos e de esforços em pesquisa, desenvolvimento e inovação, aliados à restrita capacidade empreendedora dos meios acadêmicos.

Em décadas mais recentes, surgiu um movimento em busca de novas formas de energia a partir das biomassas em que os biocombustíveis lideraram e ainda lideram a busca por inovações. Neste contexto, o etanol ganhou *status* de prioridade e, especialmente no Brasil, este biocombustível tem uma participação expressiva na matriz energética. No entanto, a indústria brasileira do etanol está fortemente atrelada à do petróleo, pois a formulação da gasolina nos postos requer grande concentração de álcool em sua composição. Logo, o setor sucroalcooleiro se tornou bastante dependente das políticas de produção e de precificação da gasolina, o que geralmente não atende às suas necessidades. É importante enfatizar que hoje o setor passa por uma crise que poderá definir os rumos de suas atividades no país. A crise é causada pelo alto endividamento do setor sucroenergético, pelos efeitos de fenômenos climáticos nas últimas safras e uma alta do preço internacional do açúcar que desloca uma boa parte da produção de etanol (Notícias Agrícolas, 2016). Assim sendo, as biomassas residuais de composição lignocelulósica ganharam um status prioritário no desenvolvimento de tecnologias alternativas, já que são as fontes de carboidratos mais abundantes na natureza. Um fato que corrobora esta decisão é que somente no Brasil, os principais setores da agricultura geram, aproximadamente, 350 milhões de toneladas destas biomassas, sendo que destas cerca de 20% se encontram disponíveis para utilização (CGGE, 2010).

Outro fato é que estas biomassas são geralmente resíduos subutilizados pela indústria. Pesquisas acadêmicas demonstram um enorme potencial para aplicação em

diversos campos e a esta amplitude de possibilidades, convencionou-se chamar de Biorrefinaria, cujo conceito busca pela construção de sistemas integrados para a produção de compostos químicos, alimentos e energia (CGGE, 2010).

Os açúcares oriundos de resíduos lignocelulósicos abrem possibilidades importantes para o segmento industrial, não só para produção de biocombustíveis como também para suprir o setor químico industrial.

O Brasil é um país privilegiado, com abundantes e diversificadas biomassas lignocelulósicas, como os já citados bagaço e palha de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), além de eucalipto (*Eucalyptus sp.*), resíduos de arroz (*Oryza sp.*), capim (*Pennisetum purpureum*), sorgo (*Sorghum bicolor*), dentre outros. A riqueza destas biomassas está em possuir entre 50 e 80% do conteúdo seco constituído de açúcares que podem ser fermentados por diversos microrganismos.

Nas últimas décadas, observa-se um aumento da produção de produtos por microrganismos visando a obtenção de moléculas de alto valor no mercado e, paralelamente, a busca de substratos baratos e ambientalmente amigáveis que possam viabilizar o processo biotecnológico. Neste contexto, fermentações tradicionais como a produção de acetona, butanol e etanol, chamada de fermentação ABE, voltam ao mercado, agregando novas tecnologias de engenharias de bioprocessos, genética e metabólica (NEXANT, 2013).

O butanol é o principal metabólito proveniente da fermentação ABE produzido pelas bactérias do gênero *Clostridium*, seguido de acetona e etanol. A literatura apresenta vários estudos fermentativos baseados em microrganismos selvagens ou modificados geneticamente para a obtenção de acetona, butanol e etanol. A produção de butanol através do processo fermentativo com estirpes de *Clostridium* apresenta valores de concentração deste bioproduto que variam de 0,002 a 18 g/L, utilizando-se diferentes matérias primas lignocelulósicas, sacaríneas e amiláceas, além de glicerina, biomassa de algas e gás de síntese (*syngas*) (Jang *et al.*, 2012; Dürre, 2011). As maiores concentrações de butanol encontradas são provenientes de matérias primas lignocelulósicas destoxificadas, ou seja, que após o pré-tratamento, são submetidas a processos de remoção dos inibidores como 5-HMF (5-hidroximetilfurfural), furfural e ácidos fenólicos. (Jang *et al.*, 2012).

O aproveitamento dos açúcares dos resíduos lignocelulósicos para a obtenção de butanol e consequentemente acetona e etanol pela fermentação ABE apresentam alguns fatores que necessitam ser mais bem estudados como o efeito dos inibidores citados no processo fermentativo, o efeito inibidor do produto ao microrganismo, a composição do meio de cultivo para crescimento e fermentação, alternativas para recuperação do produto e aumento da produtividade do processo, haja visto que os produtos gerados são em concentrações muito baixas.

O presente trabalho visa estudar o processo fermentativo ABE para produção de butanol a partir de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar (ricos em açúcares glicose e xilose e em presença de inibidores como furfurais e polifenóis) e avaliar o comportamento do microrganismo *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228 como agente produtor, procurando superar os gargalos apresentados acima, a fim de apontar um futuro na aplicação biotecnológica industrial deste processo.

Para proporcionar uma exposição mais ordenada, o presente trabalho foi dividido em mais cinco capítulos, além desta apresentação do tema da tese. O Capítulo 2 apresenta a revisão bibliográfica que consta do conhecimento da estrutura da biomassa utilizada, os processos de fracionamento do material lignocelulósico para a obtenção dos açúcares, o histórico e as propriedades da fermentação ABE, bem como a abordagem do uso da pervaporação para a recuperação dos produtos. Em seguida, são apresentadas as propriedades e aplicações do butanol, as informações de mercado, bem como das rotas tecnológicas utilizadas no mundo para a produção e recuperação do produto. Este capítulo termina com uma estimativa do potencial da produção brasileira de butanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar e ordem de grandeza do volume financeiro associado.

O Capítulo 3 apresenta a justificativa, o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho, enquanto que no Capítulo 4 são descritos os materiais e as metodologias empregadas.

No Capítulo 5 estão apresentados os resultados dos ensaios experimentais, bem como as discussões referentes, comparando-os com os apresentados na literatura. As conclusões e um conjunto de sugestões para a continuação do trabalho estão descritos no Capítulo 6.

Ao longo deste trabalho foram publicados dois artigos científicos e realizados dois depósitos de patente. A seguir são citadas as produções científicas, que estão impressas no **ANEXO**.

 # Artigo 1:

GOMES, A.C; RODRIGUES, M. I; PASSOS, D. F.; CASTRO, A. M.; SANTA ANNA, L. M. M.; PEREIRA JR., N. (2019) Acetone-butanol-ethanol fermentation from sugarcane bagasse hydrolysates: utilization of C5 and C6 sugars. **Eletronic Journal of Biotechnology**, *in press*.

 # Artigo 2:

SLUITER, J.; CHUM, H.; GOMES, A.C; TAVARES, R.P.A.; AZEVEDO, V. PIMENTA, M.T.B.; RABELO, S. C.; MARABEZI, K.; CURVELO, A.A.S; ALVES, A.R.; GARCIA, W. T.; CARVALHO, W.; ESTEVES, P. J.; MENDONÇA, S.; OLIVEIRA, P. A.; RIBEIRO, J.A.A.; MENDES, T. D.; VINCENTIN, M. P.; DUARTE, C. L.; MORI, M. N. (2016) Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study. **Journal of Analytical Science**, v. 99, p. 579-585.

 # Patente 1:

BR 10 2014 024610-0 : Produção de solventes a partir de hidrolisado de biomassa lignocelulósica

Inventores: Absai da Conceição Gomes, Nei Pereira Jr., Lidia Maria Melo Santa Anna, Carolina Araújo Barcelos, Ana Paula Rodrigues Torres.

Data de depósito: 02/10/2014

Data de publicação: 26/04/2016

 # Patente 2:

BR 10 2018 070289-0 : Uso de processo com membranas para a recuperação e purificação de solventes redução da inibição celular em fermentação ABE de açúcares lignocelulósicos

Inventores: Absai da Conceição Gomes, Nei Pereira Jr., Lidia Maria Melo Santa Anna, Gisele Mattedi, Cristiano Piacsek Borges, Frederico de Araujo Kronemberger, Ana Paula Rodrigues Torres.

Data de depósito: 02/10/2018

Mês previsto para publicação: abril/2020

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo é apresentada a composição da estrutura dos materiais lignocelulósicos e as diferentes formas de fracionamento da biomassa. Em seguida é descrito um breve histórico da fermentação ABE desde o seu surgimento até aos dias atuais, culminando na abordagem do conceito de Biorrefinaria. Posteriormente são discorridas as características da fermentação ABE do ponto de vista bioquímico e como um bioprocesso. Neste contexto, é também discutido o uso da pervaporação como técnica para a recuperação de produtos.

As propriedades do butanol e suas aplicações no mercado, as principais rotas tecnológicas de produção, incluindo o mapeamento do consumo global do produto por continente são abordados a seguir. Também é citada a capacidade instalada das empresas produtoras no mundo, tanto pela rota petroquímica, quanto pela fermentativa, bem como

os investimentos em pesquisa e desenvolvimento para escalonamento do processo biotecnológico.

No final é estimado o potencial de produção de biobutanol no Brasil, considerando o bagaço excedente da produção anual de cana-de-açúcar no país e a previsão do volume financeiro associado à produção.

2.1. Estrutura da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é tipicamente um material vegetal não comestível, composto primariamente de celulose e hemicelulose. O terceiro maior componente é a lignina, um polímero fenólico que provê estrutura e firmeza à planta. Como exemplos de biomassa lignocelulósica podem ser citados palha de milho, palha de trigo, resíduos de madeira, capim, sorgo e bagaço de cana-de-açúcar, dentre outros. (Sluiter *et al.*, 2010). Além dos compostos majoritários citados, a biomassa possui em menores proporções extrativos e materiais inorgânicos (Sjöström, 1993).

Todos estes componentes formam uma mistura complexa e compacta, cujas características dependerão do tipo de material processado (Carvalho, 2007), bem como do vegetal de origem, da região de cultivo, idade e período do ano em que se realiza a colheita, dentre outros (Hassuani, 2005). A **Tabela 1** apresenta os teores médios de cada um desses componentes no bagaço de cana-de-açúcar, biomassa utilizada neste trabalho.

Tabela 1: Composição química aproximada do bagaço de cana-de-açúcar. Fonte: Szczerbowski *et al.* (2014).

Componente	**Teor (% m/m)**
Celulose	33.6 – 55,2
Hemicelulose	16,8 – 31.1
Lignina	17,1 – 25,8
Cinzas	0,7 – 7,9
Extrativos	1,6 – 9,2

Observa-se que o bagaço de cana-de-açúcar é composto de 50 a 80% de carboidratos (celulose mais hemicelulose), caracterizando-se como uma fonte para produção de biocombustíveis (como etanol e butanol por exemplo), produtos químicos verdes e energia (Sluiter *et al.*, 2010), sendo o conhecimento da estrutura fundamental para a aplicação da estratégia correta de fracionamento da biomassa para o aproveitamento dos açúcares, com foco na produção do produto de interesse.

2.1.1. Celulose

A celulose é um homo polissacarídeo linear formado por unidades de β-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β-1,4. Sua estrutura apresenta entre 8.000 e 14.000 unidades de glicose, apresentando uma massa molecular aproximada de 2,3 milhões de unidades de massa atômica (Shleser, 1994). Além disso, as moléculas formam entre si ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares.

As cadeias de celulose agregam-se para a formação das fibrilas, que apresentam áreas cristalinas e amorfas. A dificuldade de rompimento da estrutura celulósica está relacionada à distribuição e configuração destas duas áreas, bem como a sua associação com outros polímeros que a protegem, tais como a lignina e a hemicelulose, bem como compostos inorgânicos. As diferentes formas da celulose (cristalina e amorfa) também são definidas como glucana (Gomes, 2009).

2.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é uma estrutura de carboidrato complexa que consiste de diferentes polímeros de pentoses como xilose (xilana) e arabinose (arabinana), de hexoses como manose (manana), glicose (glucana) e galactose (galactana), além de ácidos urônicos e ácido acético (Hendriks *et al.*, 2009).

O componente predominante da hemicelulose de *hardwoods* (angiospermas) é a xilana, enquanto que *softwoods* (gimnospermas) têm predominância de glucomananas. A hemicelulose tem uma massa molecular menor do que a celulose e ramificações com

cadeias laterais curtas que consistem de diferentes açúcares que são mais fáceis de hidrolisar. A hemicelulose serve como conexão entre a lignina e as fibras de celulose e torna o conjunto celulose-hemicelulose-lignina mais rígido (Fengel *et al.*,1984; Saha, 2003).

2.1.3. Lignina

A lignina é a terceira macromolécula mais abundante em vegetais na natureza, depois da celulose e hemicelulose, estando presente na parede celular das espécies vegetais. É um heteropolímero amorfo que consiste de três diferentes unidades básicas de alcoóis aromáticos, os chamados monolignóis (**Figura 1**). São eles: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Buranov & Mazza, 2008).

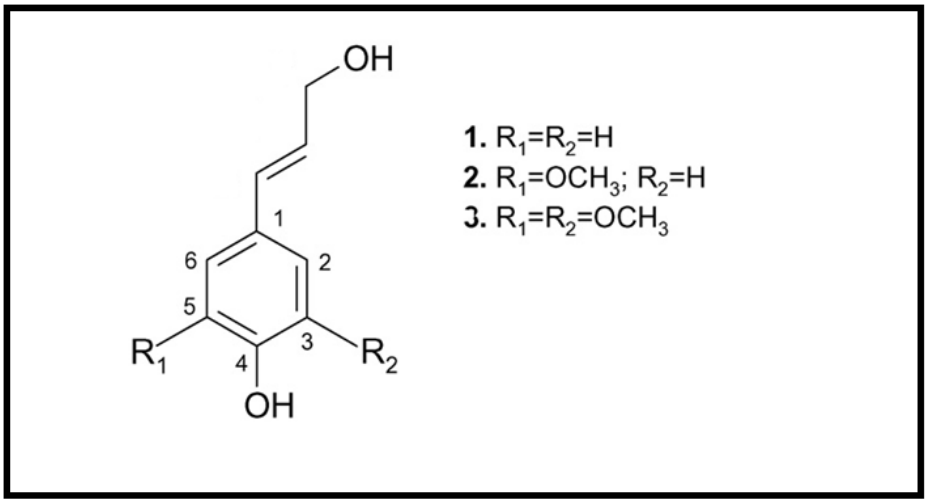


Figura 1: Unidades de monolignóis de lignina. 1: álcool p-cumarílico; 2: álcool coniferílico; 3: álcool sinapílico. Fonte: Buranov & Mazza (2008).

A polimerização oxidativa destes álcoois precursores dá origem a subunidades chamadas p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente. Durante o processo de lignificação, estes monolignóis produzem uma estrutura amorfa tridimensional de lignina por meio de vários tipos de ligações intermoleculares e que não são ordenadas e repetitivas como ocorre na celulose. Este processo de biossíntese consiste de vários acoplamentos de radicais, de maneira que cada espécie de planta possui uma estrutura de lignina específica (Buranov *et al.*, 2008).

A lignina de madeira dura (*hardwood*) contém subunidades G e S, enquanto que a lignina de madeira macia (*softwood*) é exclusivamente composta de derivados do ácido coniferílico (tipo G). Ligninas de gramas e materiais herbáceos contêm resíduos dos três precursores citados (ligninas tipo HGS). O bagaço de cana-de-açúcar, classificado como *non-wood* (Saijonkari-Pahkala, 2001), é reportado como possuindo lignina do tipo HGS, com predominância de unidades de p-hidroxifenil (H) (Ruggiero *et al.*, 2006; Hoareau *et al.*, 2004).

A lignina está sempre associada a carboidratos, principalmente à hemicelulose, via ligações covalentes. Em materiais como bagaço de cana-de-açúcar, os ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico e ácido p-cumárico) fazem a ligação entre a lignina e a hemicelulose por meio de ligações éster e éter, formando os complexos de lignina/fenólicos-carboidrato, como pode ser observado na **Figura 2** (Buranov & Mazza, 2008; Baucher *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2002).

As principais funções da lignina são: dar sustentação à planta, conferir impermeabilidade e oferecer resistência contra os ataques microbianos e *stress* oxidativo. O complexo amorfo também é insolúvel em água. Tudo isso torna a degradação da lignina muito difícil.

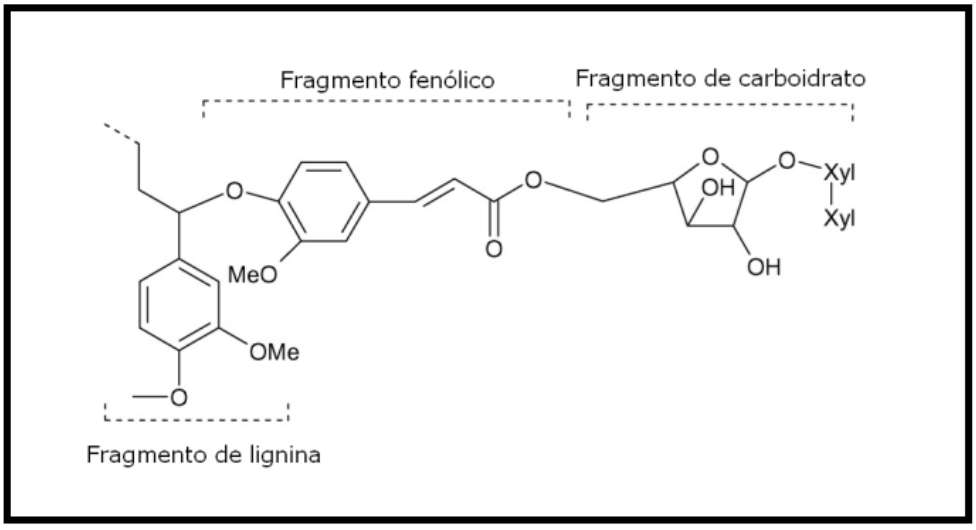


Figura 2: Complexo lignina/fenólico-carboidrato. Fonte: Buranov *et al.* (2008).

2.1.4. Extrativos e cinzas

Além da celulose, hemicelulose e lignina, há outros componentes no material lignocelulósico, tais como extrativos e cinzas. Os extrativos são substâncias que não fazem parte da estrutura química dos materiais lignocelulósicos, ou seja, estão adsorvidos nos interstícios da biomassa (Gomes, 2009). Parte dos extrativos são solúveis em água, como materiais inorgânicos provenientes do solo e/ou fertilizantes, alguns carboidratos não estruturais e também compostos nitrogenados, dentre outros. Outra parte dos extrativos é composta de substâncias hidrofóbicas, como clorofila, graxas, materiais resinosos e outros componentes minoritários (Sluiter *et al.*, 2015). As cinzas são substâncias inorgânicas presentes na biomassa e podem ser de origem estrutural e não estrutural. As cinzas estruturais estão relacionadas aos materiais inorgânicos que são ligados à estrutura química da biomassa, enquanto que as não estruturais podem ser removidas por lavagem ou extração do material e são normalmente oriundas de solo remanescente no material lignocelulósico, ou seja, não fazem parte da composição química da fibra da biomassa (Sluiter *et al.*, 2015).

Foi realizado um interlaboratorial entre diversas instituições brasileiras (dentre elas o Centro de Pesquisas da empresa Petróleo Brasileiro S.A. – CENPES) e o Laboratório de Energias Renováveis dos EUA, o NREL (ver em **Anexos**). O objetivo foi o de avaliar a variabilidade dos resultados da análise composicional de bagaço de cana-de-açúcar entre as instituições que utilizaram metodologias analíticas semelhantes. Houve pouca variação nos resultados gerados das réplicas analíticas dentro das instituições, mas a variabilidade nos resultados de composição foi maior quando se compararam os laboratórios. Retirando-se os *outliers*, chegou-se a uma composição sumária, apresentada na **Tabela 2** (Sluiter *et al.*, 2016).

Tabela 2: Composição química de bagaço de cana-de-açúcar do interlaboratorial entre as instituições brasileiras e o NREL. Fonte: Sluiter *et al.* (2016).

Componente	Teor (% m/m)
Celulose (glucana)	42,3 ± 1,2
Hemicelulose (xilana)	22,3 ± 0,5
Lignina	21,3 ± 0,4
Cinzas	1,5 ± 0,2
Extrativos	6,7 ± 0,6
TOTAL	99,4 ± 2,9

Em 2014 o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), em parceria com IBP (Instituto Brasileiro de Petróleo) convidou algumas instituições como o CENPES, CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol), CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) e EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), para participarem da elaboração de uma norma ABNT de análise composicional de bagaço de cana-de-açúcar, que foi publicada em 10 de outubro de 2016, com o título: ABNT NBR 16550 – Bagaço de cana-de-açúcar – Caracterização química. Com base nesta norma possibilitou-se a determinação dos componentes do bagaço visando estabelecer os rendimentos dos processos de fracionamento da biomassa (ABNT, 2016).

2.2. Processos de fracionamento da biomassa lignocelulósica

Existem vários processos de fracionamento da biomassa para a obtenção dos carboidratos, sendo imprescindível a realização de pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática (Gomes, 2009). O principal objetivo do pré-tratamento é aumentar a acessibilidade da enzima para a etapa posterior de hidrólise enzimática. Há barreiras químicas e físicas causadas pela associação entre os principais componentes da biomassa e que impedem a hidrólise da celulose e hemicelulose a açúcares fermentáveis. Cada tipo de pré-tratamento tem o seu efeito nas frações da biomassa e deve ser selecionado de acordo

com a configuração escolhida, levando em consideração as etapas posteriores de hidrólise enzimática e fermentação (Alvira *et al.*, 2010).

2.2.1. Tipos de pré-tratamento da biomassa

Alvira e colaboradores estudaram diferentes tipos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para obtenção de biocombustível de segunda geração, em especial o etanol (Alvira *et al.*, 2010). A mesma linha de raciocínio foi aplicada para a produção de biobutanol. A **Tabela 3** compara os diferentes tipos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica quanto às vantagens e desvantagens de aplicação.

Tabela 3: Características dos diferentes pré-tratamentos aplicados em materiais lignocelulósicos. Fonte: Alvira *et al.* (2010).

Métodos de pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Biológico	▪ Degrada lignina e hemicelulose ▪ Baixo consumo de energia	▪ Baixa taxa de hidrólise
Moagem	▪ Reduz a cristalinidade da celulose	▪ Alto consumo de energia
Explosão a vapor	▪ Causa transformação da lignina ▪ Causa solubilização da hemicelulose ▪ Baixo custo	▪ Geração de compostos tóxicos ▪ Degradação parcial da lignina
AFEX	▪ Maior rendimento em glicose e hemicelulose em duas etapas ▪ Aumenta a área superficial acessível ▪ Baixa formação de inibidores	▪ Ineficiente para biomassa com alto teor de lignina ▪ Alto custo devido à grande quantidade de amônia
Explosão com CO_2	▪ Aumenta a área superficial acessível ▪ Baixo custo ▪ Não gera compostos tóxicos	▪ Não afeta a lignina e nem hemiceluloses ▪ Requer altas pressões de trabalho
Oxidação a úmido	▪ Remoção eficiente de lignina ▪ Baixa formação de inibidores ▪ Minimiza a demanda energética (processo exotérmico)	▪ Alto custo de oxigênio e catalisador alcalino
Ozonólise	▪ Reduz o conteúdo de lignina ▪ Não gera compostos tóxicos	▪ Alto custo devido à grande quantidade de ozônio demandada
Organosolv	▪ Causa hidrólise da lignina e hemicelulose	▪ Alto custo ▪ Os solventes devem ser drenados e reciclados
Ácido concentrado	▪ Alto rendimento em glicose ▪ Temperatura ambiente	▪ Alto custo de ácido e necessidade de recuperação do mesmo ▪ Problemas de corrosão no reator ▪ Formação de inibidores
Ácido diluído ou autohidrólise	▪ Menos problemas de corrosão do que com ácido concentrado ▪ Menos formação de inibidores	▪ Geração de produtos de degradação ▪ Baixa concentração de açúcares na corrente de saída

Apesar de ter algumas desvantagens como a geração de produtos de degradação e apresentar baixas concentrações de açúcares na corrente de saída, o pré-tratamento com ácido diluído é o que aparece como mais favorável para aplicação industrial, pois utiliza condições operacionais mais brandas e vem sendo utilizado em estudos para uma ampla quantidade de materiais lignocelulósicos, com diferentes tipos de reatores (Alvira *et al.*, 2010; Taherzadeh and Karimi, 2008).

O CENPES, em parceria com a Escola de Química da UFRJ, depositou em 30 de novembro de 2016 uma patente denominada "Processo de produção de etanol a partir do hidrolisado da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar em reator do tipo prensa", de número PI 0605017-4, que posteriormente foi depositada e publicada em diversos outros países, como Argentina, Colômbia, Venezuela, Japão, Canadá, Dinamarca, Suécia, Reino Unido, Índia, China e Estados Unidos, entre os anos de 2007 a 2009. No documento da patente são registradas as condições de pré-tratamento com ácido diluído que foram semelhantes às utilizadas neste trabalho.

2.2.2. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática ou sacarificação é aplicada na biomassa pré-tratada com objetivo de obtenção de açúcares fermentáveis das frações celulósica e hemicelulósica remanescentes. Nesta etapa ocorre a ação de enzimas celulolíticas ou celulases de alta especificidade em três etapas básicas: a primeira é a adsorção das celulases na superfície da celulose, a segunda é a biodespolimerização da celulose a açúcares fermentáveis e, ao final, a terceira é a dessorção das enzimas (Gomes, 2009). Para diminuir o efeito de adsorção improdutiva das enzimas à estrutura da lignina residual na biomassa pré-tratada, o que interfere de forma negativa no mecanismo da catálise enzimática, Gomes utilizou polietilenoglicol (PEG) em quantidades de 5 e 10% em relação à massa seca de bagaço pré-tratado, obtendo um aumento na conversão dos açúcares de 40% com a utilização do polímero como tensoativo (Gomes, 2009).

A segunda etapa é realizada pela ação sinérgica de, pelo menos, três tipos de enzimas: endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidase. Na **Tabela 4** são apresentadas as enzimas e suas formas de atuação no material celulósico.

Tabela 4: Enzimas celulolíticas e modo de atuação das mesmas em um sistema cooperativo na degradação da celulose. Fonte: Barcelos (2011).

Classe	Enzima	Atuação
Endoglucanases	Endo-1,4-D-glucanohidrolase, ou EC 3.2.1.4	Atuam nas regiões de baixa cristalinidade na fibra celulósica, criando cadeias com extremidades livres.
Exoglucanases ou Celobiohidrolases	1,4-β-D-glucano celobiohidrolase ou EC 3.2.1.91	Ligam-se nas extremidades das cadeias e geram principalmente glicose e celobiose.
β-Glucosidases	EC 3.2.1.21	Responsáveis por catalisar a clivagem da celobiose, produzindo duas moléculas de glicose.

A empresa Novozymes, uma das maiores produtoras de enzimas celulásicas do mundo, tem sua matriz localizada na Dinamarca e é líder mundial na produção de enzimas industriais. Desde 2000, a Novozymes S/A faz parte de uma holding, a Novo S/A, que também é composta pela Novo Nordisk S/A. No Brasil, possui uma fábrica, sob a razão social Novozymes Latin America Ltda, em Araucária, na região metropolitana de Curitiba, Paraná, que engloba os setores de produção, comercialização e vendas das enzimas.

O principal mercado da empresa corresponde às enzimas para detergentes (que inclui as celulases). Em 2012 estabeleceu-se uma parceria entre a Novozymes e a empresa *Beta Renewables* para aplicar o produto denominado Cellic® CTec3 na primeira planta em escala comercial de produção de etanol celulósico (Novozymes, 2016). Trata-se de um preparado enzimático contendo, além de celulases, hemicelulases e enzimas acessórias. As enzimas acessórias podem aumentar ainda mais o desempenho do coquetel enzimático, tais como LPMO, swolenina e CBM. As LPMO (mono-oxigenases líticas de polissacarídeos) atuam nas cadeias de celulose mais recalcitrantes, possibilitando a formação de novos terminais para as celobiohidrolases e têm ação oxidativa e não hidrolítica (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010, Hu *et al.*, 2014). As swoleninas provocam um "inchaço" nas fibras, sem liberação de açúcares redutores. São proteínas não hidrolíticas, mas indutoras de amorfogênese, atuando as redes de ligações de hidrogênio de polissacarídeos (Saloheimo *et al.*, 2002, Arantes *et al.*, 2011, Cosgrove, 2000). O módulo de ligação ao carboidrato, CBM (do inglês *carbohydrate-binding module*) tem a principal função orientar e ligar o sítio catalítico da

enzima ao carboidrato e aumentar a concentração da mesma na superfície do substrato (Kim *et al.*, 2014).

O CENPES, em parceria com a UFRJ – Escola de Química, desenvolveu um processo de obtenção de açúcares a partir de materiais lignocelulósicos, depositando uma patente em 18 de outubro de 2010 com o título: "Processo de obtenção de correntes com elevada concentração de açúcares fermentescíveis a partir de materiais lignocelulósicos" no Brasil com o número BR 11 2013 006178-2 e no "*World Intellectual Property Organization*" com o número PCT/BR2010/000334.

Todos os procedimentos para a geração de correntes de hidrolisados contendo os açúcares do bagaço de cana-de-açúcar usados neste trabalho foram baseados nas propriedades intelectuais citadas e foi utilizado o preparado enzimático Cellic®CTec 3 para a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Durante as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática da biomassa, além dos polissacarídeos serem hidrolisados a açúcares solúveis no meio, alguns produtos de degradação dos açúcares, os chamados furanos (5-HMF e furfural), também são formados em função do grau de severidade do pré-tratamento (Gomes,2009). As reações que ocorrem para a geração destes compostos são apresentadas na **Figura 3.**

Além disso, compostos fenólicos, os chamados polifenóis, também são liberados durante esta etapa. Estes últimos são provenientes da lignina, que possui uma fração ácido-solúvel (Sluiter *et al.*, 2015). Em materiais como bagaço de cana-de- açúcar, conforme já mencionado, ácido ferúlico e ácido p-cumárico (**Figura 4**) estão presentes e são os compostos fenólicos majoritários liberados em solução (Buranov *et al.*, 2008).

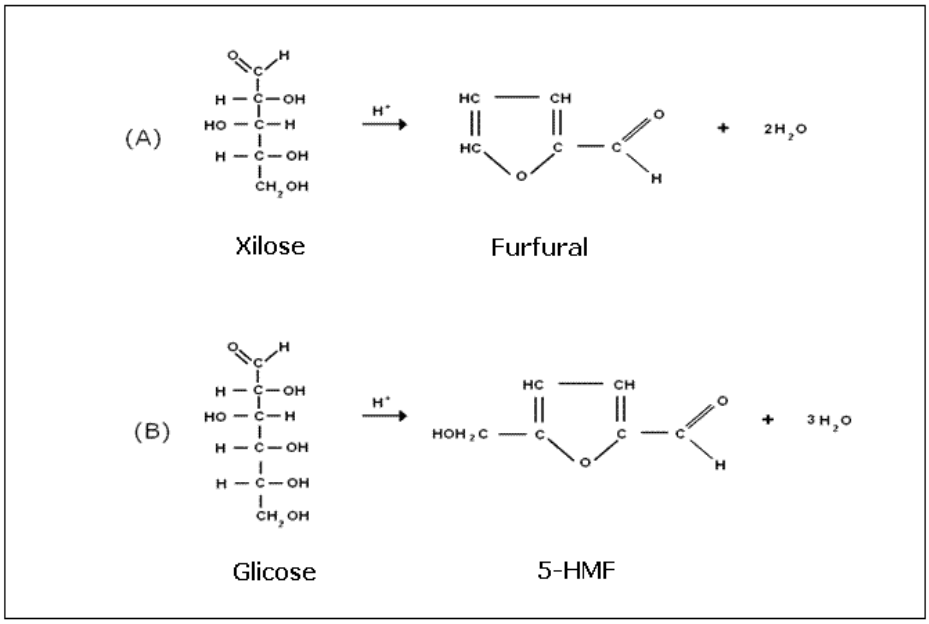


Figura 3: Reações entre os carboidratos (xilose e glicose) e o ácido presente na etapa de pré-tratamento do bagaço, com geração dos furanos. (A) Formação de Furfural pela desidratação da xilose. (B) Formação de 5-HMF pela desidratação da glicose. Fonte: Gomes (2009).

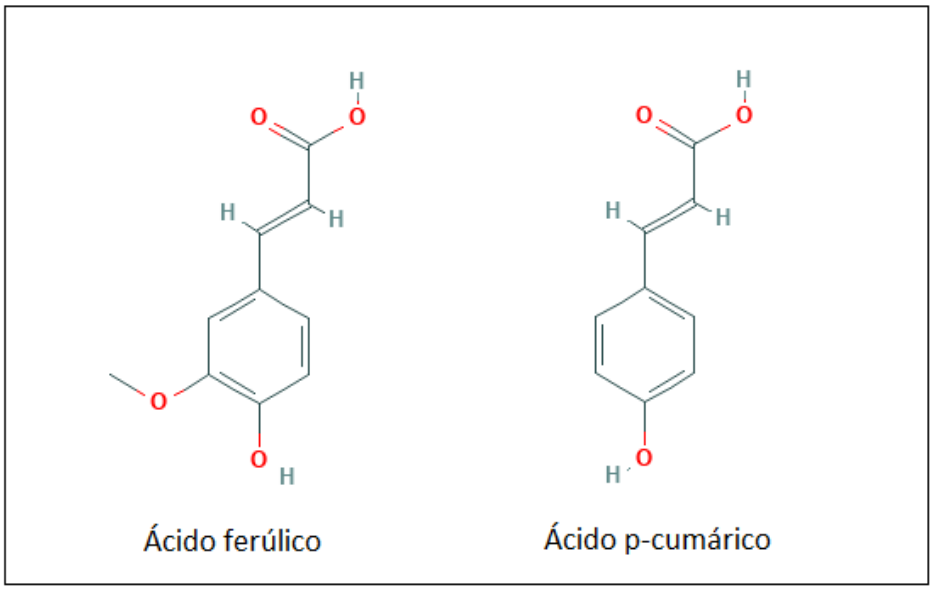


Figura 4: Estruturas químicas dos compostos fenólicos, ácido ferúlico e ácido p-cumárico, presentes na lignina do bagaço de cana-de-açúcar. Fonte: PubChem (2019).

Portanto, é imprescindível monitorar estes compostos para tentar entender os problemas de inibição ocorridos no processo de produção de butanol através da fermentação ABE, causados pela presença significante destas substâncias no meio (Gomes,2009).

2.3. Histórico da fermentação ABE: da descoberta à Biorrefinaria

A rota mais antiga de produção de butanol envolve tecnologia fermentativa, denominada ABE (**A**cetona, **B**utanol e **E**tanol), descoberta por Pasteur em 1862. Por mais que esta fermentação fosse registrada na época, o interesse científico só foi desencadeado no início do século XX, devido à necessidade de produção de borracha sintética. Nesta época, Chaim Weizmann desenvolveu suas pesquisas e patenteou em 1915 o processo fermentativo, com um inóculo capaz de fermentar amido para produzir acetona e butanol. A principal espécie bacteriana do inóculo foi *Clostridium acetobutylicum* e a produção dos solventes em escala industrial foi realizada em plantas de produção fermentativa de etanol a partir de 1916 (Sauer, 2016).

A eclosão da Primeira Guerra Mundial (1914 a 1918) levou a uma alta demanda de acetona para a produção de explosivos à base de nitrocelulose sem emissão de fumaça, conhecido como cordite (Kumar *et al.*, 2011), deslocando o interesse do butanol, considerado à época como sub-produto. Durante a guerra, houve um acúmulo de butanol e após a mesma, o produto tornou-se importante comercialmente, principalmente para a fabricação de tintas automotivas, devido ao aumento da demanda pela expansão da indústria automobilística. O amido foi originalmente a fonte de carbono para a fermentação. No entanto, o melaço tornou-se uma fonte mais barata e disponível em grande quantidade, passando a ser a principal matéria-prima de produção dos solventes.

Durante a Segunda Guerra Mundial (1939 a 1945) a demanda novamente reverteu para a produção de acetona, mas após este período a importância do processo microbiano declinou rapidamente. Uma das fortes razões foi a entrada da Petroquímica no cenário mundial. Esta indústria ganhou escala e importância, sendo a produção de solventes a partir do petróleo muito barata. Outro fato significativo foi o melaço, que passou a ser muito demandado para alimentação de gado, levando a um aumento significativo no preço do substrato (Sauer, 2016).

A produção via fermentação ABE teve um declínio, mas continuou existindo e se desenvolvendo na China e África do Sul entre 1950 e 1960 (Green *et al.*, 2011). A tecnologia fermentativa deixou de existir no continente africano em 1983 e na China esse episódio ocorreu em 2004, quando a última planta convencional ABE fechou as portas.

Desde a década de 90, com o contínuo aumento do custo do petróleo, pesquisadores investigaram possíveis melhorias na rota fermentativa ABE, através do emprego das técnicas de engenharia genética, reatores fermentativos mais produtivos e novas técnicas de recuperação do solvente do meio fermentativo. Novas cepas de bactérias do gênero *Clostridium* demonstraram eficiência na conversão de amido em acetona e butanol.

A fermentação ABE tradicional atingiu produção muito significativa na China com 30 plantas e 170.000 ton de produção anual. Durante os anos de 1990, contudo, foi levada ao declínio devido à concorrência com a rota petroquímica. O país iniciou uma nova rodada de pesquisa sobre fermentação em processos contínuos para aumentar a produtividade e permitir maior competitividade da rota fermentativa (Natalense, 2013). O retorno dos investimentos na China se deu entre 2005 e 2008 com construção de várias plantas e, devido à crise econômica a partir de 2009, o processo ABE não se tornou econômico e a capacidade remanescente chinesa de produção novamente entrou em declínio. Das onze plantas em operação na China em 2008 apenas três continuaram operacionais em 2010 (Nexant, 2013).

Atualmente, a fermentação ABE tem ganhado bastante interesse novamente, devido às questões de sustentabilidade, ou seja, a necessidade de substituir as fontes fósseis por renováveis, diminuir as pegadas de carbono e evitar o uso de substância tóxicas o quanto possível (Jenkins *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2013). Estes aspectos reforçam a aplicação do conceito de Biorrefinaria, cujo fundamento é semelhante ao que representa a refinaria de petróleo e contradiz o raciocínio de sobreposição de cadeias de produção, que pressupõe a separação total de áreas. O conceito de Biorrefinaria busca pela construção de sistemas integrados para a produção de compostos químicos, alimentos e energia (CGEE, 2010) com utilização de material biológico em oposição ao petróleo e outras fontes fósseis. A **Figura 5** ilustra de maneira geral o conceito de produção de químicos em Biorrefinarias.

Nas Biorrefinarias, uma fonte renovável, que pode ser biomassa ou resíduo, é convertida a uma corrente de substrato favorável à conversão microbiana. Em seguida, o substrato é convertido ao produto escolhido, através de um bioprocesso, que passa posteriormente por uma etapa de purificação, antes de se transformar em produto de mercado (Sauer, 2016). Mesmo que o bioprocesso seja a parte central da Biorrefinaria, o preço dos químicos ou combustíveis produzidos é o que decidirá o sucesso ou fracasso da

rota escolhida. Neste contexto, os custos relacionados à obtenção dos substratos e à purificação dos produtos são essenciais para a viabilização econômica do processo. Assim, esforços para a melhoria não apenas no processo fermentativo, mas em todas as etapas da cadeia são fundamentais (Porro *et al.*, 2014).

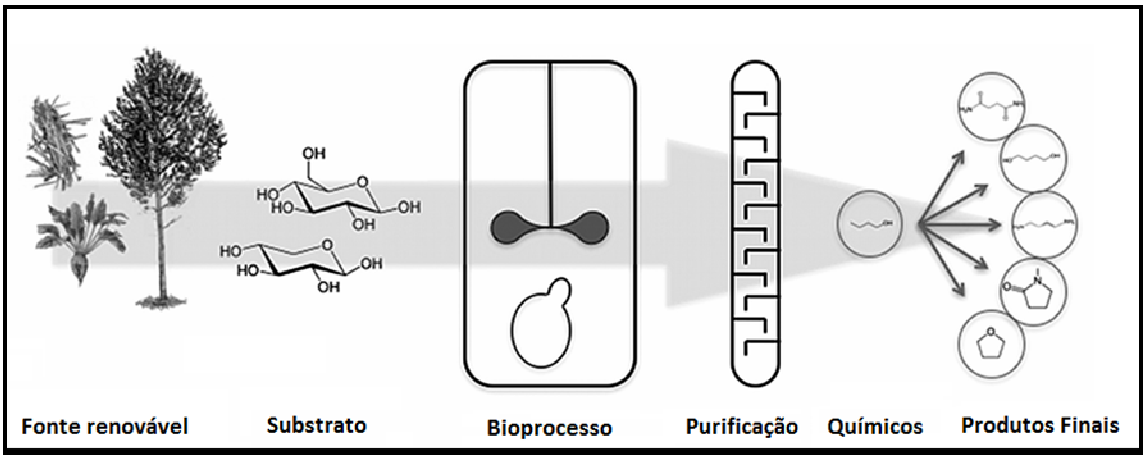


Figura 5: Representação esquemática de obtenção microbiana de produtos químicos a partir de fontes renováveis, dentro do conceito de Biorrefinaria. Fonte: Sauer (2016).

2.4. Fermentação ABE

O butanol é o principal metabólito proveniente do processo de fermentação acetona/butanol/etanol (ABE) produzido pelas bactérias do gênero *Clostridium* por conversão de carboidratos, tanto hexoses quanto pentoses (Jang *et al.*, 2012) e cuja rota metabólica simplificada é apresentada na **Figura 6** (Kumar *et al.*, 2011).

O processo fermentativo ocorre em duas etapas: a primeira é a fase acidogênica, onde o substrato adicionado ao meio (carboidrato) é consumido pelo microrganismo para produção de ácidos orgânicos, tais como ácidos acético, butírico e lático. Nesta fase, o pH tende a cair para valores entre 4 e 5. Em seguida, as células bacterianas se utilizam dos ácidos gerados para a produção do butanol, acetona e etanol, em uma fase conhecida como solventogênica. Nesta etapa, acetato e butirato são reassimilados para a formação de seus correspondentes "derivados CoA" por enzimas transferases. Butiril-CoA converte o butirato a butiraldeído e, finalmente a butanol, enquanto que Acetoacetil-CoA a acetona e Acetil-CoA a etanol (Ndaba *et al.*, 2015).

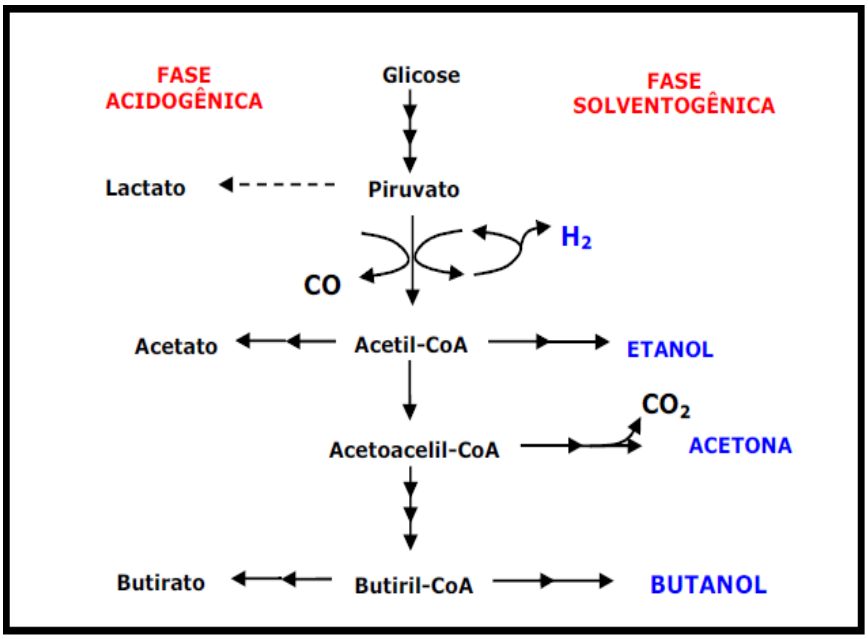


Figura 6: Diagrama esquemático simplificado da rota metabólica de Clostridium sp. para conversão de açúcares a acetona, etanol e butanol. Fonte: Kumar *et al.* (2011).

O período de cada etapa varia de acordo com a espécie do microrganismo empregado no bioprocesso e a proporção usual molar entre butanol, acetona e etanol é de 6:3:1 (Jones *et al.*, 1986). Nesta etapa ocorre também a formação de CO_2 e H_2.

De acordo com Van Der Merwe (2010), considerando a conversão total de glicose em acetona, butanol, etanol, CO_2 e H_2, pode-se definir a equação estequiométrica a seguir e calcular teoricamente a relação entre a glicose consumida e a quantidade total de solventes formada, que é o rendimento teórico. Assim, para cada 1g de glicose pode-se produzir no máximo 0,415 g de solventes.

$$\underset{\text{GLICOSE}}{3\ C_6H_{12}O_6} + H_2O \rightarrow \underset{\text{ETANOL}}{C_3H_6O} + \underset{\text{BUTANOL}}{C_4H_{10}O} + \underset{\text{ACETONA}}{2\ C_2H_6O} + 7\ CO_2 + H_2O + 4\ H_2$$

O mesmo raciocínio é válido para xilose. Nesse caso, para cada 1g de xilose pode-se produzir no máximo 0,405 g de solventes.

$$\underset{\text{XILOSE}}{C_5H_{10}O_5} + H_2O \rightarrow \underset{\text{ETANOL}}{C_3H_6O} + \underset{\text{BUTANOL}}{0{,}83\ C_4H_{10}O} + \underset{\text{ACETONA}}{5\ C_2H_6O} + 8{,}67\ CO_2 + 0{,}83\ H_2O + 3\ H_2$$

A literatura apresenta vários estudos de fermentação baseados em microrganismos naturalmente ocorrentes ou geneticamente modificados para obter esses produtos químicos. A seguir são apresentados alguns deles.

Al Shorgani e colaboradores realizaram fermentações em batelada e em modo contínuo com hidrolisado de farelo de arroz desidratado, pré-tratado com ácido diluído, para a produção de butanol. O pré-tratamento da biomassa com ácido sulfúrico diluído a 1% (v/v) resultou na produção de hidrolisado com 42,2 g/L de açúcares totais (25,6 g/L de glicose, 15,1 g/L de xilose e 1,5 g/L de celobiose). A concentração máxima de solventes alcançada foi de 11,2 g/L, sendo a produção de acetona, butanol e etanol, em g/L, de 4,4; 5,9 e 0,9, respectivamente. Portanto, o rendimento em solventes obtido foi de 0,265 $g.g^{-1}$. Para isso foi realizada previamente uma etapa de destoxificação do hidrolisado com carvão ativado para remover inibidores da fermentação, como o furfural, 5-HMF, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico.

Hidrolisados de fibras de milho, talos de algodão, cascas de soja e bagaço de cana-de-açúcar obtidos a partir de pré-tratamento com ácido diluído e hidrólise enzimática foram submetidos à fermentação acetobutílica sem uma etapa anterior de destoxificação. A maior concentração de butanol obtida foi de 15,6 g/L, com um rendimento correspondente de 0,31 $g.g^{-1}$ e produtividade de 0,31 g/L.h pela fermentação do hidrolisado de talos de algodão utilizando *Clostridium tyrobutyricum* imobilizado e geneticamente modificado. Esses valores são os mais altos relatados na literatura para uma matéria-prima lignocelulósica.

Liao *et al.* compararam os diferentes desempenhos de bactérias naturalmente ocorrentes e geneticamente modificadas de *Clostridium acetobutylicum*. Os autores utilizaram hidrolisado de palha de soja, que foi pré-tratada com ácido diluído e hidrolisada enzimaticamente. Os níveis iniciais de glicose e xilose foram de 50 e 15 g/L, respectivamente. As concentrações de butanol foram de 8 g/L com a cepa geneticamente modificada, atingindo produtividade volumétrica máxima e rendimento de butanol de 0,11 g/L.h e 0,14 $g.g^{-1}$, respectivamente. O hidrolisado não foi destoxificado e a cepa modificada apresentou o dobro da produtividade quando comparada à da cepa silvestre.

Magalhães *et al.* utilizaram hidrolisado de bagaço de cana de açúcar para produzir solventes por *Clostridium saccharoperbutilacetonicum* DSM 14923. Os autores reportaram

a produção de 4,5; 1,4 e 0,3 g/L de butanol, acetona e etanol, respectivamente, com um rendimento e produtividade volumétrica do total de solventes de 0,09 $g.g^{-1}$ e 0,30 g/L.h, respectivamente. O hidrolisado não foi destoxificado e a cepa apresentou um consumo de 96,1% de glicose e 53,1% de xilose.

Liu *et al.* usaram hidrolisado de capim para produção de butanol por *Clostridium acetobutylicum* naturalmente ocorrente. A fermentabilidade do hidrolisado só foi possível após o procedimento de destoxificação com carvão ativado, gerando 11 g/L de butanol e uma concentração total de solventes ABE de 17 g/L. Os autores obtiveram para butanol um rendimento de 0,20 $g.g^{-1}$ e uma produtividade volumétrica de 0,15 g/L.h.

Em outro estudo, o bagaço de cana foi pré-tratado com solução alcalina e em seguida hidrolisado enzimaticamente. O hidrolisado foi utilizado para produzir butanol por *Clostridium acetobutylicum* em batelada. Às 60 h, 14,2 e 21,0 g/L de butanol e solventes ABE foram produzidos, a partir de 68,9 g/L de açúcares totais, com rendimentos de 0,22 e 0,33 $g.g^{-1}$, respectivamente. A glicose foi completamente consumida em 56 h, porém a xilose foi parcialmente consumida de maneira mais lenta. Neste intervalo de tempo 45% da pentose permaneceu no meio fermentado (Pang *et al*., 2016).

Para a fermentação acetobutílica pode-se utilizar fontes renováveis e sustentáveis, especialmente materiais lignocelulósicos, conforme os exemplos já citados. Já a escolha do microrganismo que utilize estes substratos deve ser com base na capacidade de o mesmo utilizar tanto glicose como xilose para a produção de butanol. Com base nisso foram testadas várias espécies do gênero *Clostridium* com os dois açúcares para se obter a que possui maior eficiência. A **Tabela 5** apresenta os resultados obtidos e pode-se concluir que a espécie bacteriana *Clostridium acetobutylicum* é o microrganismo que utiliza tanto glicose como xilose, produzindo butanol em maiores concentrações (Bramono *et al.*, 2011).

Várias empresas estão atualmente focando na produção de biobutanol e isto demonstra a importância que vem tomando a utilização de materiais lignocelulósicos para a produção de moléculas de interesse comercial, dentro do conceito de Biorrefinaria apresentado. No Brasil, a maior quantidade de material lignocelulósico produzido na agroindústria é o bagaço proveniente da cana-de-açúcar, o que significa um grande potencial para a produção de biobutanol. A produção de butanol via

fermentativa tem sido considerada ainda um processo lento, devido às fases necessárias que o microrganismo necessita para a produção em si.

Tabela 5: Produção de butanol a partir de glicose de xilose por espécies do gênero *Clostridium*. Fonte: Bramono *et al.* (2011).

Microrganismo	Produção final de butanol (g/L) em função do substrato
Clostridium acetobutylicum	Glicose: 14,5 Xilose: 9,1
Clostridium saccharobutylicum	Glicose: 11,7 Xilose: 8,7
Clostridium butylicum	Glicose: 14,3 Xilose: 5,1
Clostridium butyricum	Glicose: 7,1 Xilose: 7,4
Clostridium beijerinckii	Glicose: 12,7 Xilose: -

Várias tentativas têm sido estudadas para contornar esta situação e obter maiores produtividades, tais como: modificação genética dos microrganismos, aplicação de processos de purificação do produto final (*downstream*) para removê-lo durante a fase de produção, uso de células imobilizadas, dentre outros.

Deve-se ter muita atenção com os tipos de tratamentos dados ao material lignocelulósico para a geração de açúcares que servirão como substrato para o microrganismo. O controle dos inibidores como furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético e compostos fenólicos, gerados durante estas etapas, é de fundamental importância para a viabilidade do processo.

2.5. Propriedades e aplicações do butanol

A **Tabela 6** apresenta as propriedades da molécula de butanol. O n-butanol é um álcool primário constituído de quatro átomos de carbono, possui menor densidade que a água e moderada solubilidade em meio aquoso, chegando-se a 68 g/L a 25°C.

Sua pressão de vapor é baixa, propriedade interessante para as transferências do produto quanto às perdas por volatilidade. Como combustível, o butanol possui

propriedades superiores, se comparado ao etanol e à gasolina, tais como reduzida ação corrosiva, menor solubilidade em água e menor volatilidade.

Tabela 6: Propriedades físico-químicas do butanol. Fonte: PubChem (2019).

Fórmula molecular	$C_4H_{10}O$
Fórmula estrutural	
Densidade	0,81 g/mL
Ponto de ebulição	118°C
Ponto de fusão	-88,6°C
Ponto de fulgor	37°C
Massa molecular	74,1216 g/mol
Solubilidade em água	Moderadamente solúvel (68g/L a 25°C)
Pressão de vapor	7,0 mm Hg a 25°C
Viscosidade	2,544 cP (a 25°C)
Outros nomes	1-butanol, butan-1-ol, butanol, álcool butírico, álcool n-butílico

A **Tabela 7** apresenta algumas propriedades que caracterizam o butanol como potencial substituto da gasolina e como combustível superior ao etanol, possuindo boa densidade energética, habilidade para misturas entre eles e compatibilidade em motores de combustão (Fournier *et al.*, 2016).

Tabela 7: Propriedades de combustíveis. Fonte: Fournier *et al.* (2016).

Combustíveis/Propriedades	Etanol	Butanol	Gasolina
Poder calorífico inferior (MJ/Kg)	26,9	33,9	42,7
Entalpia de vaporização (KJ/Kg)	873,9	669,1	380-500
Temperatura de autoignição (°C)	423	343	~300
Razão estequiométrica ar/combustível	9	11,1	14,7
Pressão de vapor a 37,8 °C (KPa)	15,9	2,2	62
Conteúdo de carbono (% m/m)	52,2	64,8	86

O butanol também pode ser utilizado como precursor da produção de ésteres acrílicos, glicol ésteres, acetato de butila, aminas butílicas e amino resinas. Outros usos do butanol são listados a seguir (Kumar *et al.*, 2011):

- Solvente para corantes, tintas de impressão, tintas de parede;
- Fonte para produção de auxiliares de flotação, como xantana butílica;
- Aplicação como extrator na produção de fármacos e substratos naturais como antibióticos, hormônios, vitaminas, alcalóides e cânfora;
- Aditivo em substâncias polidoras e de limpeza, como removedores de mancha;
- Solvente na indústria têxtil, como aditivo em fluidos de degelo;
- Aditivo de gasolina (anti-degelo);
- Fase móvel em cromatografia de papel e camada fina;
- Umectante para nitrato de celulose.

2.6. Uso da pervaporação para recuperação dos solventes

Até pouco tempo, os processos biotecnológicos foram muitas vezes não priorizados por conta da obtenção de produtos com baixos rendimentos e dificuldades em sua recuperação, aumentando o custo final do processo. A etapa de *downstream* ou de purificação do produto é fundamental para viabilizar a rota biotecnológica industrialmente e tem como objetivo principal recuperar o produto desejado de forma eficiente, atendendo a especificações pré-estabelecidas, minimizando custos e maximizando seu rendimento.

No caso dos meios fermentados, algumas características dificultam a recuperação dos bioprodutos, os quais normalmente estão presentes em baixas concentrações. Dentre as técnicas aplicadas para a recuperação e purificação de solventes em fermentação ABE estão: a destilação, a adsorção, o *gas stripping* e a pervaporação, cujas características são abordadas de forma resumida a seguir, conforme Pugazhendhi *et al.* (2019).

A destilação é um dos métodos mais tradicionais e amplamente aplicados, mas o fato de o ponto de ebulição do butanol (118°C) ser maior do que o da água e a sua concentração ser abaixo de 2% no meio, esta técnica torna-se muito onerosa.

A adsorção é uma técnica eficiente energeticamente e consiste em aplicar material adsorvente para a separação dos solventes e depois dessorvê-los por aumento de temperatura ou utilização de um deslocador, ou seja, uma substância que realize a dessorção dos solventes no material adsorvente. É considerada uma técnica simples, porém o rendimento é menor do que os outros métodos. Diferentes materiais adsorventes são utilizados, como silicatos, resinas, carvão e polivinil piridina. Embora sejam fáceis de usar, ainda há receios em sua utilização devido a possíveis incompatibilidades com a fermentação e possibilidades de contaminação.

Com relação ao *gas stripping*, o meio fermentativo é introduzido para uma coluna em contra-corrente a um gás para se alcançar a separação dos componentes voláteis de forma seletiva. No entanto, uma grande desvantagem desta técnica é a produção excessiva de espuma, sendo necessária a aplicação de anti-espumante no meio (Xue *et al.*, 2017).

A pervaporação (PV) é um método adequado para a remoção de produtos voláteis de forma seletiva e contínua do meio de fermentação. Esta técnica compreende duas etapas: permeação do componente através de uma membrana por aplicação de vácuo e a passagem do mesmo para a fase vapor. Entre as vantagens do uso de membranas, destacam-se as condições brandas de operação sem alteração das condições do bioprocesso, assim como a remoção contínua de solventes no meio, que são tóxicos para as células (Qureshi *et al.*, 1999).

Além das aplicações em separação e purificação de produtos, os processos de separação com membranas também vêm sendo utilizados com o objetivo de melhorar a eficiência dos processos bioquímicos com a remoção contínua de produtos metabólicos. Desta forma, a remoção contínua dos produtos mantém a suas concentrações em níveis mais baixos, evitando a inibição das rotas metabólicas. A grande vantagem desta nova concepção é que a produção e a separação ocorrem simultaneamente e, quando possível, em um mesmo equipamento. Além disso, as células ou os biocatalisadores são mantidos no sistema, pois a membrana é capaz de retê-los ou mesmo imobilizá-los em sua estrutura. O uso da pervaporação para a recuperação de butanol e acetona neste trabalho é uma inovação, não sendo encontrado na literatura aplicação semelhante.

2.7. *Mercado e rotas tecnológicas de produção do butanol*

A seguir, são apresentados primeiramente os resultados da avaliação de mercado, considerando os primeiros anos deste trabalho (2014 a 2016) e que foram apresentados no Exame de Qualificação em abril de 2017. No final desta seção, são apresentados alguns dados mais recentes (2017 a 2019), haja vista que houve mudanças no âmbito global e que ocasionaram variações no cenário mundial.

A maior demanda de butanol é dirigida para a produção de acrilato de butila, cuja participação no mercado global é de 38%, conforme apresentado na **Figura 7**. O mercado de acrilato de butila é destinado à produção de tintas de látex, esmaltes e lacas, usados na construção civil. Glicol ésteres, que correspondem a 16% de seu uso tem tendência a crescer de produção para atender ao mercado asiático. O acetato de butila, outro importante produto derivado do butanol (18%), apresentou crescimento de produção nos últimos dez anos, mas a demanda tem aumentado em menor escala (Nexant, 2013).

O uso direto do butanol como solvente é de 15% da produção global e as outras variadas aplicações correspondem a 13%, incluindo manufatura têxtil, modificadores de impacto para PVC rígido, plastificantes, resinas, butilaminas e como alternativa ao etanol como combustível.

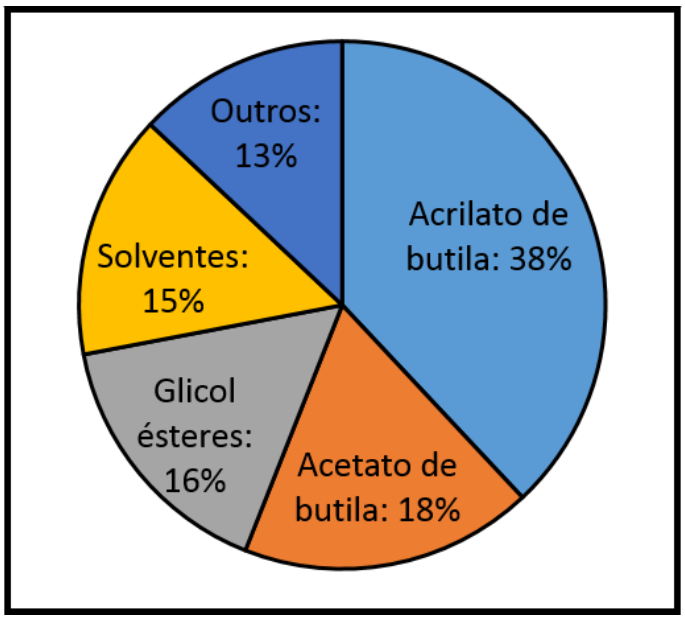


Figura 7: Consumo global de butanol por finalidade. Fonte: Nexant (2013).

A demanda global em 2013 foi estimada em torno de 3 milhões de toneladas por ano, conforme ilustrado na **Figura 8**, com taxa de crescimento a partir do ano 2000 de 3,5% ao ano e com expectativa de 3,5 milhões de toneladas em 2015.

O maior mercado de butanol atual está concentrado na Ásia, mais especificamente na China, com um consumo aproximado de 45% do produto. A América do Norte e a Europa também possuem alta demanda pelo produto, representando 27% e 25%, respectivamente (Nexant, 2013).

A capacidade produtiva do butanol está concentrada na Ásia, América do Norte e Europa Ocidental, sendo a expansão do setor mais intensa na Ásia. O crescimento da oferta na América do Norte tendeu à estabilização e na Europa Ocidental ocorreu a racionalização da capacidade (Nexant, 2013).

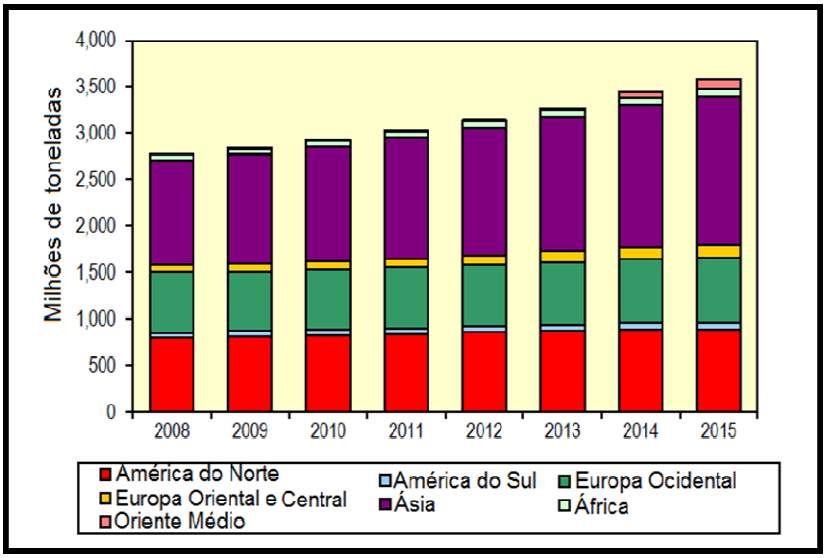


Figura 8: Consumo global de butanol por região. Fonte: Nexant (2013).

O processo dominante de produção de butanol é denominado Oxo, rota petroquímica, que surgiu durante a metade do século XX e produz os isômeros de butanol (butanol e isobutanol). O processo Oxo consiste na reação de hidroformilação, ou seja, reação de uma olefina, como por exemplo propileno, com monóxido de carbono e hidrogênio, gerando aldeídos (isobutiraldeído e *n*-butiraldeído) que sofrem posteriormente condensação aldólica e hidrogenação, ou apenas hidrogenação, para produzir os álcoois correspondentes (isobutanol e butanol). Esse processo é desenvolvido em três grandes

etapas: (1) Produção dos gases monóxido de carbono (CO) e hidrogênio (H_2) a partir do gás natural; (2) Produção de aldeídos a partir da reação de propeno com os gases nas seções de reação oxo; e (3) Produção dos álcoois a partir dos aldeídos nas seções de hidrogenação (Tudor *et al.*, 2007).

Conforme apresentado na **Tabela 8**, um estudo realizado pela Consultoria Nexant em 2013 apontou que a capacidade instalada na Ásia era na época de 51% do total, seguido da América do Norte e Europa Ocidental com 32% e 17%, respectivamente (Nexant, 2013).

Tabela 8: Capacidade instalada das empresas produtoras de butanol por continente.

Empresa	Localização	Capacidade (1000 ton/ano)	Processo
BASF	Texas, EUA	218	Oxo
Oxea	Texas, EUA	225	Oxo
Dow Chemical	Los Angeles, EUA	270	Oxo
Dow Chemical	Texas, EUA	255	Oxo
Eastman	Texas, EUA	135	Oxo
Sasol	Los Angeles, EUA	10	Sem informação
Texmark	Texas, EUA	9	Oxo
TOTAL NA AMÉRICA DO NORTE		**1.122 ton/ano**	
Oxochimie	França	150	Oxo
BASF	Alemanha	225	Oxo
Oxea	Alemanha	130	Oxo
Sasol	Alemanha	4	Oxo
Perstorp	Suécia	100	Oxo
TOTAL NA EUROPA OCIDENTAL		**609 ton/ano**	
BASF YPC	Nanjing, China	135	Oxo
Jilin Petrochemical	Jilin, China	140	Oxo
DaqingPetrochemical	Heilongjiang, China	85	Oxo
Qilu Petrochemical	Shandong, China	50	Oxo
Tianjing Bohai Chemical	Tianjing, China	90	Oxo
Lihuyai Group	Shandong, China	85	Oxo
Beijing Chemical	Beijing, China	20	Oxo
Jiangsu Petrochemical	Jiangsu, China	50	Sem informação
Sichuan Ptrochemical	Sichuan, China	122	Oxo
Various	China	53	Sem informação
Formosa Plastics	Mailiao, Taiwan	250	Oxo
Kyowa Yuka	Mie, Japão	130	Oxo
Mitsubishi Chemical	Mizushima, Japão	95	Oxo
Chisso	Goi, Japão	25	Oxo
LG Chemical	Naju, Coréia do Sul	50	Oxo
Hanwha	Eochon, Coréia do Sul	20	Oxo
Eastman	Jurong Island, Singapura	55	Oxo
BASF Petronas	Kuantan, Malásia	155	Oxo
Optimal Chemicals	Kerteh, Malásia	135	Oxo
Andhra Petrochemicals	Andhra Pradesh, Índia	70	Oxo
TOTAL NA ÁSIA		**$1.815.10^3$ ton/ano**	

O estudo apontou como os três maiores produtores globais de butanol as empresas BASF, Dow Chemical e Oxea, com fábricas nas três regiões (América do Norte, Europa Ocidental e Ásia), utilizando o processo Oxo.

Mais recentemente no Brasil a BASF aportou o maior investimento da história da empresa na América do Sul: 500 milhões de euros. A unidade está instalada desde 2015 no Polo Petroquímico de Camaçari, na região metropolitana de Salvador e tem capacidade de produção de 360 mil toneladas por ano de produtos como superabsorventes (SAP), ácido acrílico e acrilato de butila, matérias primas para produtos como fraldas, tintas, tecidos, adesivos e materiais para a construção civil (BASF, 2018).

Em relação ao processo biotecnológico de produção de butanol, parte do produto consumido da China era proveniente da rota fermentativa. A produção em 2012 foi de 185 mil toneladas, com maior volume produzido no próprio país asiático e em usinas de demonstração nos Estados Unidos.

A **Tabela 9** mostra a capacidade produtiva de algumas empresas que utilizam a rota fermentativa. Entretanto não existem anúncios oficiais significativos de novas fábricas. Os anúncios limitaram-se a plantas de demonstração de processo em diferentes escalas (Natalense, 2013).

Tabela 9: Empresas chinesas que produzem biobutanol em escala comercial. Fonte: Natalense (2013).

Empresa	Localização	Capacidade (1000 ton/ano)	Processo
Jinmaoyuan BioChem	China	60	Fermentação ABE
Songyuan Ji'an BC	China	60	Fermentação ABE
Lianhai Biotech	China	35	Fermentação ABE
Jilin Cathay Biotech	China	30	Fermentação ABE

Várias empresas investiram em desenvolvimento para produção de biobutanol, ou seja, butanol via fermentativa, utilizando a mesma infraestrutura de produção de etanol de milho ou cana-de-açúcar. Alguns destes investimentos são ou foram focados na modificação genética dos microrganismos (OGM's) para obtenção de maior tolerância aos

produtos formados (acetona, butanol e etanol), maiores concentrações dos produtos, maior seletividade e produtividade (Natalense, 2013).

Nos últimos anos os investimentos em desenvolvimento para produção de biobutanol diminuíram. Havia muitas empresas atuando com este objetivo, mas muitas delas ficaram inativas após a queda dos preços do barril do petróleo, que se iniciou a partir do segundo semestre de 2014, conforme apresentado na **Figura 9**. Em 2013, o preço do barril era acima de U$ 100,00, enquanto que no final de 2015 chegou a U$ 34,00. Percebe-se que houve uma nova tendência de aumento a partir de 2016, porém com oscilações ainda consideráveis até o momento atual com uma média sinalizada no gráfico em torno de U$ 70,00 (Inveting.com, 2019).

Entre os potenciais futuros produtores em larga escala de biobutanol encontram-se as empresas Green Biologics (EUA) e Celtic Renewables (Escócia), empresas que foram escolhidas para se obter maiores detalhes.

Figura 9: Preços do barril de petróleo de 2010 a 2019. Fonte: Investing.com (2019).

A empresa Green Biologics lidera um projeto, conhecido como “ButaNext – Next Generation Biobutanol”, com objetivo de superar as restrições técnicas e econômicas para o uso do biobutanol, tanto como produto químico de c*ommodity* como biocombustível

avançado. O projeto começou em 2015 e reune especialistas da Europa para otimizar ainda mais a cadeia de valor do biobutanol. Juntos, eles desenvolveram e demonstraram, em escala piloto, um processo mais competitivo em termos de custo, eficiente e ambientalmente amigável para converter matérias-primas renováveis e sustentáveis em biobutanol. O projeto tem focado em usar diferentes biomassas como palha de trigo, *Miscanthus*, resíduo sólido municipal e resíduos de madeira (ButaNext, 2019). O projeto recebe verbas de um programa da Comissão Europeia de pesquisa e inovação, conhecido como "Horizon 2020", que aporta € 80 bilhões desde 2014 até 2020, além de investimentos privados. O processo está em escala piloto no CENER – Centro Nacional de Energías Renovables, em Navarra – Espanha, com o estudo integrado das etapas, desde o manejo de biomassa até a recuperação do biobutanol, conforme a **Figura 10**.

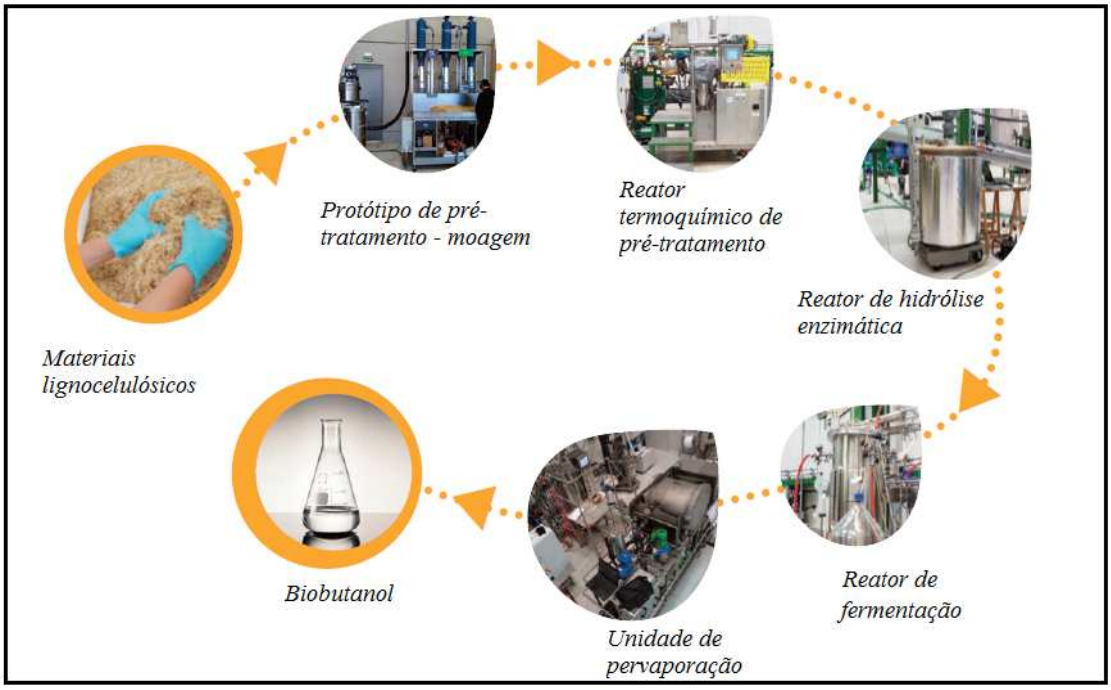


Figura 10: Etapas de produção de biobutanol que estão sendo desenvolvidas em escala piloto através do Projeto ButaNext, da empresa Green Biologics. Fonte: ButaNext (2019).

A empresa Celtic Renewables Ltd. possui tecnologia de produção que utiliza bactérias que podem converter os açúcares xilose, arabinose e glicose em biocombustíveis. As principais fontes de susbtratos são os coprodutos da indústria de whisky escocês, denominados "Draff" (resíduos de cascas após fermentação alcoólica) e "Pot Ale" (resíduo de destilação) Ambos são misturados e passam por tratamento termoquímico seguido de

hidrólise enzimática e fermentação. O processo utiliza uma cepa de bactérias do gênero *Clostridium* para a produção de acetona, butanol e etanol e a fração sólida residual é destinada à alimentação animal. A empresa irá construir sua primeira planta com capacidade de 500 m³/ano de butanol combustível na Escócia entre 2019 e 2020 (*Celtic Renewables*, 2019). A **Figura 11** apresenta o fluxograma básico do processo desenvolvido pela empresa.

A taxa atual de crescimento de butanol no mundo é estimada em 8,36% até 2024, sendo ainda o maior mercado a Ásia. A América Latina é o mercado que desponta ter maior taxa de crescimento (Mordor Intelligence, 2019).

O butanol é um produto químico industrial valioso, com um tamanho estimado de mercado global em torno de US$ 10 bilhões dólares (Phytonix, 2019) . Os principais fatores que impulsionam o mercado de biobutanol são: a redução da emissões de carbono e o fato de ser um *building block* (bloco de construção) para a fabricação de diversos produtos químicos.

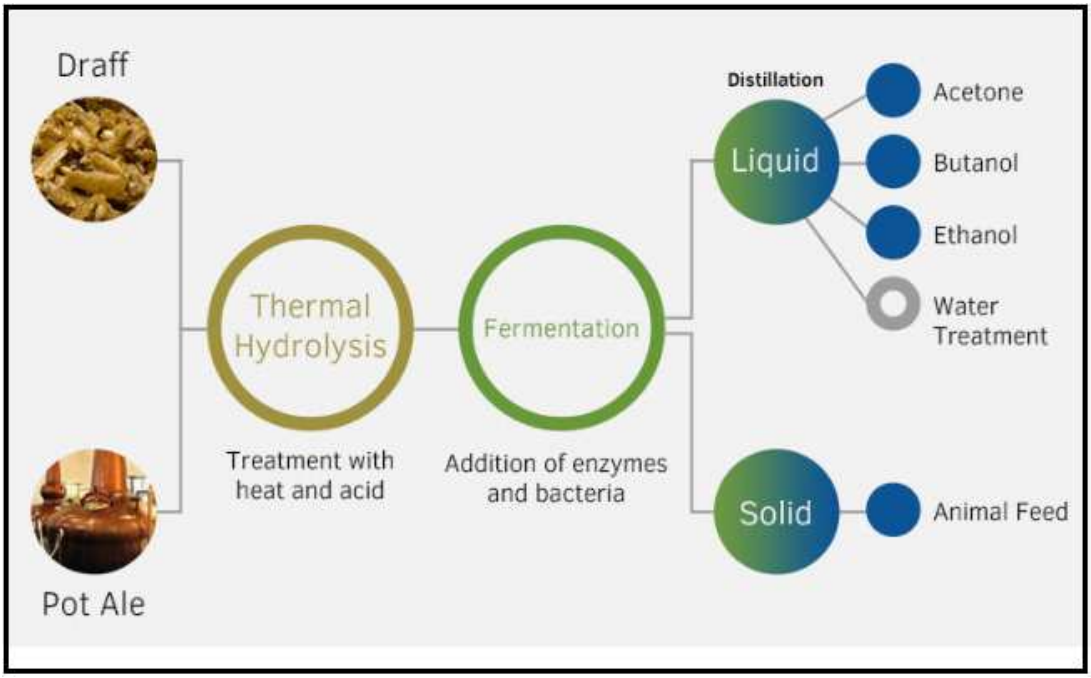


Figura 11: Fluxograma simplificado do processo de produção fermentativa ABE.
Fonte: Celtic Renewables (2019).

O segmento de acrilatos, por exemplo, que dominou o mercado em 2017, é esperado que cresça a uma taxa significativa até 2024, devido à produção crescente de

acrilatos de butila. O aumento do consumo de biocombustíveis na indústria de aviação é também uma grande oportunidade para a aplicação do biobutanol no futuro.

A região Ásia-Pacífico foi a maior consumidora de biobutanol em 2018. A produção crescente de revestimentos, adesivos, resinas e de matéria têxtil nos países, tais como China, India e Japão, está conduzindo o crescimento deste mercado (Mordor Intelligence, 2019).

2.8. Produção de cana-de-açúcar, bagaço e estimativa do potencial de produção de biobutanol no Brasil

O relatório emitido pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), que pertence ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Governo Federal do Brasil aponta em seu quarto levantamento da Safra 2019/2020 uma produção de cana-de-açúcar de 615,98 milhões de toneladas em uma área colhida de 8,38 milhões de hectares (CONAB, 2019).

A quantidade de bagaço proveniente de uma tonelada de cana-de-açúcar varia em função da safra e das condições da mesma, mas em média é de 250 Kg (Lopes, 2015). Com base nesta relação, estima-se uma quantidade média de bagaço na safra 2019/2020 de 154 milhões de toneladas.

Através do relatório sobre a geração termoelétrica por queima do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil emitido pela CONAB em 2011, a quantidade de bagaço excedente, ou seja, que não é utilizado para cogeração no país, é de 11,2% (CONAB, 2011). Aplicando-se este percentual na produção atual de bagaço, tem-se uma quantidade de 17,2 milhões de toneladas da matéria-prima excedente. Considerando-se um teor de sólidos no bagaço em torno de 50% (m/m) e uma quantidade em massa de carboidratos na fibra seca de 70,5% (m/m) (Gomes, 2009), obtém-se uma produção de açúcares totais solúveis (pentoses e hexoses) de 6,1 milhões de toneladas.

Considerando um rendimento médio de butanol em processos fermentativos com bactérias do gênero *Clostridium* de 0,23 $g.g^{-1}$ (Jang *et al.*, 2012), a produção de butanol com o aproveitamento somente do bagaço excedente (sem uso da palha) seria de 1,4 milhão de

toneladas/ano. Esta magnitude de produção retrata a oportunidade existente no país para mudar a balança comercial deficitária apresentada na **Tabela 10** (MDIC, 2019).

Considerando o preço FOB (*Free On Board*), ou seja, quando o comprador assume os riscos dos custos com o transporte da mercadoria, o valor de exportação do butanol foi de US$ 1.506,34 a tonelada em 2018. Portanto, a ordem de grandeza do volume financeiro atrelado à produção é de US$ 2 bilhões. Deste modo torna-se fundamental o estudo da viabilidade técnica para a produção de butanol de fontes renováveis, especialmente bagaço de cana-de-açúcar, que é a biomassa mais abundante no Brasil.

Tabela 10: Balança comercial brasileira de butanol. Fonte: MDIC (2019).

Ano	**Exportação**		**Importação**		**SALDO**
	Quantidade (ton)	*Preço FOB (US$/ton)*	*Quantidade (ton)*	*Preço FOB (US$/ton)*	*Quantidade (ton)*
2017	96	1.087,94	13.557	826,14	- (13.461)
2018	21	1.506,34	13.257	973,09	- (13.236)
2019-março	1,3	2.128,40	5.710	950,77	- (5.709)

2.9. Considerações gerais

A demanda por combustíveis e produtos químicos é crescente atualmente e, paralelamente aumentam as pressões ambientais por processos mais amigáveis e com apelo de sustentabilidade. Resíduos agrícolas, como o bagaço de cana-de-açúcar, são fontes renováveis de substratos e passíveis de serem utilizados para a produção de butanol via rota biotecnológica. Este processo encontra espaço considerável no contexto apresentado para se estabelecer como uma alternativa à rota petroquímica. Alguns gargalos desta tecnologia são previstos, tais como a presença de agentes inibidores ao processo fermentativo e a obtenção de produtos em baixas concentrações.

Um dos diferenciais do presente trabalho é a obtenção de solventes (butanol e acetona) a partir de fermentação de hidrolisados ricos em açúcares (C5 e C6) de frações polissacarídicas de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando uma cepa naturalmente ocorrente

de *Clostridium acetobutylicum*. Estas correntes são prontamente fermentadas sem a necessidade de destoxificação. Buscar-se-á a obtenção de hidrolisados com baixo grau de severidade de pré-tratamento, a fim de se evitar a geração de inibidores em altas concentrações. Além disso, objetivar-se-á a otimização das condições de cultivo para a propagação da linhagem bacteriana, agente do bioprocesso em tela, e se investigará se haverá a necessidade de aporte de macro e micronutrientes para a fermentação acetobutílica, avaliando-se a quantidade desses compostos no hidrolisado de bagaço de cana. Finalmente, pretende-se realizar a integração do processo fermentativo com o processo de pervaporação, para separação *in situ* de butanol e acetona do meio, e avaliar a eficiência desta concepção de processo na manutenção da atividade fermentativa pela redução do efeito inibitório dos produtos, já que serão removidos do meio à medida que sejam formados. Adicionalmente, a adoção desta técnica permitirá a obtenção de produtos mais concentrados.

Assim, o presente trabalho visa abrir novas perspectivas para a produção de importantes moléculas a partir da biomassa lignocelulósica para as indústrias de combustíveis e produtos químicos inseridos no contexto de Biorrefinaria de segunda geração.

Capítulo 3

Justificativa e Objetivos

O presente trabalho vem de encontro à demanda crescente de produção de solventes, em especial butanol e acetona, para atendimento ao mercado demandante e em expansão, utilizando a rota biotecnológica e substratos residuais que podem ser mais baratos e podem reduzir possíveis impactos ambientais, além de não competirem com os alimentos. Neste sentido, a produção bioquímica de butanol, processo amplamente conhecido, pode ser explorado com nova visão, adaptando-se o microrganismo à utilização de açúcares de fontes lignocelulósicas e utilizando-se das ferramentas de bioprocesso para o aumento no rendimento e na produtividade.

Os microrganismos do gênero *Clostridium* têm capacidade de produção de acetona, butanol e etanol a partir de glicose (Jiang *et al.*, 2014) e xilose (Sun *et al.*, 2012), açúcares presentes em grande percentual em resíduos lignocelulósicos, como por exemplo o bagaço de cana-de-açúcar. Esta versatilidade de utilização de diferentes açúcares por microrganismos naturalmente ocorrentes apresenta a grande vantagem de implementação industrial, tanto no que tange à aceitação pela Lei de Biossegurança (pelo fato de não estar trabalhando com microrganismos geneticamente modificados), quanto em termos de rendimento do bioprocesso, com o aproveitamento integral dos açúcares. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivos:

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um processo para o aproveitamento de açúcares, provenientes da hidrólise dos polissacarídeos do bagaço de cana-de-açúcar (glicose e xilose) para a produção de butanol e acetona, utilizando como agente fermentativo *Clostridium acetobutylicum* DSMZ 6228.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Utilizar as ferramentas de planejamento fatorial de experimentos para a otimização dos meios de propagação de *Clostridium acetobutylicum* DSMZ 6228 em meios quimicamente complexos, com vistas à redução de custos com os insumos;
- ✓ Produzir os hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar com aplicação de pré-tratamento físico-químico e hidrólise enzimática e caracterizá-los quanto aos teores de glicose, xilose, ácido acético, 5-HMF, furfural e polifenóis;
- ✓ Realizar fermentações com *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228 em biorreatores instrumentados contendo meios quimicamente complexos, tendo como fontes de carbono glicose e xilose para produção de butanol e acetona;
- ✓ Realizar fermentações em biorreatores instrumentados com hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar para produção de butanol e acetona, inclusive avaliando a real necessidade de aporte de nutrientes nesta etapa;
- ✓ Determinação dos parâmetros de bioprocessos, tais como produtividade volumétrica (Q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$), de cada fermentação, comparando os resultados entre si e com a literatura;
- ✓ Avaliar o processo de recuperação de butanol utilizando membranas em sistema de pervaporação integrado ao processo de fermentação acetobutílica de hidrolisado de bagaço;

Capítulo 4

Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa, assim como as metodologias aplicadas nos experimentos realizados. A primeira etapa deste trabalho teve início com o processo de otimização do meio de cultura para a etapa de propagação celular, através da ferramenta de planejamento de experimentos. A concentração celular foi a variável de resposta principal, seguida da avaliação das concentrações de ácido acético, ácido butírico e carboidratos residuais (glicose e xilose).

Em uma segunda etapa foi avaliada a fermentabilidade de meios quimicamente complexos, contendo glicose e xilose, em concentrações compatíveis com os hidrolisados obtidos de bagaço de cana-de-açúcar (HH C5, HC C6 e HC C5+C6) e a obtenção dos perfis cinéticos dos processos fermentativos de produção de butanol por *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228.

Em seguida, foram produzidos e caracterizados os hidrolisados citados e estudada a fermentabilidade dos mesmos, obtendo-se também os perfis cinéticos das fermentações com o mesmo microrganismo. A recuperação dos solventes através da pervaporação foi a última etapa deste trabalho.

Em todas as etapas foi de fundamental importância o monitoramento dos substratos, intermediários e produtos através da cromatografia a líquido, com um método desenvolvido exclusivamente para este trabalho.

4.1. Microrganismo

O agente de fermentação empregado foi uma linhagem de *Clostridium acetobutylicum*, gram positiva (**Figura 12**), com base nos trabalhos de Bramono *et al.* (2011), apresentado no item 2.2 (**Tabela 5**). O microrganismo foi obtido na forma liofilizada do banco alemão de culturas microbianas DSMZ (Deutsche Sammulung von Mikroorganismen und Zellkulturen), cuja número de catálogo é DSM6228.

Figura 12: Fotografia de microscópio ótico da cepa de *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228.

Primeiramente foi realizada a ativação da linhagem liofilizada, em câmara de anaerobiose, em meio BHI (Brain Heart Infusion), conforme a **Tabela 11** e, após 2 dias a 37°C neste meio, as células foram propagadas em meio RCM (Reinforced Clostridial Medium) por 2 dias a 37°C até esporulação.

Tabela 11: Composição do meio de ativação BHI

Componente	Quantidade
BHI	37 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Resazurina	4 g/L
Cisteína	0,5 g/L
Hemina	10 mL/L
Menadione	5 gotas/L

A constituição do meio RCM é apresentada na **Tabela 12**. O meio foi adquirido na forma sólida do fornecedor Acumedia. O preparo do meio consistiu em solubilizar 38g do material em 1 litro de água purificada, aquecê-lo suavemente até completa dissolução, adicionar a resazurina na concentração citada, distribuir o meio em frascos de penicilina de 100 mL (adicionando 50 mL em cada), borbulhar gás nitrogênio para remoção de oxigênio no meio, tampar os frascos com borracha e selos de alumínio e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Tabela 12: Composição do meio RCM comercial, do fornecedor Acumedia. Fonte: Lu *et al.* (2013).

Componente	Concentração, g/L
Extrato de carne	10
Peptona	10
Cloreto de sódio	5
Glicose	5
Extrato de levedura	3
Acetato de sódio	3
Amido solúvel	1
L-cisteína HCl	0,5
Ágar	0,5

A partir de seu crescimento, observado por turbidez, a cepa foi mantida em estoque a -80°C em criotubos de 2 mL com glicerol a 30% v/v como crioprotetor (Börner *et al.*, 2014). Além da conservação da cepa à temperatura de -80°C, o microrganismo foi mantido em meio rico comercial RCM em frascos de penicilina de 100mL em geladeira a 8°C para uso nas fermentações rotineiras.

4.2. *Ativação e propagação do microrganismo e meios de cultura empregados*

A etapa de ativação consistiu em transferir, por meio de seringa e agulha estéreis, o conteúdo de um criotubo (1,5 mL) com suspensão de células, armazenadas em freezer à temperatura de -80°C, em solução de glicerol a 30% (v/v) para um frasco de penicilina de 100 mL contendo 50 mL de meio RCM (*Reinforced Clostridium Media*) comercial, conforme esquema da **Figura 13** (Lu *et al.*, 2013; Abd-Alla *et al.*, 2012; Ranjan *et al.*, 2013) e resazurina a 1 mg/L como indicador de anaerobiose.

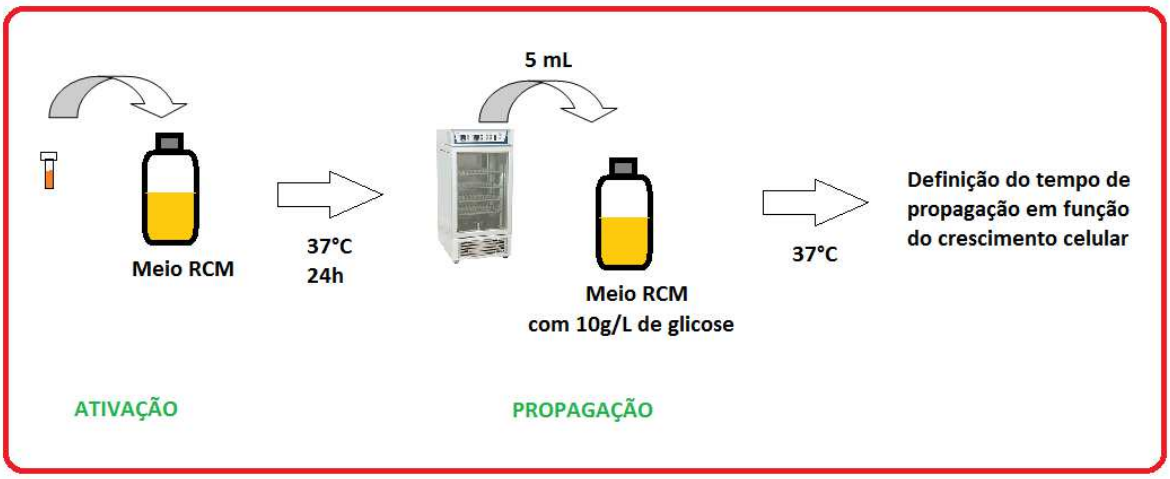


Figura 13: Etapas de ativação e propagação de *Clostridium acetobutylicum* em frasco.

Após a inoculação, os frascos foram mantidos a 37°C em estufa, sem agitação, durante 24 horas (Börner *et al.*, 2014).

A etapa de propagação do microrganismo realizada em frasco consistiu em transferir 5 mL de inóculo do frasco da etapa de ativação para um outro de 100 mL contendo 50 mL de meio RCM acrescido de glicose para uma concentração final de 10 g/L, além da resazurina a 1 mg/L. Os demais procedimentos de preparo foram exatamente os mesmos. O tempo de incubação e a composição otimizada do meio de propagação foram objetos de estudo neste trabalho, através de planejamento de experimentos, tendo como variável de resposta principal o crescimento celular.

4.3. Planejamentos de experimento para a otimização do meio de propagação

A bactéria *Clostridium acetobutylicum* DSM6228 exige nutrientes essenciais para seu crescimento. Entretanto, algumas destas substâncias apresentam alto custo. Assim utilizou-se a ferramenta de planejamento experimental de maneira a reduzi-los ou mesmo, retirá-los sem comprometer o crescimento celular e o metabolismo microbiano. Para a otimização do meio de propagação, primeiramente foram eliminados os seguintes componentes neste estudo:

- Extrato de carne: por ser mais uma fonte de proteína e vitamina, dentre outras como peptona e extrato de levedura já existentes no meio de cultivo. Esta determinação também foi baseada nos trabalhos de Wu e colaboradores (Wu *et al.*, 2015).

- Amido solúvel: porque os substratos a serem utilizados no trabalho são de origem lignocelulósica e não amilácea. No lugar deste componente foi avaliado o uso da xilose, com intuito de adaptar o microrganismo na fase de propagação, já que o mesmo é capaz de metabolizar este carboidrato para a produção de butanol e também pelo fato de existir este açúcar nos hidrolisados de bagaço.

Com a eliminação dos componentes citados, ficaram sete originais e mais a xilose para a avaliação. Se fosse realizar uma matriz completa de experimentos, seriam necessários 2^8 = 256 ensaios. Essa estratégia seria extremamente dispendiosa financeiramente e inviável tecnicamente. Portanto, foi realizado um delineamento conhecido como Plackett & Burman (Rodrigues & Iemma, 2014), com 12 ensaios (PB12), acrescido de 3 repetições do ponto central (PC), para a avaliação da repetibilidade do processo e as respostas nas condições dos valores intermediários (entre os níveis inferiores e superiores estudados). Neste planejamento foram avaliados estatisticamente os efeitos das oito variáveis independentes estudadas considerando os limites apresentados na **Tabela 13**., tendo como variável resposta a concentração celular.

Os limites superiores (+1) das variáveis peptona, NaCl, cisteína, acetato de sódio e ágar foram definidos como sendo os mesmos valores do meio RCM (**Tabela 12**) e os seus limites inferiores (-1) como zero, pois a intenção foi estudar os efeitos da ausência e dos valores de concentração destes componentes no meio comercial.

À exceção foi para o extrato de levedura, cujo limite inferior foi de 1g/L, haja visto que para o crescimento celular é imprescindível pelo menos uma fonte de vitamina e proteína. Decidiu-se como limite superior para ambos os carboidratos (xilose e glicose) o valor de 7 g/L, sendo o ponto central o valor definido pelo meio de cultura RCM para glicose (5g/L).

Tabela 13: Limites de cada variável estudada no planejamento de experimentos PB12.

Variáveis independentes	**Código**		**Unidade**	**Nível -1**	**Nível 0**	**Nível +1**
Peptona	x_1		g/L	0	5	10
Extrato de levedura	x_2		g/L	1	2	3
Xilose	x_3		g/L	3	5	7
NaCl	x_4		g/L	0	2,5	5
Cisteína	x_5		g/L	0	0,25	0,5
Acetato de sódio	x_6		g/L	0	1,5	3
Ágar	x_7		g/L	0	0,25	0,5
Glicose	x_8		g/L	3	5	7

Aos ensaios da matriz do planejamento experimental PB12 + 3 pontos centrais, conforme a **Tabela 14**, foram adicionados dois controles para comparação dos resultados obtidos, a saber:

- Controle C1: Meio comercial de marca Acumedia;
- Controle C2: Meio comercial de marca Acumedia com adição de xilose a 5g/L;

Para cada ensaio realizado foram preparados 7 frascos de sacrifício para amostragem nos tempos 0 (logo após inoculação) 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas, totalizando

119 frascos de penicilina. As amostragens foram realizadas por remoção dos frascos outrora mantidos em estufa a 37°C. Em seguida as amostras foram submetidas à análise de concentração celular, glicose, xilose, ácido acético e ácido butírico, que foram as variáveis resposta deste primeiro planejamento.

Tabela 14: Matriz completa PB12 com 12 ensaios, 3 pontos centrais e 2 controles. PP: Peptona; E: Extrato de levedura; Cist: Cisteína; AS: Acetato de sódio.

Ensaios	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	PP	EL	Xilose	NaCl	Cist	AS	Ágar	Glicose
									(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	10	1	7	0	0	0	0,5	7
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	10	3	3	1	0	0	0	7
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0	3	7	0	0,5	0	0	3
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	10	1	7	1	0	3	0	3
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	10	3	3	1	0,5	0	0,5	3
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	10	3	7	0	0,5	3	0	7
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	0	3	7	1	0	3	0,5	3
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0	1	7	1	0,5	0	0,5	7
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0	1	3	1	0,5	3	0	7
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	10	1	3	0	0,5	3	0,5	3
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0	3	3	0	0	3	0,5	7
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	1	3	0	0	0	0	3
13	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	5	2,5	0,25	1,5	0,25	5
14	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	5	2,5	0,25	1,5	0,25	5
15	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	5	2,5	0,25	1,5	0,25	5
C1 (Controle 1)	Meio RCM								10	3	0	5	0,5	3	0,5	5
C2 (Controle2)	Meio RCM + 5g/L de xilose								10	3	5	5	0,5	3	0,5	5

A partir da análise dos efeitos principais foram selecionados as três variáveis independentes (peptona, extrato de levedura e glicose) e realizado um segundo planejamento de experimentos do tipo DCCR (delineamento composto central rotacional), um fatorial completo 2^3, incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central,

totalizando 17 ensaios (Rodrigues & Iemma, 2014), considerando os demais componentes do meio no nível (-1), ou seja, sem adição dos mesmos. O objetivo deste planejamento foi obter modelos para determinar as melhores concentrações dos componentes do meio que propiciem o maior crescimento celular (variável resposta).

A **Tabela 15** apresenta a matriz completa do DCCR utilizado, com os valores de concentração das variáveis em cada ensaio. A variável resposta principal deste conjunto foi a concentração celular.

Tabela 15: Matriz do planejamento fatorial completo DCCR.

Ensaios	x1	x2	x3	Peptona	Extrato de levedura	Glicose
				(g/L)	(g/L)	(g/L)
1	-1	-1	-1	1,2	1,2	5,6
2	1	-1	-1	4,8	1,2	5,6
3	-1	1	-1	1,2	4,8	5,6
4	1	1	-1	4,8	4,8	5,6
5	-1	-1	1	1,2	1,2	10,4
6	1	-1	1	4,8	1,2	10,4
7	-1	1	1	1,2	4,8	10,4
8	1	1	1	4,8	4,8	10,4
9	-1,68	0	0	0	3	8
10	1,68	0	0	6	3	8
11	0	-1,68	0	3	0	8
12	0	1,68	0	3	6	8
13	0	0	-1,68	3	3	4
14	0	0	1,68	3	3	12
15	0	0	0	3	3	8
16	0	0	0	3	3	8
17	0	0	0	3	3	8
Controle 1	Meio RCM comercial					
Controle 2	Meio RCM comercial					
Controle 3	Meio RCM comercial					

Outras respostas também foram analisadas, como as concentrações de glicose, xilose, ácido acético e ácido butírico. Foi possível a obtenção de modelos matemáticos das respostas em função das três variáveis estudadas e considerados os coeficientes de regressão com *p*-valores < 0,1 com 90% como nível de confiança. Isto se deve ao fato de se

trabalhar com microrganismo, cujos erros experimentais e variações nas respostas podem ser mais significativos do que quando se trabalha com enzimas *in vitro* ou sistemas de reações químicas, por exemplo. Segundo Rodrigues & Iemma (2014), é importante o bom senso na interpretação estatística para que algum fator importante não deixe de ser considerado na análise, cujos processos não são triviais.

4.4. Propagação em biorreator

Após a otimização da propagação em frascos, foram realizados ensaios em biorreator. Esta etapa consistiu em preparar 400 mL do meio RCM comercial ou otimizado com resazurina a 1 mg/L, nas mesmas condições mencionadas anteriormente e transferir para um biorreator de marca New Brunswick e modelo BioFlo 110 de 1,3 L, equipado com um impelidor do tipo *rushton*, eletrodo de pH de marca Mettler Toledo, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,01 e 7,00 e amostrador. Em seguida borbulhou-se nitrogênio gasoso no meio para eliminação de oxigênio dissolvido e o conjunto foi levado à esterilização por autoclavação a 121°C por 15 minutos (Wu *et al.*, 2015).

A inoculação de 20% v/v foi realizada pela transferência asséptica e anaeróbica do conteúdo microbiano de dois frascos de penicilina (100 mL de inóculo no total) da fase de ativação, estando o biorreator em temperatura estável a 37°C e agitação mínima do biorreator (50 rpm). Foram coletadas amostras a cada duas horas para o acompanhamento do crescimento celular, bem como o consumo de substrato e a formação dos ácidos orgânicos. O pH foi monitorado constantemente e a **Figura 14** apresenta o esquema das etapas para a propagação em biorreator.

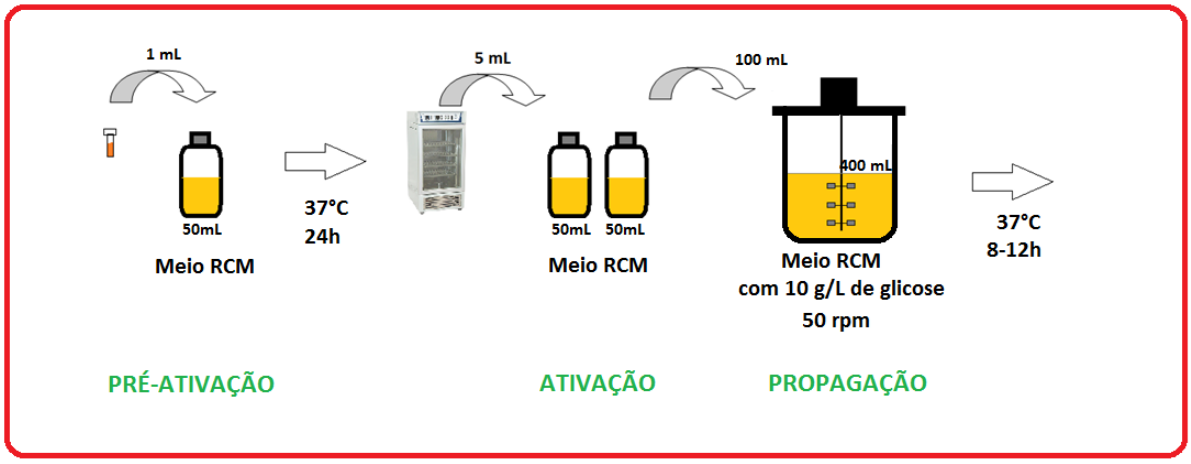


Figura 14: Etapas para a propagação de *Clostridium acetobutylicum* em biorreator.

4.5. Obtenção dos hidrolisados lignocelulósicos

Para a obtenção dos hidrolisados lignocelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar como substratos para a fermentação acetobutílica, utilizou-se os procedimentos que foram desenvolvidos nos laboratórios do CENPES e patenteados com o número PI 0605017-4 em 2006.

O bagaço de cana-de-açúcar, fornecido pela Usina Boa Vista, em Goiás, foi estocado a -20°C para evitar a deterioração durante o período deste trabalho. Primeiramente uma massa de 5 Kg de bagaço úmido (50% de teor de umidade) passou por um pré-tratamento com ácido sulfúrico a 1% (v/v) em uma relação sólido:líquido de 1:3 a 121°C por 30 minutos em um reator cônico, marca SEMCO e modelo CONIMIX de 80L de capacidade. Em seguida, o material foi prensado para separação da fração líquida e denominado hidrolisado hemicelulósico ou **HH C5**, pois possui majoritariamente xilose (pentose) como carboidrato (Gomes, 2009), além de furfural e 5-hidroximetilfurfural, moléculas produzidas pela reação do ácido com os açúcares gerados no meio e que são potenciais inibidores do processo fermentativo.

Metade da massa de material sólido, denominada celulignina, foi misturada com água para ser submetida à hidrolise enzimática com um preparado comercial rico em enzimas celulásicas denominado Cellic CTec 3, fornecido pela empresa Novozymes® (Novozymes, 2016). A hidrólise enzimática foi realizada a 50°C, 300 rpm, pH 5,0 e 20% de teor de sólidos por 72h, em biorreator instrumentado de 7,5 L, marca Infors e modelo

Labfors5, dotado de impelidor helicoidal para mistura de massa reacional com alto teor de sólidos. Utilizou-se uma carga enzimática de 15 mg de proteína por grama de celulose. A mistura reacional foi centrifugada a 30.000 g por 20 minutos a 20°C para a separação do substrato rico em carboidratos hexoses e pentoses, denominado hidrolisado celulósico ou **HC C6**, constituído majoritariamente de glicose como carboidrato.

A outra parte da celulignina foi misturada à fração líquida HH C5 para ser também hidrolisada enzimaticamente nas mesmas condições citadas para a obtenção do hidrolisado HC C5+C6 ou **HC C5+C6**, constituído de glicose e xilose como carboidratos majoritários.

A **Figura 15** apresenta um esquema básico das diferentes estratégias de fracionamento do bagaço de cana para a obtenção dos hidrolisados utilizados no presente trabalho.

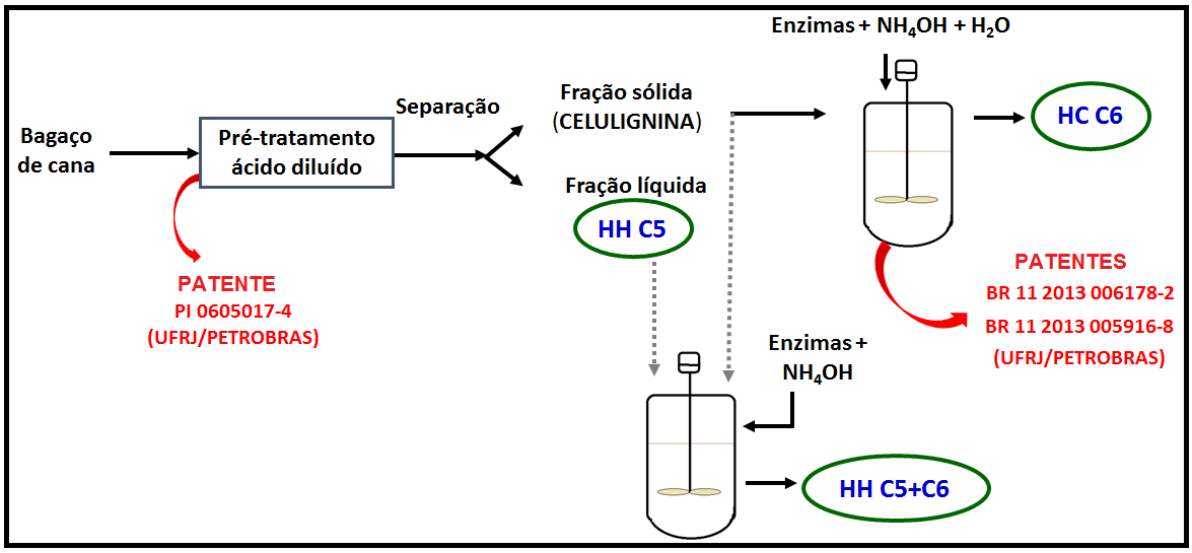


Figura 15: Esquema das estratégias de fracionamento do bagaço para a produção de hidrolisados das frações hemicelulósica (C5) e celulósica (C6).

4.6. Fermentações ABE

4.6.1. Fermentação com meios quimicamente complexos

Os ensaios de fermentação para obtenção do butanol a partir de açúcares em meios quimicamente complexos foram realizados no mesmo biorreator instrumentado do

crescimento celular (etapa de propagação), já contendo 500mL de meio. Houve a adição asséptica e anaeróbica de meio contendo glicose ou xilose (400mL) e nutrientes (100 mL) ao biorreator, utilizando mangueiras estéreis e bomba peristáltica. A composição do meio de fermentação foi obtida com base nos estudos de Sun & Liu, 2012. O preparo das soluções foi realizado na seguinte ordem:

- 1º: Preparo de nutrientes: os nutrientes foram preparados em soluções separadas (meios A, B, C e D) para não ocorrer precipitação ou degradação dos componentes durante a autoclavação. As composições e as concentrações finais de cada componente em cada solução estão descritas na **Tabela 16**.

Tabela 16: Meios A, B, C e D preparados em frascos de penicilina e esterilizados separadamente. Fonte: Sun & Liu (2012).

Meio A		**Meio B**		**Meio C**		**Meio D**	
Extrato de levedura	1,0 g/L	MgSO4	0,2 g/L	Acetato de sódio	0,01 g/L	$FeSO_4.7H_2O$	0,01 g/L
KH_2PO_4	0,5 g/L	MnSO4	0,01 g/L				
K_2HPO_4	0,5 g/L						
Volume	40 mL	Volume	20 mL	Volume	20 mL	Volume	20 mL

Obs: O volume total de nutrientes é de 100 mL.

- 2º Preparo das soluções de substratos: Soluções de glicose e xilose foram preparadas em volume de 400 mL, em garrafas separadas. Utilizou-se água purificada, tipo Milli-Q. As concentrações dos carboidratos foram preparadas de maneira a serem semelhante à composição do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.
- 3º: Todos os frascos e garrafas foram borbulhados com nitrogênio gasoso para remoção de oxigênio e em seguida fechados para a etapa de esterilização;

- 4º: Os frascos e garrafas foram esterilizados por autoclavação durante 15 minutos a 121°C;

4.6.2. Fermentação com os hidrolisados

Os ensaios de fermentação para obtenção do butanol a partir de açúcares dos hidrolisados HH C5, HC C6 e HC C5+C6 foram realizados no mesmo biorreator instrumentado do crescimento celular (etapa de propagação), já contendo 500mL de meio. Houve a adição asséptica e anaeróbica do hidrolisado (400mL) após a etapa de propagação, seguida de nutrientes (100 mL) ao biorreator, utilizando mangueiras estéreis e bomba peristáltica, do mesmo modo como descrito no item anterior e conforme o esquema da **Figura 16**.

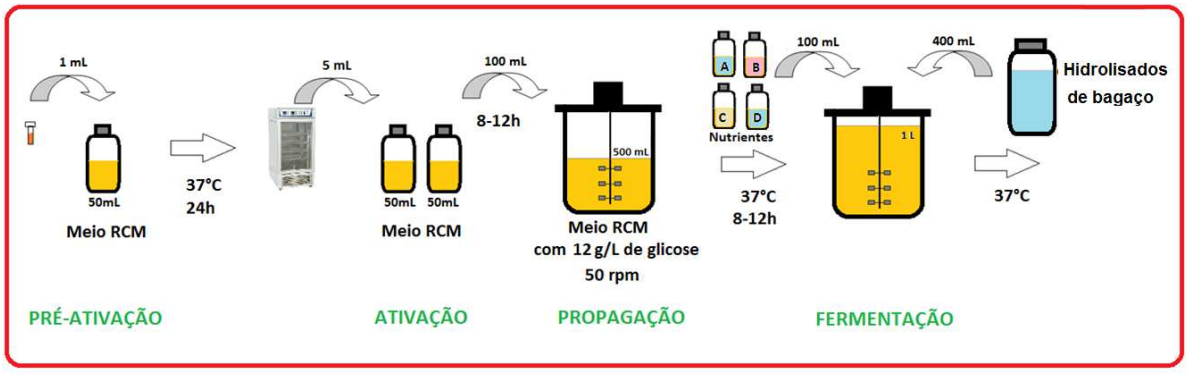


Figura 16: Etapas de pré-ativação e ativação (em frascos), propagação e fermentação (em biorreator).

4.6.3. Cálculo dos parâmetros de bioprocessos

Para os cálculos dos parâmetros de bioprocessos, tais como produtividade volumétrica em termos de butanol ou ABE (Q_P) e os rendimentos de butanol e ABE ($Y_{P/S}$) em relação aos substratos (glicose e xilose) consumidos na etapa de fermentação, foram utilizadas as seguintes equações (Liu, 2013):

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \qquad Q_P = \frac{P - P_0}{t_F}$$

Sendo:

$Y_{P/S}$: fator de rendimento de produção de butanol ou ABE ($g.g^{-1}$).
P: concentração final de produto (butanol ou ABE) (g/L);
P_0: concentração inicial de produto (butanol ou ABE) (g/L);
S_0: concentração inicial de glicose e/ou xilose (g/L);
S: concentração final de glicose e/ou xilose (g/L);
Q_P: produtividade volumétrica em butanol ou ABE (g/L.h);
t_F: tempo de fermentação (h);

4.7. Processo de pervaporação para recuperação de solventes

A **Figura 17** ilustra o fluxograma da unidade de pervaporação (PV) acoplada ao processo fermentativo para a recuperação dos solventes. No sistema ocorreu a recirculação do meio (alimentação) por bombeamento (bomba B-01) após 16h do início do processo fermentativo em um biorreator INFORS de 3,6 L (contendo 3,0 L de meio fermentativo) e em dois módulos externos (C-01 e C-02), em série com concepção placa-quadro, contendo membranas planas de silicone PDMS - poli(dimetil siloxano), com área total de 0,029 m². Do outro lado das membranas foi aplicada pressão negativa através da bomba de vácuo, medida através do manômetro PT-01. Os vapores foram recolhidos no cristalizador Cr-01, um sistema de condensador que utilizou nitrogênio líquido para condensação do permeado com altas concentrações de butanol e acetona em água.

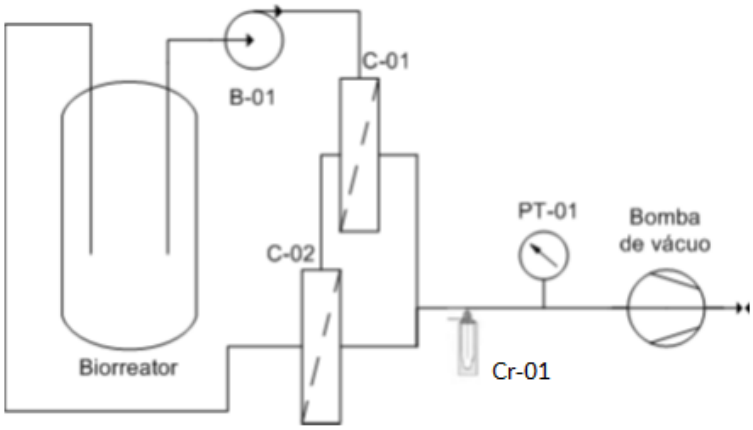


Figura 17: Fluxograma simplificado da unidade de PV para recirculação do meio com dois módulos de membrana em série.

Para o cálculo do fluxo permeado total e dos fluxos específicos de butanol e de acetona foi aplicada a equação a seguir (Zhang *et al.*, 2019).

$$J = \frac{m}{A.t}$$

Sendo:

J: fluxo permeado, em g/m².h;
m: massa de permeado total ou de butanol ou de acetona, em g;
A: área de membrana efetiva, em m²;
t: tempo de processo, em h.

4.8. Avaliações analíticas

4.8.1. Análise dos carboidratos, ácidos orgânicos e solventes

As etapas do bioprocesso foram monitoradas quantificando-se os substratos (xilose e glicose), bem como os ácidos orgânicos formados (ácido butírico e ácido acético) e os solventes (acetona, butanol e etanol). As alíquotas retiradas foram filtradas em seringa com membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno) de 0,2 µm de tamanho de poro e

transferidas para *vials* de 2 mL de HPLC com tampas rosqueadas, devidamente rotulados e colocados na bandeja termostatizada do amostrador do cromatógrafo.

Na **Figura 18** é apresentado o sistema cromatográfico equipado para atender à demanda analítica do trabalho. O cromatógrafo utilizado foi de marca Thermo Scientific, modelo Ultimate 3000, equipado com bomba binária, degaseificador, amostrador automático e termostatizado para manter as amostras refrigeradas a 10°C, além do detector de índice de refração RID.

Figura 18: Sistema cromatográfico utilizado para a quantificação dos substratos, ácidos orgânicos e solventes

As condições analíticas definidas foram:

- Coluna Vertex Eurokat® H;
- Vazão da fase móvel: 0,500 mL.min^{-1};
- Temperatura da coluna: 80,0±1,0°C;
- Detector: Índice de refração (RID) a 35,0±1,0°C;
- Amostrador automático configurado para 10,0±1,0°C;
- Tempo de análise: 50 min.

Na **Figura 19** é apresentado um cromatograma, mostrando a boa separação entre eles e a eficiência da técnica analítica. Em uma mesma corrida cromatográfica, ocorre uma boa separação e posterior quantificação dos açúcares, dos ácidos orgânicos e dos solventes.

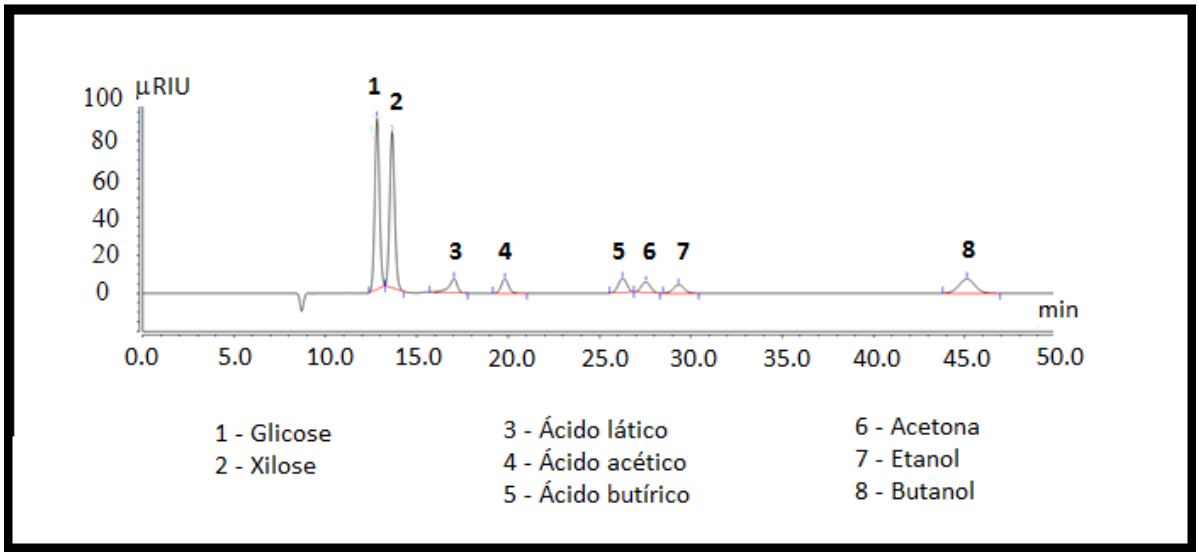


Figura 19: Cromatograma típico de uma solução contendo os açúcares (glicose e xilose), ácidos orgânicos (lático, acético e butírico) e solventes (acetona, etanol e butanol).

4.8.2. Análise de polifenóis totais

As análises de polifenóis nos hidrolisados foram realizadas segundo o Método Folin-Ciocalteau (Box, 1983) que consiste em adicionar em tubos de ensaio, 500 µL de cada amostra, 2,5 mL de uma solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteau a 10% (v/v) e da adição 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5% (m/v). Os tubos são homogeneizados e, posteriormente, mantidos em banho a 50 °C durante 5 minutos. Em seguida, estes são novamente agitados e depois resfriados até a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, são lidas as absorvâncias das soluções em um comprimento de onda de 760 nm, contra o branco que contém todos os reagentes e recebe o mesmo tratamento que as amostras, sendo adicionado um volume de 500 µL de água destilada no lugar da amostra. Para o preparo da curva de calibração, utilizou-se como padrão o ácido tânico em

concentrações aquosas, variando de 1 a 50 mg/L e o modelo utilizado para a determinação do teor de polifenóis (Tp) foi:

$$Tp = \left(\frac{Abs}{0,012} \right) x\ fd$$

Sendo: **Tp**: Teor de polifenóis

Abs: Absorvância a 760 nm

fd: fator de diluição

4.8.3. Análise da concentração celular

Para a determinação da concentração celular nos ensaios em frasco e em biorreator, foi necessário construir uma curva de calibração de massa seca de células, em g/L, *versus* absorvância. Para isso, procedeu-se as etapas de ativação e propagação em dois frascos de penicilina conforme o item 4.2 e os mesmos foram retirados durante a fase exponencial de crescimento bacteriano. O conteúdo dos frascos foi centrifugado a 6.000 rpm e 20°C, durante 20 minutos, o *pellet* formado foi ressuspenso em 100 mL de solução salina (NaCl a 0,9 % m/v) para lavagem das células e a suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições.

O *pellet* foi ressuspenso novamente em 100 mL de salina e a suspensão foi homogeneizada com a utilização de um bastão de vidro. Três alíquotas de 10,00 mL da suspensão foram transferidas para três cadinhos de porcelana de massas conhecidas e previamente secos a 105±3°C em estufa de convecção até peso constante. A diferença entre a massa do cadinho com resíduo e do cadinho vazio foi determinada como a massa de células. Esta massa foi obtida em triplicata para o cálculo de desvio padrão. O restante da suspensão foi utilizado para a realização de diluições em tubos de ensaio de 10 mL, conforme protocolo apresentado na **Tabela 17**. Foram utilizadas pipetas automáticas de diferentes faixas de volume (50 a 200 µL, 100 a 1000 µL e 1 a 5 mL). Todas as diluições foram realizadas em duplicata.

Tabela 17: Diluições da suspensão para leituras de absorvância em comprimento de onda de 600 nm

Tubo	Volume de suspensão de células (mL)	Volume de água (mL)	Percentual em volume da suspensão celular
1	5,00	0	-
2	4,00	1,00	80%
3	3,00	2,00	60%
4	2,00	3,00	40%
5	1,00	4,00	20%
6	0,50	4,50	10%
7	0,25	4,75	5%
8	0,20	4,80	4%
9	0,10	4,90	2%
10	0,05	4,95	1%

Os tubos de 10 mL foram usados como cubetas em espectrofotômetro, marca HACH e modelo DR5000 e as leituras de absorvância foram realizadas em duplicata em comprimento de onda (λ) de 600 nm. Utilizou-se como branco a solução salina.

Com o resultado da média das massas secas obtidas nos cadinhos, calculou-se a concentração de células em cada diluição realizada e foram plotados os resultados das concentrações celulares com os de absorvância para obtenção do modelo de calibração ***Y = 0,2056.X***, sendo Y a absorvância, medida no comprimento de onda de 600 nm e X a concentração de células, em g/L, conforme a **Figura 20**. O coeficiente de determinação obtido nesta calibração foi R^2 = 0,9978, o que representa uma boa qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais.

Para a obtenção da concentração celular em uma amostra obtida em frasco ou biorreator, tomou-se uma alíquota de 1 mL da mesma em microtubo de 1,5 mL. A amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos em minicentrífuga de bancada, marca *Eppendorf* e modelo *MiniSpin*. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de solução salina, com utilização de pipeta automática (100 a 1000 µL) e agitador de tubos tipo vórtex. Em seguida o microtubo foi novamente centrifugado nas mesmas condições mencionadas, o sobrenadante foi novamente descartado e adicionou-se salina no microtubo até a marca de 1 mL. Utilizou-se o agitador de tubos para a ressuspensão

celular e o conteúdo foi transferido, com auxílio da pipeta automática, para um tubo, marca HACH de 10 mL, contendo 4 mL de solução salina (diluição de 5 vezes).

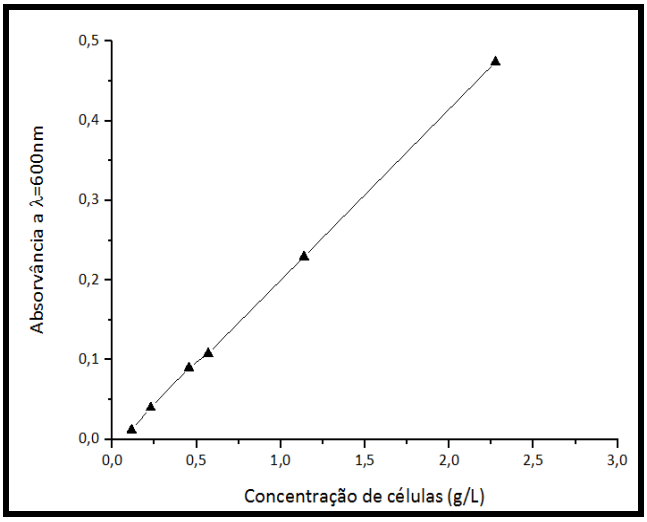


Figura 20: Curva de calibração para determinação da concentração celular de *Clostridium acetobutylicum* durante os ensaios.

O tubo foi agitado para homogeneização e realizada a leitura da absorvância em comprimento de onda de 600 nm (Abd-Alla *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014;). Pelo modelo de calibração e considerando a diluição aplicada, obteve-se a concentração de células em g/L em cada amostra.

4.9. Avaliação estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos dos planejamentos de experimentos e a geração das tabelas e curvas de contorno foi utilizado o *software* ***Experimental Design*** (http://experimental-design.protimiza.com.br), baseado no livro "Planejamento Experimental e Otimização de Processos" (Rodrigues & Iemma, 2014).

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5.1. Perfil de crescimento e calibração para análise de concentração celular

A etapa de ativação de *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228 com o meio rico comercial RCM em frascos de penicilina durante 24 horas mostrou-se eficiente na geração de inóculo para os estudos de propagação, com produção celular em torno de 3,5 g/L.

Para a avaliação do crescimento microbiano durante o processo de propagação e de fermentação, utilizou-se glicose como fonte de carbono e, assim, foi obtido primeiramente o perfil cinético de crescimento bacteriano para a determinação do melhor tempo de propagação, de maneira a conhecer a fase exponencial de crescimento. Este período é o de maior atividade metabólica das células. A **Figura 21** apresenta o perfil de crescimento microbiano, obtido do experimento de propagação em biorreator, conforme item 4.4 de Materiais e Métodos.

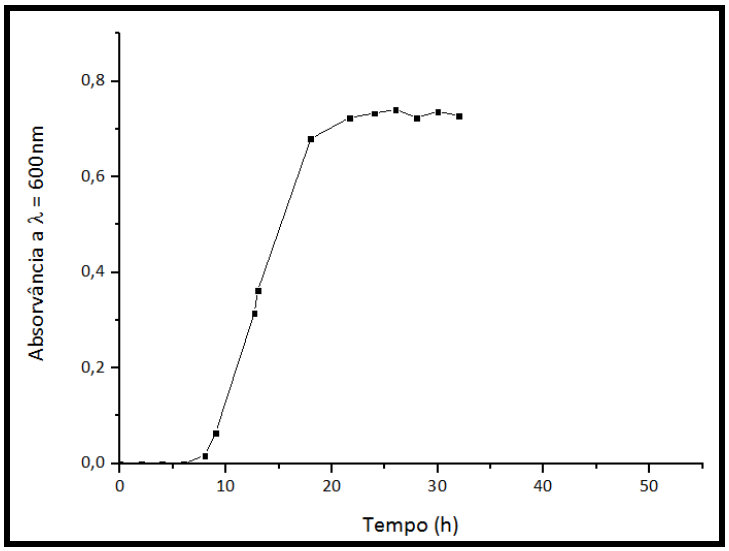


Figura 21: Crescimento de *Clostridium acetobutylicum* em meio RCM, em biorreator de 1,3L. Condições: Temperatura de 37°C e agitação de 50 rpm.

Nota-se que a fase de crescimento efetivo foi entre 10 e 18 horas. A partir da curva de calibração, determinou-se as concentrações de células a partir da leitura das absorvâncias do gráfico da **Figura 21**. Para a determinação da taxa específica de crescimento (μ), foram plotados o logaritmo neperiano de X/Xo (razão entre as concentrações celulares em cada tempo e a inicial) em cada tempo. O gráfico da **Figura 22** apresenta os resultados, obtendo-se para μ o valor de 0,21 h^{-1}.

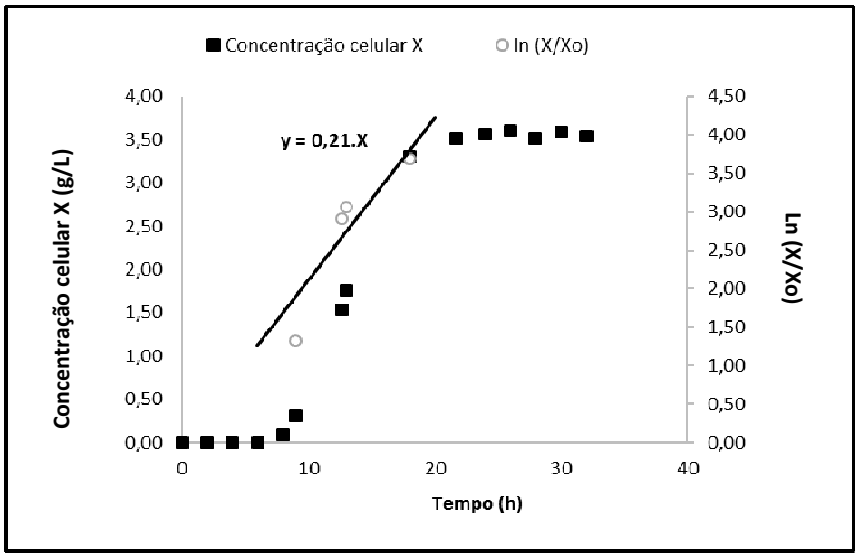


Figura 22: Curva de crescimento celular e determinação de μ.

5.2. Primeiro delineamento experimental-PB12

Na **Tabela 12** é apresentada a composição do meio comercial de propagação do microrganismo RCM, constituído de nove componentes, sendo três fontes de vitaminas e proteínas (extrato de carne, peptona e extrato de levedura), que apresentam alto custo e podem inviabilizar a produção em nível industrial. Além destes componentes do meio padrão RCM, o mesmo possui duas fontes de carboidrato (glicose e amido), L-cisteína HCl para manter a anaerobiose no meio, ágar e sais (cloreto de sódio e acetato de sódio), o que onera mais ainda o processo. Torna-se, portanto, necessária a otimização deste meio para a redução dos custos com operação do processo, utilizando-se da ferramenta estatística de planejamento de experimentos.

Em uma avaliação inicial, resolveu-se eliminar o amido e deixar somente a glicose como fonte de carboidrato pelo fato de que o trabalho objetiva a fermentação de açúcares de origem lignocelulósica (glicose e xilose) e não amilácea. O extrato de carne também foi eliminado nesta avaliação inicial mantendo-se somente duas fontes de proteínas e vitaminas (extrato de levedura e peptona), haja vista que de dez referências da literatura apenas quatro utilizaram este componente no meio de propagação celular (Abd-Alla *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Moradi *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2013; Ranjan *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014; Raganati *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014; Börner *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015).

Como os hidrolisados lignocelulósicos possuem xilose, decidiu-se incluir este carboidrato na avaliação da composição do meio, visando a possível adaptação do microrganismo ao açúcar e observando a resposta em termos de crescimento celular.

Os resultados obtidos dos ensaios da matriz PB12, acrescidos de 3 pontos centrais e 2 controles estão reportados na **Tabela 18**. Como se pode observar nesta tabela, a partir de doze horas de crescimento bacteriano não houve aumento significativo na concentração celular e, em alguns casos, após este tempo, observou-se a diminuição da biomassa. Na **Figura 23** é apresentada a cinética de crescimento celular médio dos ensaios do ponto central, realizados em triplicata, ou seja, os de número 13, 14 e 15, que apresentam uma variação pequena entre eles.

Tabela 18: Resultados de concentração celular do primeiro planejamento de experimentos, PB12. C1 e C2 são ensaios controle. PP: peptona, EL: extrato de levedura, Cist: cisteína e AS: Acetato de sódio. As informações do ponto central estão em negrito. A coluna em amarelo indica as concentrações máximas obtidas na maioria dos ensaios.

Ensaios	PP	EL	Xilose	NaCl	Cist	AS	Ágar	Glicose	Concentração celular (g/L) em função do tempo (h)						
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h
1	10	1	7	0	0	0	0,5	7	1,39	3,93	4,84	11,24	11,20	8,06	13,60
2	10	3	3	1	0	0	0	7	0,98	3,02	4,79	10,11	10,20	8,70	9,52
3	0	3	7	0	0,5	0	0	3	0,57	2,61	2,89	4,75	5,61	4,48	4,70
4	10	1	7	1	0	3	0	3	0,84	0,57	3,75	8,61	9,56	8,11	8,70
5	10	3	3	1	0,5	0	0,5	3	1,66	2,75	3,75	11,65	10,52	10,15	12,01
6	10	3	7	0	0,5	3	0	7	0,75	2,43	3,02	5,38	4,98	5,52	5,02
7	0	3	7	1	0	3	0,5	3	1,12	2,61	2,93	4,66	4,88	2,84	7,70
8	0	1	7	1	0,5	0	0,5	7	0,93	1,66	4,29	6,66	3,98	4,52	6,02
9	0	1	3	1	0,5	3	0	7	0,89	1,93	2,16	3,75	3,61	3,16	3,07
10	10	1	3	0	0,5	3	0,5	3	1,43	2,52	3,25	7,38	5,84	6,61	9,15
11	0	3	3	0	0	3	0,5	7	1,07	3,39	3,75	5,11	5,66	3,93	8,88
12	0	1	3	0	0	0	0	3	1,39	1,25	1,98	3,52	0,98	2,57	3,07
13	**5**	**2**	**5**	**2,5**	**0,25**	**1,5**	**0,25**	**5**	**1,02**	**3,34**	**2,84**	**8,70**	**7,16**	**7,11**	**7,47**
14	**5**	**2**	**5**	**2,5**	**0,25**	**1,5**	**0,25**	**5**	**1,34**	**2,80**	**3,57**	**10,15**	**8,06**	**6,25**	**7,88**
15	**5**	**2**	**5**	**2,5**	**0,25**	**1,5**	**0,25**	**5**	**1,21**	**3,20**	**4,07**	**8,97**	**7,47**	**6,34**	**6,29**
C1*	10	3	0	5	0,5	3	0,50	5	1,80	3,98	4,11	14,24	10,06	8,52	10,02
C2**	10	3	5	5	0,5	3	0,50	5	1,30	4,20	5,97	15,65	17,37	18,28	16,47

*C1: Composição do Meio RCM, conforme Tabela 12. **C2: Composição do Meio RCM, incluindo a xilose.

A linha pontilhada observada no gráfico indica o tempo ideal de propagação e crescimento celular e as condições para o início do processo fermentativo. O ensaio controle C2 (meio RCM comercial contendo 5 g/L de xilose) foi o que apresentou maior crescimento das células com alto consumo de glicose e xilose (**Tabela 18**). Entretanto, observou-se pouca utilização do substrato xilose na maioria dos outros experimentos e, em alguns casos, este consumo foi muito lento.

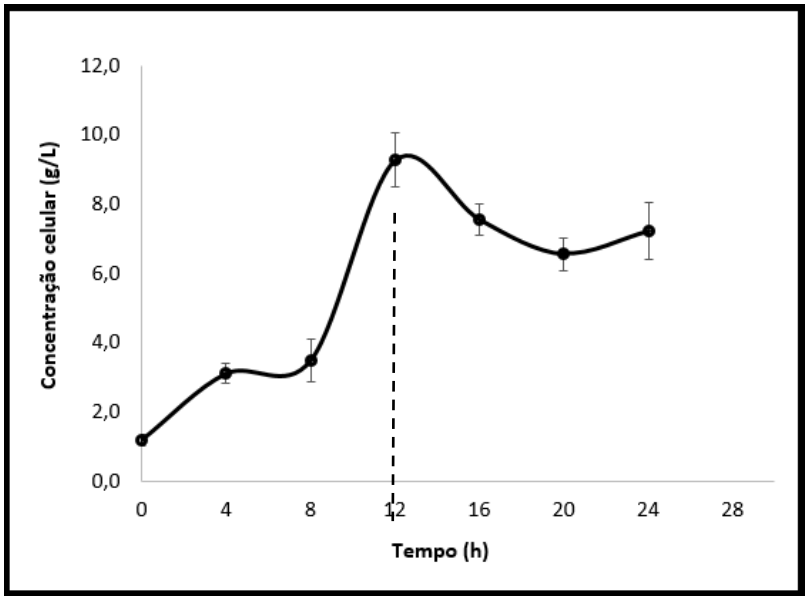


Figura 23: Cinética da etapa de propagação celular do ensaios do ponto central. Os valores são resultados das médias das concentrações celulares em cada tempo.

Segundo alguns autores, as bactérias do gênero *Clostridium* podem utilizar uma variedade de carboidratos, como glicose, xilose, arabinose e manose. Porém, existe a probabilidade de haver repressão catabólica pela presença de substratos preferidos como a glicose, que irá reduzir ou mesmo suprimir a utilização de outros açúcares. Em algumas espécies solventogênicas há necessidade até mesmo de modificação genética para habilitar o microrganismo a utilizar diferentes carboidratos (Tracy *et al.*, 2012). A repressão catabólica consiste na redução das atividades de enzimas envolvidas no catabolismo da xilose (Wu *et al.*, 2015).

A **Tabela 19** apresenta o consumo de glicose e xilose dos ensaios em meio sintético no tempo de 12 horas, em termos percentuais para comparação. Os resultados menores que 5% retratam que não houve consumo, considerando os erros experimentais de amostragem e da análise cromatográfica.

Quanto ao substrato glicose, percebe-se consumo total em 12h nos ensaios controle e em 6 dos 15 experimentos do planejamento, caracterizando assim a preferência do microrganismo por este carboidrato frente à xilose. Gu e colaboradores (2014) reportaram que, embora as bactérias do gênero *Clostridium* possam utilizar xilose, elas o fazem de maneira ineficiente. Portanto, não se justifica o uso deste carboidrato como componente para a etapa de propagação celular.

Tabela 19: Consumo de glicose e xilose em cada ensaio do PB12, em base mássica, calculado pela razão entre a diferença de concentração entre os tempos 12 h e 0 h e a concentração no tempo inicial.

Ensaio	Consumo de glicose	Consumo de xilose
1	65%	-
2	89%	1%
3	100%	-
4	100%	21%
5	100%	27%
6	71%	3%
7	100%	10%
8	16%	-
9	48%	2%
10	100%	15%
11	67%	8%
12	68%	1%
13	94%	-
14	98%	2%
15	100%	-
C1	100%	-
C2	100%	100%

Os autores citam como causa deste fenômeno o fato de os genes relacionados à regulação e metabolismo da xilose estarem dispersos em várias localizações diferentes no cromossoma de *C. acetobutylicum* (Gu *et al.*, 2014).

Durante a etapa de crescimento celular, há a produção de ácidos orgânicos o que caracteriza a fase acidogênica. Segundo Kumar e colaboradores (2011), a bactéria cresce exponencialmente nesta fase, com formação de ácido acético e ácido butírico, fazendo baixar o pH para valores próximos a 4,5. Ainda nesta fase, a via glicolítica é ativada para produzir piruvato pelo consumo da glicose. Em seguida, o piruvato é convertido a acetil-CoA, que é o precursor para a síntese de acetato, butirato, etanol, butanol e acetona, em meio anaeróbico (Kumar *et al.*, 2011).

O gráfico da **Figura 24** apresenta os perfis cinéticos da produção dos ácidos acético e butírico no ponto central. As concentrações destes ácidos no tempo inicial foram decorrentes do inóculo.

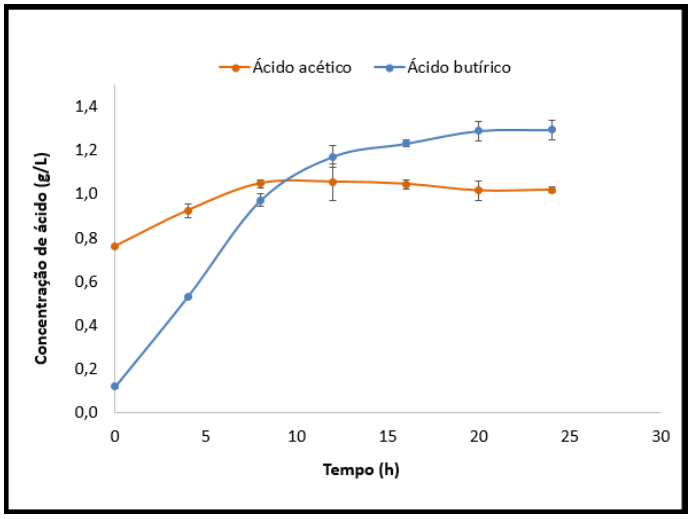


Figura 24: Perfis cinéticos dos ensaios do ponto central quanto à formação de ácido acético e ácido butírico.

Os pontos do gráfico são resultados das médias dos ensaios em triplicata. Percebe-se uma tendência de aumento nos teores destes ácidos, o que é característico da fase acidogênica, conforme já abordado no item 2.4.

5.2.1. Análise dos efeitos com relação à concentração celular

As **Tabelas 20, 21** e **22** apresentam os resultados das análises estatísticas dos efeitos de todas as variáveis de resposta: concentração celular, xilose, glicose, ácido acético e ácido butírico. Os valores de *p-valor* abaixo de 0,10 (ou seja, 90% de confiança) são relativos a efeitos estatisticamente significativos e os mesmos estão destacados em vermelho. O valor 90% de confiança foi definido a princípio, pois em processos biológicos e muitas variáveis envolvidas é preferível ser menos rigoroso, a deixar algum fator importante sem ser considerado na próxima etapa do estudo (Rodrigues & Iemma, 2014).

Conforme a **Tabela 20-a**, observa-se que quanto maior a quantidade de peptona adicionada ao meio, maior a concentração de células formadas durante todo o tempo de propagação. Este efeito é esperado, pois a peptona é rica em vitaminas e em aminoácidos, fontes importantes para a replicação celular. Porém, não foi observado o aumento significativo do crescimento celular utilizando o extrato de levedura em todos os tempos na faixa de concentração utilizada (1 a 3 g/L).

O cloreto de sódio (NaCl) só apresentou uma pequena influência positiva no tempo de 12 horas, mas nos demais períodos um leve efeito não significativo, tal como a xilose e a cisteína.

A glicose apresentou efeito positivo para o crescimento celular somente em 4 horas porque o consumo deste substrato é rápido, não sendo verificado o efeito significativo deste componente nos demais tempos. Porém, conforme já mencionado, a glicose é fonte de energia para a obtenção de ATP para as células e, portanto, essencial para a etapa de propagação.

Em relação ao acetato de sódio, o efeito foi negativo, tanto em 4h como em 12 h de propagação, não se justificando a adição deste componente no meio de cultivo.

Quanto ao ágar, os resultados não foram consistentes, pois em alguns tempos (4h e 12h) apresentou efeito positivo, com valores de *p-valor* bem abaixo de 0,10. Porém, conforme a **Tabela 20-a**, em 8h este componente mostrou-se indiferente com relação ao crescimento celular. Analisando-se dados de dez trabalhos na literatura, apenas quatro utilizam ágar na composição do meio de propagação, devido ao uso do meio comercial RCM (Abd-Alla *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Moradi *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2013; Ranjan *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014; Raganati *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014; Börner *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015).

5.2.1. Análise dos efeitos com relação ao consumo de xilose

À medida que a concentração de peptona aumenta no meio, maior também é o consumo da xilose observado ao longo de todo o tempo de propagação (**Tabela 20-b**). No caso do extrato de levedura, houve redução no consumo da xilose até 8 horas de propagação e depois deste tempo o efeito da presença deste nutriente tornou-se não significativo com relação ao uso da xilose pelas células. É importante ressaltar que houve presença de glicose em todos os ensaios. Isto fez com que houvesse uma preferência natural dos microrganismos por este açúcar, fenômeno comprovado através dos efeitos positivos da glicose na maior parte do tempo com relação à concentração residual de xilose no meio, ou seja, quanto maior o teor de glicose, maior foi a quantidade remanescente de

xilose. As variáveis cloreto de sódio, cisteína e acetato de sódio exerceram efeitos não estatisticamente significativos ao longo do processo, dentro das faixas estudadas considerando um nível de confiança de 90% (valores de *p-valor* maiores que 0,10).

Tabela 20: Efeito da concentração celular (a) e xilose (b) na etapa de propagação em função do tempo a 90% de confiança. Em vermelho são os efeitos estatisticamente significativos (p-valor < 0,10).

(a)

Variável	código	unidade	-1	0	+1	Concentração celular (g/L)						Análise estatística dos efeitos
						4h		8h		12h		
						Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	
Média						**2,60**	**0,0001**	**3,37**	**0,0001**	**7,07**	**0,0001**	
Curvatura						1,03	0,1445	0,24	0,8083	**4,42**	**0,0456**	
Peptona	X_1	g/L	0	5	10	-0,12	0,7054	**1,06**	**0,0859**	**3,99**	**0,0066**	↑Peptona ↑Concentração celular em função do tempo
Extrato levedura	X_2	g/L	1	2	3	0,41	0,2211	0,30	0,5523	-0,25	0,7642	NES na faixa estudada
Xilose	X_3	g/L	3	5	7	0,24	0,4532	0,18	0,7172	0,29	0,7232	NES na faixa estudada
NaCl	X_4	g/L	0	2,5	5	-0,19	0,5491	0,17	0,7396	**1,67**	**0,0959**	Praticamente indiferente (NES) na faixa estudada
Cisteína	X_5	g/L	0	0,25	0,5	0,27	0,4022	-0,61	0,2647	-0,28	0,7322	NES na faixa estudada
Acetato de sódio	X_6	g/L	0	1,5	3	-0,71	0,0688	-0,45	0,3861	**-2,50**	**0,0314**	↑ Acetato ↓ Concentração celular
Ágar	X_7	g/L	0	0,25	0,5	**1,25**	**0,0119**	0,54	0,3083	**2,09**	**0,0530**	↑Ágar ↑Concentração celular
Glicose	X_8	g/L	3	5	7	**1,08**	**0,0192**	0,56	0,2968	0,61	0,4722	↑Glicose ↑Concentração celular em 4h

*NES: Não estatisticamente significativo.

(b)

Variável	código	unidade	-1	0	+1	Concentração de xilose (g/L)						Análise estatística dos efeitos
						4h		8h		12h		
						Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	
Média						3,94	0,0000	**3,85**	**0,0000**	**3,74**	**0,0000**	
Curvatura						-0,21	0,0446	-0,03	0,7545	0,49	0,1007	
Peptona	X_1	g/L	0	5	10	-0,60	0,0001	**-0,77**	**0,0000**	**-0,90**	**0,0015**	↑Peptona ↓Xilose residual
Extrato levedura	X_2	g/L	1	2	3	0,18	0,0079	**0,18**	**0,0127**	0,10	0,4281	↑Extrato de levedura ↑Xilose residual até 8h
Xilose	X_3	g/L	3	5	7	2,95	0,0000	**2,94**	**0,0000**	**2,93**	**0,0000**	↑Xilose ↑Xilose residual
NaCl	X_4	g/L	0	2,5	5	0,01	0,8411	**-0,18**	**0,0123**	-0,24	0,1010	Praticamente NES na faixa estudada
Cisteína	X_5	g/L	0	0,25	0,5	-0,01	0,8189	**0,25**	**0,0037**	0,19	0,1664	NES em 12h
Acetato de sódio	X_6	g/L	0	1,5	3	**0,15**	**0,0132**	**-0,16**	**0,0181**	-0,23	0,1165	NES em 12h
Ágar	X_7	g/L	0	0,25	0,5	**-0,26**	**0,0020**	**-0,14**	**0,0279**	-0,21	0,1457	NES em 12h
Glicose	X_8	g/L	3	5	7	0,03	0,4404	**0,40**	**0,0006**	**0,45**	**0,0173**	↑Glicose ↑ Xilose residual a partir de 8h

*NES: Não estatisticamente significativo.

Tabela 21: Efeito da concentração de glicose (a) e ácido acético (b) na etapa de propagação em função do tempo a 90% de confiança. Em vermelho são os efeitos estatisticamente significativos (p-valor < 0,10).

(a)

Variável	código	unidade	-1	0	+1	Concentração de glicose (g/L)						Análise estatística dos efeitos
						4h		8h		12h		
						Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	
Média						**2,98**	**0,0000**	**1,39**	**0,0003**	**1,06**	**0,0010**	
Curvatura						-0,51	0,1652	**-1,04**	**0,0941**	**-1,88**	**0,0191**	
Peptona	X_1	g/L	0	5	10	0,08	0,6244	**-0,76**	**0,0338**	**-0,73**	**0,0413**	↑Peptona ↓Glicose residual
Extrato levedura	X_2	g/L	1	2	3	-0,16	0,3474	**-0,55**	**0,0810**	**-0,77**	**0,0365**	↑Extrato de levedura ↓Glicose residual
Xilose	X_3	g/L	3	5	7	0,05	0,7410	-0,04	0,8864	0,10	0,7062	NES na faixa estudada
NaCl	X_4	g/L	0	2,5	5	0,00	0,9793	-0,07	0,7749	0,07	0,7781	NES na faixa estudada
Cisteína	X_5	g/L	0	0,25	0,5	**-0,35**	**0,0806**	0,33	0,2385	0,39	0,1899	NES em 12h
Acetato de sódio	X_6	g/L	0	1,5	3	0,16	0,3462	0,02	0,9216	-0,04	0,8786	NES em 12h
Ágar	X_7	g/L	0	0,25	0,5	**-0,53**	**0,0230**	-0,02	0,9226	0,19	0,4894	NES em 12h
Glicose	X_8	g/L	3	5	7	**2,69**	**0,0001**	**2,37**	**0,0006**	**1,86**	**0,0017**	↑Glicose ↑ Glicose residual

*NES: Não estatisticamente significativo.

(b)

Variável	código	unidade	-1	0	+1	Concentração de ácido acético (g/L)						Análise estatística dos efeitos
						4h		8h		12h		
						Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	
Média						**0,90**	**0,0000**	**1,05**	**0,0000**	**1,04**	**0,0000**	
Curvatura						0,05	0,4352	0,01	0,9122	0,03	0,7977	
Peptona	X_1	g/L	0	5	10	0,04	0,2132	**0,10**	**0,0592**	0,11	0,1220	NES em 12h
Extrato levedura	X_2	g/L	1	2	3	0,03	0,3861	**0,08**	**0,0955**	0,09	0,1971	NES em 12h
Xilose	X_3	g/L	3	5	7	0,00	0,8740	-0,02	0,6439	0,00	0,9707	NES na faixa estudada
NaCl	X_4	g/L	0	2,5	5	-0,01	0,8430	0,01	0,7221	0,06	0,3833	NES na faixa estudada
Cisteína	X_5	g/L	0	0,25	0,5	-0,02	0,5122	-0,02	0,6439	-0,01	0,8544	NES na faixa estudada
Acetato de sódio	X_6	g/L	0	1,5	3	**1,11**	**0,0000**	**1,12**	**0,0000**	**1,13**	**0,0000**	↑ Acetato de sódio ↑Ácido acético
Ágar	X_7	g/L	0	0,25	0,5	0,04	0,1662	0,06	0,1816	0,03	0,6760	NES na faixa estudada
Glicose	X_8	g/L	3	5	7	0,04	0,2241	0,02	0,6067	-0,01	0,8118	NES na faixa estudada

*NES: Não estatisticamente significativo.

Tabela 22: Efeito da concentração de ácido butírico na etapa de propagação em função do tempo a 90% de confiança. Em vermelho são os efeitos estatisticamente significativos (p-valor < 0,10).

Variável	código	unidade	-1	0	+1	Concentração de ácido butírico (g/L)						Análise estatística dos efeito
						4h		8h		12h		
						Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	
Média						**0,40**	**0,0000**	**0,81**	**0,0000**	**0,92**	**0,0000**	
Curvatura						**0,26**	**0,0245**	**0,32**	**0,0441**	**0,50**	**0,0530**	
Peptona	X_1	g/L	0	5	10	-0,01	0,7892	**0,18**	**0,0278**	**0,27**	**0,0432**	↑ Peptona ↑Ácido butírico a partir de 8h
Extrato levedura	X_2	g/L	1	2	3	**0,096**	**0,0613**	**0,17**	**0,0344**	**0,23**	**0,0669**	↑ Extrato de levedura ↑Ácido butírico
Xilose	X_3	g/L	3	5	7	-0,03	0,4759	0,01	0,8177	-0,02	0,8255	NES na faixa estudada
NaCl	X_4	g/L	0	2,5	5	-0,03	0,4712	0,009	0,8801	0,02	0,8159	NES na faixa estudada
Cisteína	X_5	g/L	0	0,25	0,5	0,06	0,1775	-0,033	0,5722	-0,08	0,4449	NES na faixa estudada
Acetato de sódio	X_6	g/L	0	1,5	3	-0,007	0,8604	0,06	0,3048	0,16	0,1640	NES na faixa estudada
Ágar	X_7	g/L	0	0,25	0,5	**0,13**	**0,0228**	0,03	0,6184	-0,07	0,4708	NES em 8 e 12h
Glicose	X_8	g/L	3	5	7	**0,12**	**0,0344**	0,07	0,2628	0,06	0,5755	NES em 8 e 12h

5.2.2. Análise dos efeitos com relação ao consumo de glicose

Conforme observado na **Tabela 21-a**, tanto peptona quanto extrato de levedura apresentaram efeitos positivos e significativos quanto ao consumo de glicose em até 12 horas de propagação. As demais variáveis independentes, como xilose, cloreto de sódio, acetato de sódio e ágar praticamente não apresentaram efeito significativo para o consumo da glicose, ou seja, não têm importância para o metabolismo celular nas faixas de concentração estudadas. Um maior teor de glicose no meio sinalizou positivamente para uma maior concentração residual deste substrato.

5.2.3. Análise dos efeitos com relação à produção de ácido acético

De acordo com a **Tabela 21-b**, os componentes nas faixas de concentração avaliadas não foram significativos estatisticamente ao longo do tempo e de maneira contínua para a produção de ácido acético no meio. A única exceção foi o acetato de sódio que, apesar de ser adicionado desta forma, foi detectado e quantificado por cromatografia como ácido acético, contribuindo para o aumento da variável de resposta.

5.2.4. Análise dos efeitos com relação à produção de ácido butírico

Analisando a **Tabela 22**, pode-se observar que, em até 12 horas da etapa de propagação celular, a peptona e o extrato de levedura têm efeitos positivos sobre a produção de ácido butírico. Os demais componentes, como xilose, cloreto de sódio, acetato de sódio e cisteína não foram estatisticamente significativos, ou seja, foram indiferentes. Sendo assim, o uso destes componentes no meio torna-se desnecessário com relação à geração do ácido em questão. Ágar e glicose apresentaram significância apenas no início da propagação (4h).

Com base na análise dos efeitos e significância dos componentes do meio com relação ao crescimento celular, consumo de carboidratos e formação dos ácidos orgânicos na etapa de propagação, realizou-se um segundo delineamento sequencial, um DCCR

(Delineamento Composto Central Rotacional) para a otimização das variáveis peptona, extrato de levedura e glicose. A **Tabela 23** contém o resumo desta análise, definindo-se as novas faixas de concentração dos componentes para o DCCR.

Tabela 23: Respostas obtidas no planejamento PB12 e condições propostas para cada variável para o planejamento DCCR.

Variáveis independentes	Código	Unidade	Nível -1	Nível 0	Nível +1	Estatisticamente significativo (12h) *p-valor* < 0,1	Condições para a próxima etapa
Peptona	X_1	g/L	0	5	10	Sim	Avaliar de 0 a 6 g/L
Extrato de levedura	X_2	g/L	1	2	3	Sim	Avaliar de 0 a 6 g/L
Xilose	X_3	g/L	3	5	7	Não	Remover
NaCl	X_4	g/L	0	2,5	5	Não	Remover
Cisteína-HCl	X_5	g/L	0	0,25	0,5	Não	Remover
Acetato de sódio	X_6	g/L	0	1,5	3	Não	Remover
Ágar	X_7	g/L	0	0,25	0,5	Não	Remover
Glicose	X_8	g/L	3	5	7	Sim	Avaliar de 4 a 12 g/L

As variáveis xilose, NaCl, cisteína-HCl, acetato de sódio e ágar foram removidas porque no primeiro delineamento as faixas destes componentes foram estudadas a partir da ausência dos mesmos (nível inferior -1). Como elas não apresentaram efeitos estatisticamente significativos e nos pontos centrais (valores intermediários estudados) não apresentaram valores de máxima resposta (análise de curvatura), pode-se então suprimi-las. Isto diminui significativamente o custo do meio de cultivo, além de facilitar a operação do processo por demandar menos reagentes, manipulação, estocagem, transporte etc.

Um fato importante a ressaltar é que, em paralelo aos ensaios dos delineamentos experimentais, foram realizados os de controle com o meio de cultivo de referência (RCM) para comparação dos resultados obtidos. Esta estratégia forneceu maior segurança em relação à obtenção do meio otimizado de menor custo e que garante pelo menos o mesmo desempenho de um meio comercial.

Para aumentar o crescimento celular e minimizar custo do meio foram tomadas as seguintes decisões:

1. Quanto à **peptona** decidiu-se diminuir um pouco a faixa de estudo, pois é o nutriente mais caro;
2. Quanto ao **extrato de levedura**, decidiu-se ampliar um pouco a faixa de concentração para compensar a diminuição da peptona e verificar a obtenção de ganho no crescimento celular;
3. Quanto à **glicose**, decidiu-se aumentar a faixa, pois foi observado que houve um rápido consumo nas primeiras horas de crescimento celular para a maioria dos ensaios.

Portanto, realizou-se um DCCR para os três fatores significativos nas seguintes faixas de concentração: extrato de levedura (0 a 6 g/L), concentração de peptona (0 a 6 g/L) e glicose (4 a 12 g/L).

5.3. Segundo delineamento experimental – DCCR

A **Tabela 24** apresenta todas as condições dos ensaios do segundo planejamento, DCCR, bem como os resultados da variável resposta concentração celular para cada condição e em cada tempo em que foram coletadas as amostras (0, 4, 8 e 12 horas). Para a etapa de propagação o mais importante é o modelo obtido para a concentração celular. Portanto, a partir dos resultados obtidos, foi possível construir o modelo parametrizado desta variável em função das variáveis independentes codificadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, para o tempo de 12 horas de propagação, conforme descrito abaixo.

$$\textbf{\textit{Conc. Celular (g/L)}} = 7{,}68 + 0{,}49\, x_1 - 0{,}27\, x_1^2 + 0{,}86\, x_2 + 0{,}44\, x_3 - 0{,}32\, x_3^2 - 0{,}40\, x_1 x_2$$

A porcentagem de variação explicada (R^2) a 90% de confiança obtida foi 89,5%. O R^2 é uma medida da qualidade do ajustamento da reta de regressão aos pontos experimentais e leva em consideração a falta de ajuste e o erro puro obtido pelos ensaios do ponto central (Rodrigues & Iemma, 2014).

Tabela 24: Condições dos ensaios do DCCR e concentração celular avaliada em função do tempo. PP: Peptona; EL: Extrato de levedura e Gli: Glicose

Ensaios	X_1 (PP)	X_2 (EL)	X_3 (Gli)	PP (g/L)	EL (g/L)	Gli (g/L)	Concentração Celular (g/L)			
							0h	4h	8h	12h
1	-1	-1	-1	1,2	1,2	5,6	0,93	1,43	4,48	4,88
2	1	-1	-1	4,8	1,2	5,6	0,80	1,16	6,66	6,38
3	-1	1	-1	1,2	4,8	5,6	1,07	1,57	6,34	7,47
4	1	1	-1	4,8	4,8	5,6	1,16	2,16	7,70	7,65
5	-1	-1	1	1,2	1,2	10,4	1,98	1,43	4,20	5,88
6	1	-1	1	4,8	1,2	10,4	1,16	1,66	5,84	7,38
7	-1	1	1	1,2	4,8	10,4	0,98	1,66	6,52	8,79
8	1	1	1	4,8	4,8	10,4	1,30	1,75	4,66	8,38
9	-1,68	0	0	0	3	8	1,57	1,66	5,38	5,75
10	1,68	0	0	6	3	8	1,21	1,30	7,43	8,06
11	0	-1,68	0	3	0	8	1,25	1,30	2,70	6,07
12	0	1,68	0	3	6	8	1,25	1,89	9,47	8,43
13	0	0	-1,68	3	3	4	0,98	1,43	5,84	6,16
14	0	0	1,68	3	3	12	1,12	1,34	4,43	7,34
15	0	0	0	3	3	8	1,07	1,39	6,29	8,70
16	0	0	0	3	3	8	1,48	1,48	5,93	7,65
17	0	0	0	3	3	8	1,21	1,57	4,25	7,52
C1	Meio RCM comercial						1,48	1,80	3,93	6,61
C2	Meio RCM comercial						1,30	1,39	5,07	6,34
C3	Meio RCM comercial						1,02	1,34	4,98	6,20

Portanto, o modelo apresentado para concentração celular, por exemplo, explica 89,5% da variação total da resposta, em função das variáveis estudadas. Este valor é muito bom, levando-se em consideração a complexidade do bioprocesso.

Analisando-se as curvas de contorno na **Figura 25**, geradas pelo *software* ***Experimental Design*** (http://experimental-design.protimiza.com.br), pode-se observar que para esta fase do microrganismo, as condições que levam à maximização do crescimento celular são as condições superiores de estudo (+1,68) no DCCR para as três variáveis, ou seja, concentrações de peptona, extrato de levedura e glicose de 6 g/L, 6 g/L e 12 g/L, respectivamente

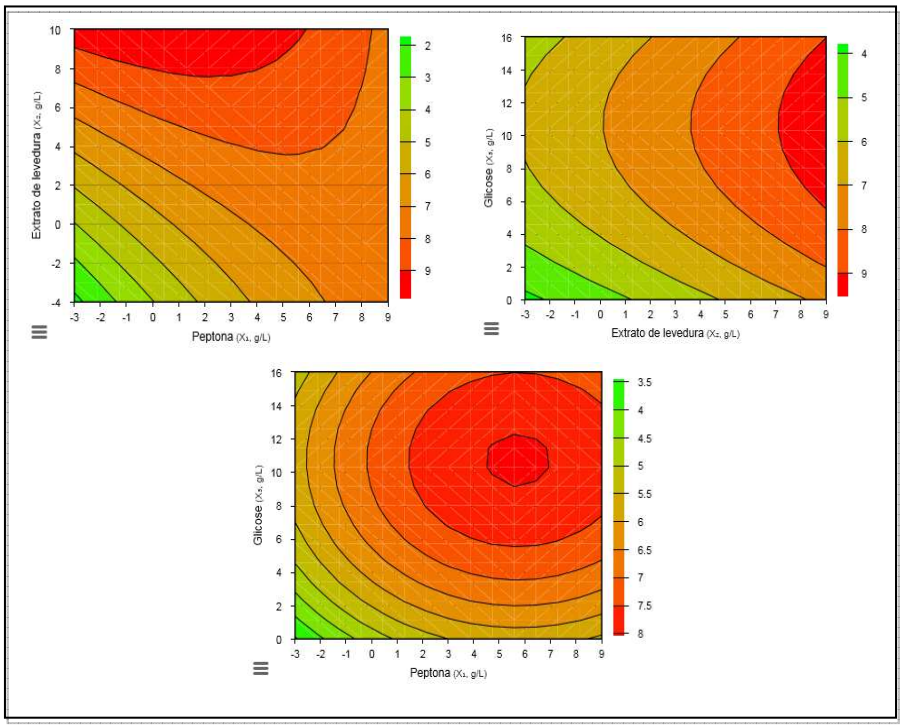


Figura 25: Curvas de contorno para a variável de resposta concentração celular (em g/L) em função de glicose, extrato de levedura e peptona (também em g/L).

Assim, ensaios com as condições do meio de cultivo otimizado, paralelamente aos ensaios controle (meio mais rico e com maior custo), foram realizados na etapa de validação, com objetivo de compará-los e avaliar o ganho de economia em relação ao valor da concentração celular obtida.

5.4. *Validação das condições otimizadas*

Conforme a análise realizada nas etapas anteriores (PB e DCCR), dois ensaios de validação em triplicata foram realizados. Um deles com a condição do meio otimizado neste trabalho (contendo glicose, peptona e extrato de levedura a 12, 6 e 6 g/L, respectivamente) e o outro com o meio controle RCM Acumedia comercial para comparação. Os resultados estão apresentados na **Tabela 25**.

Tabela 25: Resultados de concentração celular, em g/L, dos ensaios de validação.

Tempo (h)	0	4	8	12
Meio otimizado 1	0,80	3,11	10,61	**9,65**
Meio otimizado 2	0,93	3,43	10,47	**8,88**
Meio otimizado 3	0,66	3,34	9,97	**9,52**
Controle 1 (Meio RCM)	0,48	1,75	6,88	**6,52**
Controle 2 (Meio RCM)	0,98	1,43	8,15	**6,66**
Controle 3 (Meio RCM)	0,89	1,89	9,20	**6,02**

A **Figura 26** apresenta os perfis cinéticos das médias dos ensaios de validação realizados em triplicatas. Os resultados validam a otimização da etapa de propagação, apresentando, inclusive, concentração celular média superior ao do ensaio controle com meio comercial e em tempo até menor (8h).

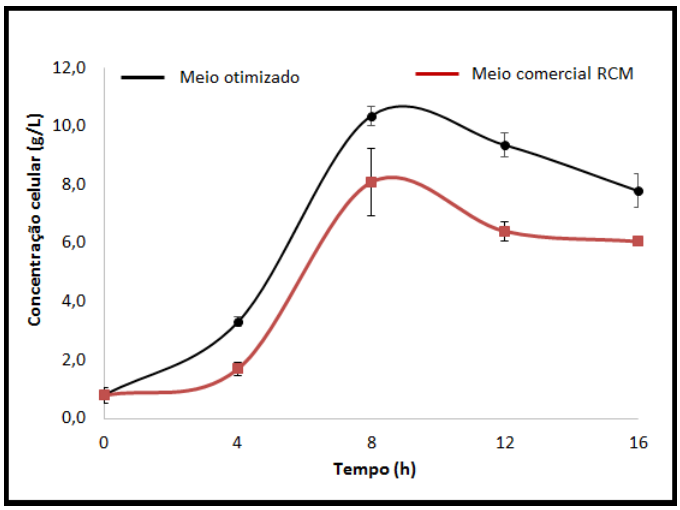


Figura 26: Perfis cinéticos das médias de concentração celular dos ensaios em triplicata de propagação com o meio otimizado e com o meio comercial para validação.

A **Tabela 26** apresenta as médias e os desvios padrão dos ensaios realizados na condição otimizada e no meio comercial RCM, além do valor predito pelo modelo nas condições de validação em 12 horas de propagação.

Tabela 26: Resultados das médias, desvios padrão e valor predito pelo modelo para comparação – concentração celular (g/L) em 12h.

Ensaio	Média experimental (g/L)	Desvio padrão (g/L)	Valor predito pelo modelo nas condições do meio otimizado (g/L)
Propagação com meio comercial RCM controle	6,40	0,34	-
Propagação com meio otimizado	9,35	0,41	7,89

Observa-se que o valor de concentração celular médio obtido pelo meio otimizado apresenta um resultado maior do que o valor predito pelo modelo e também pelo valor médio obtido com uso de meio comercial. Os desvios padrão apresentaram valores baixos para ambos os ensaios. Este resultado valida a otimização do meio de propagação e é fruto da sinergia entre as variáveis independentes.

Assim, foi possível avaliar os nove componentes do meio de cultivo com apenas 43 ensaios, através de dois delineamentos sequenciais e a validação experimental, obtendo-se um meio otimizado mais econômico com três componentes e em um tempo menor, igual a 8 horas, para a etapa de propagação de *Clostridium acetobutylicum* DSM6228 e que proporciona um rendimento de células similar aos ensaios de propagação com o meio comercial.

Em relação aos dados de literatura, o período de incubação na fase de propagação varia de 12 a 48 horas e a quantidade de componentes utilizados nos meios de cultura varia entre 9 e 16 (Jiang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; Ranjan *et al.*, 2013; Abd-Alla *et al.*, 2012; Moradi *et al.*, 2013; Raganati *et al.*, 2014; Börner *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2013). Obteve-se, portanto, uma redução do tempo de crescimento celular e da quantidade de compostos para o meio de propagação.

Concluindo esta etapa, com o planejamento de experimentos, foi possível reduzir os custos com nutrientes na fase de propagação em 76%, substituindo o meio comercial RCM pelo meio otimizado de acordo com a **Tabela 27**.

Tabela 27: Comparação dos custos para o preparo de 1 litro de meio de propagação usando o meio comercial RCM e o otimizado.

Meio comercial RCM			***Meio otimizado***			
Marca	**Massa (g)**	**Custo (U$)**	**Componente**	**Marca**	**Massa (g)**	**Custo (U$)**
Sigma-Aldrich	***38***	***13,92***	Glicose	Fisher Chemical	12	1,27
			Extrato de levedura	KASVI	6	0,93
			Peptona	KASVI	6	1,09
			TOTAL		***24***	***3,29***

5.5. Ensaios de fermentação com meios quimicamente complexos

Após definir as melhores condições para o crescimento de *Clostridium acetobutylicum* em ensaios com frascos, optou-se por realizar as etapas de propagação e fermentação em biorreator instrumentado, de maneira sequencial e em um mesmo sistema reacional, onde ocorressem as duas etapas, processo que foi denominado de *one-pot reaction*. Esta é uma estratégia a ser usada para realizar sínteses de uma maneira mais sustentável, devido à redução de custos, já que o processo se encontra integrado, diferentemente daqueles realizados em etapas distintas (Sydnes, 2016). Somente a etapa de ativação continuou sendo realizada em frascos de penicilina.

Os ensaios de fermentação realizados em meios quimicamente complexos em biorreator, utilizando **glicose** e **xilose** como fontes de carbono são apresentados nas **Figuras 27 e 28**, respectivamente, com adição dos nutrientes descritos na **Tabela 16**. Os rendimentos ($Y_{P/S}$) obtidos, tomando como base apenas butanol como produto, foram 0,19 e 0,25 $g.g^{-1}$, respectivamente e os resultados de produtividade (Q_P) foram 0,14 e 0,17 g/L.h, para os ensaios com glicose e xilose como substrato, respectivamente.

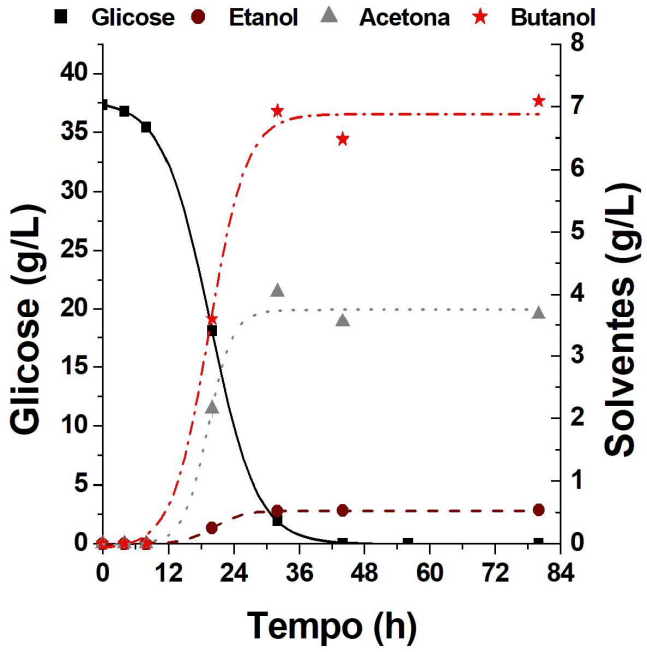


Figura 27: Cinética de fermentação ABE, tendo glicose como substrato em meio quimicamente complexo. Composição do meio conforme Tabela 15. Temperatura: 37°C e 50 rpm em biorreator de 1L.

O ensaio de fermentação com glicose durou 36 horas, com um consumo quase total do substrato, ou seja, 35,4 g/L e produção de 6,9 g/L, 4,0 g/L e 0,5 g/L de butanol, acetona e etanol, respectivamente. A produção total de solventes ABE foi, portanto, de 11,4 g/L, com produtividade total de 0,32 g/L.h.

No que tange à xilose, o tempo demandado para o consumo dessa pentose foi de 56 horas, resultando em uma redução percentual do substrato de 69,3%, permanecendo no meio fermentado uma concentração residual de 16,7g/L. As concentrações finais de butanol, acetona e etanol, neste ensaio, foram de 9,5 g/L, 7,5 g/L e 1,0 g/L, respectivamente, resultando em uma produção total de solventes ABE de 18 g/L, com produtividade volumétrica total de 0,32 g/L.h.

Embora houvesse um resíduo de xilose neste ensaio, as variáveis de resposta obtidas foram até superiores às do ensaio com glicose. Percebe-se também que a quantidade de substrato utilizada pelo microrganismo foi de 37,7 g/L. O mais importante a destacar destes ensaios é a capacidade da cepa em metabolizar tanto glicose quanto xilose para a produção dos solventes, tendo o butanol como produto majoritário.

Jiang e colaboradores (2014) utilizaram glicose como substrato para produção de butanol por *Clostridium beijerinckii* IB4.

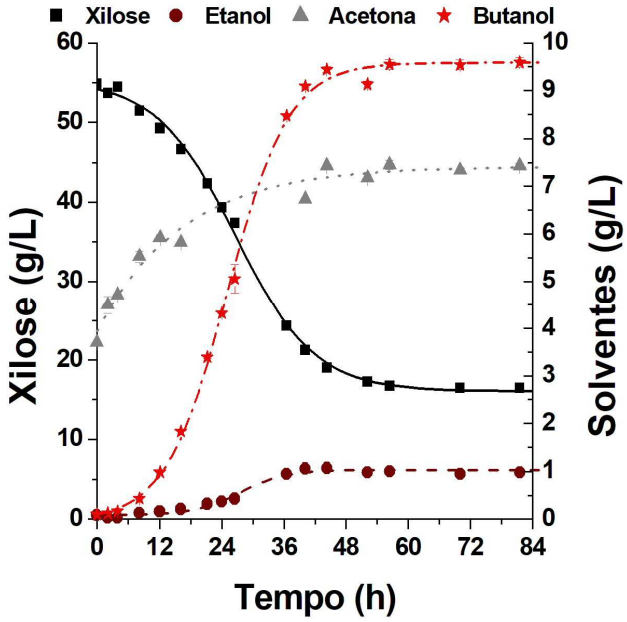


Figura 28: Cinética de fermentação ABE, tendo xilose como substrato em meio quimicamente complexo. Composição do meio conforme Tabela 15. Temperatura: 37°C e 50 rpm em biorreator de 1L.

Os autores obtiveram em 40 horas de fermentação concentrações de butanol, acetona e etanol de 10,96, 3,01 e 0,16 g/L, respectivamente, ou seja, 14,13 g/L de solventes. O consumo de glicose neste período foi de 41 g/L, ficando um residual de 18 g/L. O rendimento e a produtividade de solventes obtidos foram 0,35 $g.g^{-1}$ e 0,35 g/L.h. O rendimento e a produtividade de butanol foram, respectivamente, 0,26 $g.g^{-1}$ e 0,27 g/L.h.

Kheyrandish e colaboradores (2015) utilizaram glicose como substrato para produção de butanol, acetona e etanol em concentrações iniciais do substrato de 20, 40, 60 e 80 g/L. Os autores obtiveram um acréscimo de 80% na produção de butanol quando aumentaram a concentração de glicose de 20 para 40 g/L, porém, não observaram aumento significativo do produto com concentrações iniciais maiores do substrato. Os autores justificaram os resultados à repressão catabólica causada pela glicose em quantidades acima de 40 g/L. A concentrações de butanol, acetona e etanol alcançadas foram 9,3 g/L, 3,4 g/L e 0, respectivamente, após 48 horas de fermentação iniciada com 40

g/L de glicose. Portanto, as produtividades de butanol e de solventes foram, respectivamente de 0,19 e 0,26 g/L.h.

Sun e colaboradores utilizaram xilose como substrato para produção de butanol por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, obtendo em 96 horas de fermentação concentrações de butanol, acetona e etanol de 7,9, 2,0 e 1,5 g/L, respectivamente, ou seja, 11,4 g/L de solventes. O consumo de xilose neste período foi de 47 g/L, ficando um residual de 13 g/L. O rendimento e a produtividade de solventes obtidos foram 0,24 $g.g^{-1}$ e 0,12 g/L.h (Sun *et al.*, 2012).

Na **Tabela 28** estão os resultados obtidos pelos autores em comparação aos gerados nesta seção (colunas azuis). As colunas A, B e C são comparáveis entre si, pois são relacionadas ao mesmo substrato, a glicose, enquanto a coluna D pode ser comparada à E (xilose como substrato).

Tabela 28: Comparação dos resultados obtidos neste trabalho (colunas em azul) com a literatura. As colunas A, B e C referem-se ao uso de glicose; assim como as colunas D e E referem-se ao uso de xilose.

Parâmetro	**Referências**				
	Kheyrandish *et al.* (2015) **(A)**	Jiang *et al.* (2014) **(B)**	Presente trabalho **(C)**	Sun *et al.* (2012) **(D)**	Presente trabalho **(E)**
Tempo de fermentação (h)	48	40	36	96	56
ΔS de **glicose** (g/L)	40	41	35,4	-	-
ΔS de **xilose** (g/L)	-	-	-	47	37,7
Butanol (g/L)	9,3	10,96	6,9	7,9	9,5
Acetona (g/L)	3,4	3,01	4,0	2,0	7,5
Etanol (g/L)	0	0,16	0,5	1,5	1,0
ABE (g/L)	12,7	14,13	11,4	11,4	18,0
$Y_{P/S}$ butanol ($g.g^{-1}$)	0,23	0,27	0,19	0,17	0,25
$Y_{P/S}$ ABE ($g.g^{-1}$)	0,32	0,34	0,32	0,24	0,48
Q_P (g/L.h) – Butanol	0,19	0,27	0,19	0,08	0,17
Q_P (g/L.h) - ABE	0,26	0,35	0,32	0,12	0,32

Observa-se que os parâmetros alcançados neste trabalho com uso da glicose foram próximos aos reportados na literatura. No entanto, com relação às colunas D e E, todos os parâmetros alcançados no presente trabalho para xilose foram superiores aos de Sun e colaboradores (2012). Isto se deve à maior produção de butanol e acetona.

Estes resultados comprovam a capacidade da cepa em utilizar tanto glicose quanto xilose como substratos para a produção majoritária de butanol no meio fermentativo.

5.6. Caracterização e fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos

5.6.1. Hidrolisado hemicelulósico (HH C5)

O bagaço de cana-de-açúcar, após sofrer um pré-tratamento e prensagem passou por uma etapa posterior de hidrólise enzimática da fração sólida rica em celulose (fração C6). Esses processos de desestruturação da fibra dos resíduos lignocelulósicos estão voltados para o aproveitamento integral dos açúcares de maior concentração encontrados no bagaço, a glicose e a xilose, que juntos são responsáveis por mais de 70% da composição em base seca do bagaço de cana-de-açúcar (Gomes, 2009). Na primeira fase (pré-tratamento) utilizou-se ácido sulfúrico como catalisador e foi possível aproveitar entre 70% e 80% dos açúcares da fração hemicelulósica, gerando uma corrente líquida rica em xilose, conforme descrito no item 4.3, denominada de hidrolisado hemicelulósico ou HH C5. Na **Tabela 29** encontra-se a composição desta corrente.

Tabela 29: Análise composicional do hidrolisado hemicelulósico HH C5.

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	8,14 ± 1,01
Xilose	52,57 ± 3,08
Ácido acético	9,45 ± 0,80
5-Hidroximetilfurfural	0,62 ± 0,11
Furfural	0,33 ± 0,07
Polifenóis totais	2,10 ± 0,14

A quantidade de xilose, açúcar majoritário, representa 87% do total de carboidratos presentes no hidrolisado HH C5, que é de 61 g/L. O teor de ácido acético oriundo da fibra lignocelulósica é expressivo e há presença de produtos derivados da oxidação dos carboidratos durante o pré-tratamento, que são 5-hidroximetilfurfural e furfural, potenciais inibidores do processo fermentativo (Betancur *et al.*, 2010).

Este hidrolisado foi utilizado como substrato no processo fermentativo ABE. A fase de propagação celular foi realizada com sucesso (dados não apresentados), resultando em concentrações de ácido butírico e acético entre 5 e 6 g/L (fase acidogênica). Após a adição do hidrolisado hemicelulósico, não houve produção dos solventes, ficando o experimento em observação por até 140h.

A inibição por essas classes de compostos é contraditória na literatura para essa fermentação em foco. Segundo Guo e colaboradores (2013), o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica gera uma quantidade de compostos tóxicos que incluem ácidos, derivados furânicos e polifenóis e nenhum microrganismo pode produzir eficientemente butanol dessa fração líquida. Segundo os autores, os compostos fenólicos totais solúveis no hidrolisado obtidos da fibra de milho por ácido sulfúrico são os potenciais inibidores da produção ABE por *Clostridium beijerinckii* BA101, pois acetato, furfural e 5-hidroximetifurfural não inibiram o crescimento e a produção ABE pelo microrganismo (Guo *et al.*, 2013).

Os compostos fenólicos, principalmente os de menor massa molecular, são os mais tóxicos e causam perda de integridade celular. Porém, os efeitos de inibição não têm sido elucidados na literatura. Estudos foram realizados com ácido 4-hidroxibenzóico como modelo para se investigar a influência dos compostos fenólicos na fermentação, principalmente em estudos com madeira (Palmqvist *et al.*, 2000). O processo de destoxificação de hidrolisado é difícil e aumenta os custos de produção. A sugestão dos autores foi a utilização de um microrganismo mutante capaz de tolerar níveis mais elevados desses inibidores fenólicos presentes no meio.

5.6.2. Hidrolisado celulósico (HC C6)

Como não foi possível a obtenção de butanol a partir da fermentação do hidrolisado hemicelulósico diretamente, o próximo passo foi a avaliação da fermentabilidade do hidrolisado celulósico, obtido após a ação de celulases nos sólidos resultantes do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de cana, cuja metodologia foi descrita no item 4.5. Neste caso, a água foi usada para diluir o preparado enzimático comercial, bem como para se obter uma suspensão de sólidos com concentração de aproximadamente 20% (m/m) no meio de hidrólise. Após o tempo determinado de processo (72h) a 50°C, sob agitação a 300 rpm e em pH 5,0, obteve-o hidrolisado celulósico, cuja composição é apresentada na **Tabela 30**.

Tabela 30: Análise composicional do hidrolisado HC C6.

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	51,30 ± 0,97
Xilose	17,80 ± 0,35
Ácido acético	5,42 ± 0,02
5-HMF	0,02 ± 0,00
Furfural	0,36 ± 0,01
Polifenóis totais	1,83 ± 0,02

A concentração total de carboidratos é de 69 g/L, somando-se as concentrações de glicose e xilose. A glicose é o açúcar majoritário (74%), produto da ação sinérgica das enzimas que compõem o preparado enzimático. As enzimas atuam na fração celulósica de maneira mais eficiente no bagaço pré-tratado do que no bagaço *in natura*, pois aquele passou por uma etapa de rompimento da estrutura lignocelulósica, deixando a celulose mais acessível ao ataque enzimático (Gomes, 2009). A presença de xilose é resultante da ação de xilanases sobre a hemicelulose remanescente do processo de pré-tratamento. Além das atividades celulolíticas, os preparados enzimáticos comerciais também possuem atividade xilanolíticas.

Observa-se que os teores de 5-hidroximetilfurfural e polifenóis são 97% e 13% menores do que no hidrolisado HH C5, respectivamente. O teor de furfural apresentou diferença pouco significativa quando comparado ao hidrolisado hemicelulósico oriundo do pré-tratamento.

A **Figura 29** apresenta o resultado do acompanhamento cinético da fermentação do hidrolisado HC C6, obtida em biorreator instrumentado de 1L. Antes da fermentação, ocorreu primeiramente a fase de propagação celular com 400 mL de meio otimizado contendo glicose e 100mL de inóculo com células de *Clostridium acetobutylicum* DSM6228 crescidas previamente em meio RCM comercial. Após a etapa de propagação foi adicionado ao biorreator o hidrolisado HC C6, que sofreu diluição de cerca de duas vezes.

Conforme apresentado nos gráficos da **Figura 29**, preferencialmente a bactéria consome a glicose e isso ocorreu por cerca de 30 horas, com produção dos ácidos orgânicos. Registra-se a forte repressão no consumo de xilose pela maior afinidade da célula por glicose. Após este tempo, iniciou-se a fase solventogênica, com produção de butanol e os outros produtos pelo consumo tanto da glicose quanto da xilose, chegando-se a 6,4 g/L do principal produto da fermentação. Em 48 horas, a produtividade volumétrica e o rendimento obtidos, considerando o butanol, foram 0,13 g/L.h e 0,19 $g.g^{-1}$, respectivamente. Em relação à acetona e etanol, obtiveram-se concentrações máximas de 4,5 e 0,6 g/L, respectivamente. A concentração total, produtividade volumétrica e o rendimento de solventes foram, respectivamente, 11,5 g/L, 0,24 g/L.h e 0,34 $g.g^{-1}$.

O consumo total de carboidratos foi de 33,3 g/L, sendo 25,0 g/L de glicose e 8,3 g/L de xilose. Mesmo o hidrolisado HC C6 apresentando concentração de polifenóis na mesma ordem de grandeza do hidrolisado HH C5, houve boa produção de solventes e o aproveitamento integral dos açúcares presentes. Portanto, estes resultados mostram que é possível utilizar o hidrolisado HC C6 para a produção dos solventes sem a necessidade de etapa de destoxificação para a remoção dos potenciais inibidores presentes no meio. Provavelmente o maior teor de 5-HMF no hidrolisado HHC5 tenha sido o maior responsável pela inibição celular na etapa de fermentação desta corrente.

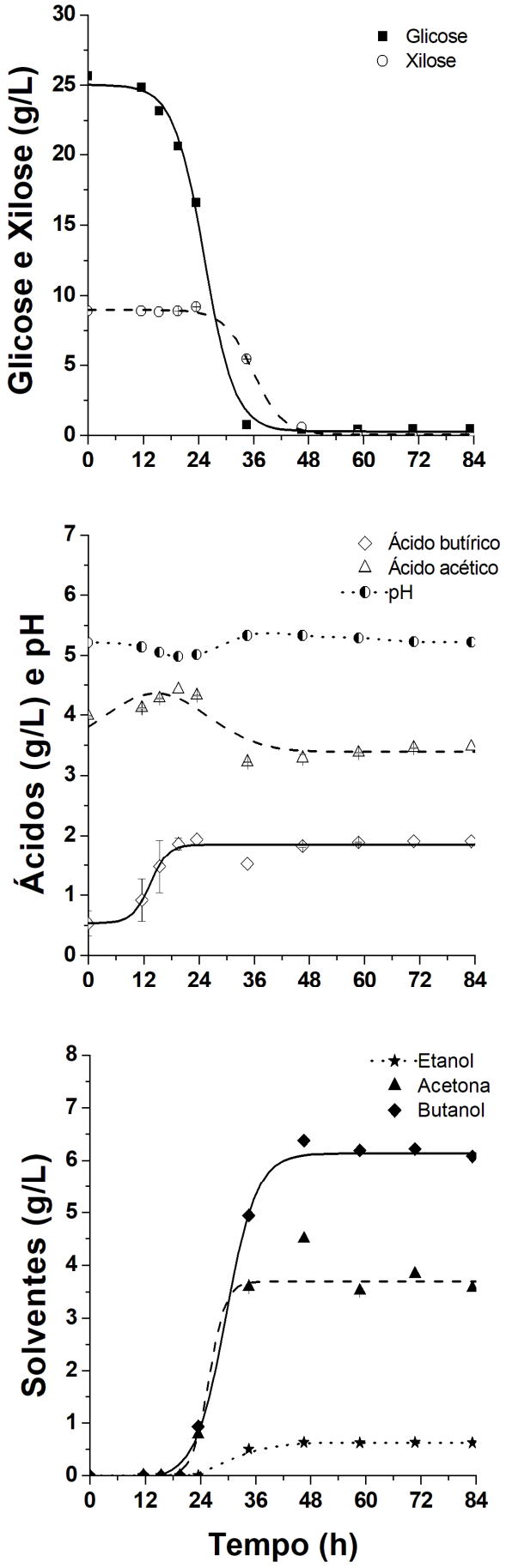


Figura 29: Cinética de fermentação ABE de hidrolisado HC C6. Temperatura: 37°C e 50 rpm, em biorreator de 1L.

5.6.3. Hidrolisado HC C5+C6

A próxima estratégia foi a avalição da fermentabilidade do hidrolisado HC C5+C6, preparado pela ação das celulases comerciais sobre os sólidos remanescentes do pré-tratamento com ácido diluído. Conforme já mencionado, o próprio hidrolisado hemicelulósico (HH C5) foi usado para diluir o preparado enzimático comercial, biocatalisador da hidrólise nesta etapa, e também para se obter a suspenção de sólidos com teor de 20% (m/m) no meio de reação enzimática. Após o tempo determinado de hidrólise a 50°C, sob agitação de 300rpm e em pH 5,0, foram obtidas as concentrações dos açúcares em 72 horas, chegando-se à composição apresentada na **Tabela 31**.

Tabela 31: Análise composicional do hidrolisado HC C5+C6.

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	69,83 ± 0,05
Xilose	52,06 ± 1,54
Ácido acético	11,58 ± 0,52
5-HMF	0,07 ± 0,02
Furfural	0,62 ± 0,10
Polifenóis totais	3,21 ± 0,04

Como se pode observar, a quantidade de carboidratos é mais expressiva do que os hidrolisados obtidos anteriormente, atingindo-se uma concentração total de 122 g/L, o que foi considerado bastante interessante quando comparado às concentrações reportadas na literatura. As concentrações de furfural e polifenóis obtidas também foram superiores às anteriores em pelo menos 90% e 52%, respectivamente. A concentração de 5-HMF obtida apresentou-se na mesma ordem de grandeza do hidrolisado HC C6, porém cerca de 90% menor do que no HH C5.

O conteúdo de polifenóis e furfural é maior no HC C5+C6 do que no HC C6, devido à corrente líquida HH C5 ter sido reunida com os sólidos pré-tratados. Conforme já mencionado, o pré-tratamento com ácido diluído tem como objetivo desestruturar o material lignocelulósico. Além disso, hidrolisar quimicamente a maior parte da

hemicelulose, que continua a reagir com o catalisador ácido no meio, gerando furfural. Uma pequena porção de lignina também é solubilizada sob condições de pré-tratamento ácido, gerando polifenóis. Para a preparação do HC C6, no entanto, a fração líquida de pré-tratamento foi removida por filtro-prensa e o sólido residual foi misturado com água e enzima para a etapa de hidrólise enzimática, diluindo assim as concentrações de furfural e polifenóis presentes no meio.

A **Figura 30** apresenta o resultado do acompanhamento cinético da fermentação do hidrolisado HC C5+C6. A fase de propagação celular não foi apresentada, mas foi realizada da mesma forma que no ensaio anterior, com 400 mL de meio otimizado contendo xilose ao invés de glicose e 100mL de inóculo contendo células de *Clostridium acetobutylicum* DSM6228 crescidas previamente em meio RCM comercial. A glicose foi consumida preferencialmente, ocasionando o aumento dos teores de ácidos orgânicos até 12 horas. Estes ácidos foram provenientes da etapa de propagação (ácidos butírico e acético) e da própria composição do hidrolisado (ácido acético). Em seguida, os mesmos foram reutilizados pelo microrganismo para a produção dos solventes, com o consumo concomitante e preferencial de glicose. O microrganismo consome praticamente toda a glicose em 24 horas, preferencialmente. Em seguida, a bactéria utiliza a xilose até 30h, deixando um residual deste carboidrato em torno de 11 g/L (cerca de 50%).

O uso total de glicose e parte da xilose deveu-se à maior concentração inicial de açúcares no meio (55 g/L), que provavelmente inibiu o uso da xilose devido à repressão catabólica causada pela glicose.

Vale ressaltar que, diferentemente do que ocorreu com o HC C5+C6, na estratégia com HC C6, ambos os açúcares foram totalmente consumidos. A razão deste resultado é que a concentração inicial de açúcar foi, aproximadamente, 35 g/L, menor do que no meio com HC C5+C6. A bactéria consome açúcares sem inibição na faixa de 30-40 g/L (Kheyrandish *et al.*, 2015).

A concentração, produtividade volumétrica e o rendimento de butanol obtidos em 36 horas foram 9,1 g/L, 0,25 g/L.h e 0,24 $g.g^{-1}$, pois o consumo de carboidratos foi de 38 g/L, sendo 28,5 g/L de glicose e 9,5 g/L de xilose. Em relação à acetona e etanol, obteve-se concentrações máximas de 5,5 e 0,9 g/L, respectivamente, em 36 horas.

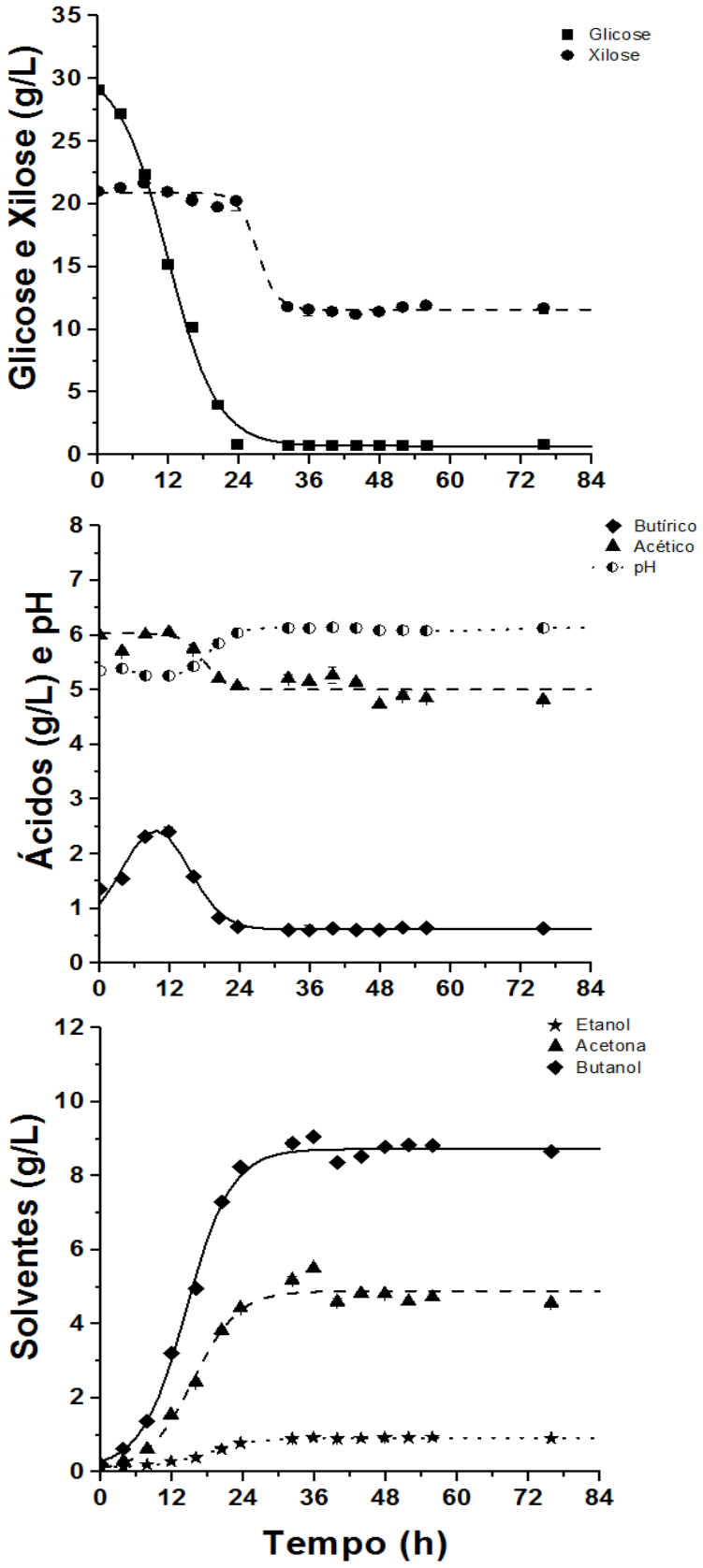


Figura 30: Cinética de fermentação ABE de hidrolisado HC C5+C6. Temperatura: 37°C e 50 rpm, em biorreator de 1L.

A concentração total, produtividade volumétrica e o rendimento de solventes neste mesmo tempo foram 15,5 g/L, 0,43 g/L.h e 0,41 $g.g^{-1}$. O hidrolisado HC C5+C6 apresentou concentração de polifenóis ainda maiores se comparado aos anteriores e, mesmo assim, houve boa produção de solventes, denotando que a bactéria apresenta resistência à presença de substâncias potencialmente tóxicas ao seu metabolismo e integridade celular. Este é mais um indício que a inibição ocorrida com o uso do hidrolisado HH C5, provavelmente se sucedeu pela presença de 5-HMF em maior concentração.

5.6.4. Estudo da necessidade de adição de nutrientes para a etapa fermentativa

Nesta fase do trabalho, avaliou-se a possibilidade de eliminar a adição de nutrientes na etapa de fermentação visando a redução nos custos de preparo dos meios. Primeiramente foi feita uma caracterização mais completa dos hidrolisados e comparados os resultados de concentrações dos cátions e ânions com o que são recomendadas pela literatura (Sun & Liu, 2012; Monot *et al*., 1982). Esta comparação é apresentada na **Tabela 32**.

Pelos resultados obtidos, percebe-se que o hidrolisado HC C6 supre a demanda de íons Mn^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, Fe^{2+} e sulfato. Porém, com relação a K^{+} e fosfato, o mesmo possui *déficit*. Em relação ao hidrolisado HC C5+C6, o mesmo cobre a demanda exigida, deixando de suprir de maneira completa apenas fosfato. Este componente provavelmente foi fornecido na etapa de propagação, porém não foi analisado o seu teor na mistura reacional. Portanto, o hidrolisado HC C5+C6 foi selecionado para a realização da fermentação sem aporte de nutrientes e a **Figura 31** apresenta os perfis cinéticos sobrepostos de fermentação do hidrolisado HC C5+C6 com e sem adição de nutrientes. Como pode ser observado, não houve diferenças significativas nos dois casos, muito possivelmente pelo fato de haver nutrientes suficientes para o metabolismo celular, o que também atende a expectativa de diminuição dos custos do processo por não ser necessária a adição de insumos nesta etapa.

Tabela 32: Comparação entre a demanda de cátions e ânions como nutrientes para a etapa de fermentação entre os dados de literatura (Sun & Liu, 2012 e Monot *et al.*, 1982) e a composição real nos hidrolisados HC C6 e HC C5+C6 (em mg/L), considerando a diluição.

Íons demandados à atividade de *Clostridium* conforme a literatura	Faixa de concentração recomendada (mg/L)	Concentração no HC C6 (mg/L)	Concentração no HC C5+C6 (mg/L)
Mn^{2+}	0 – 7,3	2	13
Mg^{2+}	10 - 40	16	75
K^{+}	314 – 4.188	90	335
Na^{+}	0 – 1.966	34	140
Fe^{2+}	0,4 – 18,4	14	550
PO_4^{3-}	700 – 1.400	14	125
SO_4^{2-}	0,6 - 160	1.750	6.500

Alguns íons são importantes no metabolismo de microrganismos, pois representam cofatores de enzimas, que catalisam as reações metabólicas, como a glicólise, reações redox e transporte de nutrientes, que são essenciais para manter a viabilidade celular. De acordo com Monot *et al*. (1982), a presença de íons Mg^{2+} e K^{+} em concentrações dentro das faixas recomendadas (**Tabela 32**) desempenha um papel importante na formação de acetona. Segundo Zabihi *et al*. (2019), o aumento da concentração de NaCl no meio de 0,01 g/L para 20 g/L prolongou a fase *lag* de *Clostridium acetobutylicum* de 30 para 93 h. O sal tem um efeito destrutivo no crescimento celular e na produção de ABE, além de inibir a mudança entre as fases acidogênica e solventogênica. A alta salinidade causa desidratação do citoplasma bacteriano e lise celular, por aumentar a pressão osmótica do meio externo.

De acordo com Maiti e colaboradores, o sal NaCl é citado em uma lista de compostos inibitórios presentes em hidrolisados de biomassa. Este sal inibe o crescimento celular a uma concentração de 2 g/L, o que corresponde a 786 mg/L de Na^{+}, além de aumentar a permeabilidade da membrana celular. A redução na produção de solvente ocorre em concentração de 5 g/L, corroborando com o estudo anterior realizado por Monot *et al*. (1982).No presente trabalho, as concentrações de Na^{+} no HC C6 e no HC C5+C6 foram de 34 e 125 mg/L, respectivamente, ou seja, inferiores a concentrações inibitórias (Maiti *et al*., 2016).

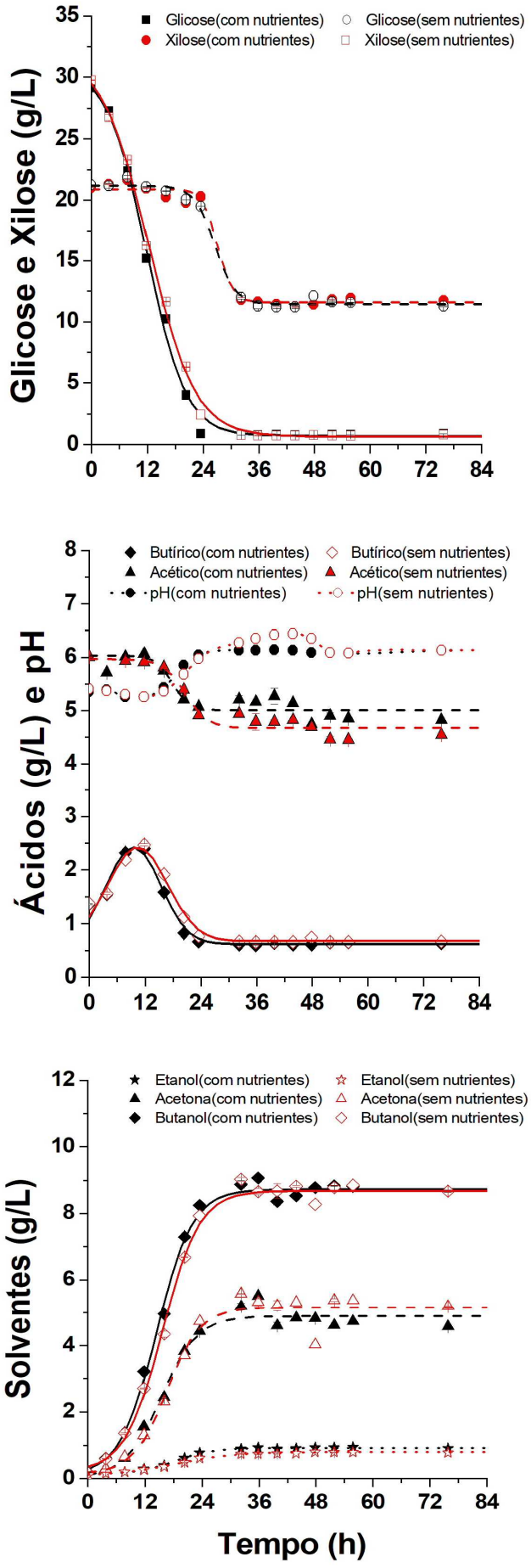


Figura 31: Cinéticas da fermentação ABE de hidrolisado HC C5+C6 com aporte de nutrientes (em preto) e sem (vermelho). Temperatura: 37°C e 50 rpm, em biorreator de 1L.

Segundo Gheshlaghi *et al.* (2009), a enzima fosfofrutoquinase (PFK) catalisa uma única etapa da glicólise, conhecida como fosforilação da frutose-6-fosfato, usando ATP e fosfato para formar frutose-1,6-difosfato e ADP. A PKF precisa de Mg^{2+} associado ao NH_4^+.

O cátion de magnésio é importante no meio porque forma um complexo com ATP, que provavelmente é o substrato da PKF. Os autores sugerem que o NH_4^+ estimula a glicólise através da ação da PFK para aumentar a taxa da reação.

Um dos passos importantes na via metabólica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) de bactérias do gênero *Clostridium* é a clivagem do piruvato, obtido a partir da glicólise, pela ação da enzima piruvato ferredoxina oxidoredutase (PFOR) na presença da coenzima-A (Co-A) para a formação de acetil CoA e CO_2, com conversão concomitante de ferredoxina oxidada e sua forma reduzida. A enzima PFOR contém um cromóforo de enxofre e ferro em sua composição, que transporta elétrons do piruvato para a ferredoxina. A análise composicional da enzima confirmou a presença de pirofosfato de tiamina, ferro e enxofre (Gheshlaghi *et al.*, 2009).

A adição de íons de ferro no meio de cultura influencia o metabolismo de *Clostridium* de maneira a alterar o fluxo de carbono e elétrons durante a fermentação com xilose. Essa alteração aumentou a solventogênese e a utilização da pentose em organismos produtores de ABE. Ambos são resultados desejáveis para serem aplicados em reatores com organismos naturalmente ocorrentes na produção de biocombustíveis (Popovic *et al*., 2017).

Em relação à fonte de nitrogênio (extrato de levedura), a concentração necessária para a fermentação ABE é de 1,0 g/L, de acordo com Sun e Liu (2012). No entanto, os teores de nitrogênio total nos hidrolisados HC C6 e HC C5+C6 foram 2,7 g/L e 8,5 g/L, respectivamente, sendo a concentração de nitrogênio amoniacal em ambos de 1,9 g/L e 6,5 g/L, respectivamente. A maior parte do nitrogênio quantificada em ambos os hidrolisados se deve à adição de NH_4OH para ajuste de pH nas etapas de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado. Portanto, as quantidades de nitrogênio disponível em ambos os hidrolisados são bem altas, comparando-as à demanda descrita pela literatura.

Li *et al*. (2018) utilizaram várias fontes de nitrogênio, incluindo extrato de levedura, peptona, triptona, uréia e acetato de amônio, com objetivo de aumentar a eficiência da fermentação ABE. Os autores concluíram que o acetato de amônio usado como única fonte de nitrogênio em concentração de 3 g/L aumentou o crescimento celular em 26% e que esse componente contribuiu para melhorar o crescimento celular e a produção de solventes, além de diminuir o tempo de fermentação. Também foi relatado que os íons de amônio influenciam na expressão de seis genes envolvidos na via metabólica do butanol, ou seja, *ackA* (acetato quinase), *buk* (butirato quinase), *adc* (acetoacetato descarboxilase), *ctfAB* (acetoacetil-CoA/acil-CoA transferase), *adhE2* (acetaldeído-CoA/álcool desidrogenase bifuncional) e *bdhB* (butanol desidrogenase dependente de NADH). A concentração de ácido acético (ou acetato) é maior no HC C5+C6 do que no HC C6 (**Tabelas 30** e **31**). Portanto, a presença de concentração de acetato de amônio mais elevada no HC C5+C6 possivelmente aumentou a produtividade da fermentação com este hidrolisado.

Uma outra característica interessante do processo desenvolvido é que, utilizando o hidrolisado HC C5+C6 sem suplementação de nutrientes, atingiu-se valores elevados de butanol, acetona, ABE, rendimento e produtividade, em comparação com resultados encontrados na literatura. A **Tabela 33** apresenta os resultados de processos de fermentação ABE, com uso de diferentes hidrolisados de biomassas e também com meios quimicamente complexos, utilizando microrganismos do gênero *Clostridium*. Zheng e colaboradores (2015), por exemplo, obtiveram concentração de ABE de 13,1 g/L utilizando hidrolisado de eucalipto sem suplementação nutritiva. Entretanto, esse resultado foi obtido após 120 h de fermentação, resultando em um baixo valor de produtividade volumétrica, ou seja, 0,11 g/L.h.

No presente trabalho, o valor obtido de Q_P (ABE) foi de 0,41 g/L.h, com uso de HC C5+C5 sem adição de nutrientes, mesmo não consumindo toda a xilose disponível. A produção de solventes foi de 14,7 g/L. Este resultado foi até melhor do que o obtido com meio quimicamente complexo contendo glicose, no qual houve a adição de todos os nutrientes citados nas **Tabelas 12** (propagação) e **16** (fermentação).

Tabela 33: Comparação entre dados da literatura com os resultados obtidos no presente trabalho para a fermentação ABE de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

Substrato	Microrganismo	Consumo de glicose (g/L)	Consumo de xilose (g/L)	Butanol (g/L)	Acetone (g/L)	ABE (g/L)	Q_P (g/L.h) ABE	$Y_{P/S}$ ($g.g^{-1}$) ABE	Referência
Hidrolisado de farelo de arroz	*C. acetobutylicum*	25,6	15,1	5,9	4,4	11,2	0,22	0,34	Al-Shorgani *et al.*, 2019
Hidrolisado de palha de soja	*C. acetobutylicum*	24,2	8,4	4,0	3,1	7,1	0,10	0,22	Liao *et al.*, 2019
	C. acetobutylicum (OGM)	47,4	11,0	8,0	6,0	14,8	0,21	0,25	
Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	*C. acetobutylicum*	12,0	5,0	4,5	1,4	6,2	0,08	0,36	Magalhães *et al.*, 2017
Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	*C. acetobutylicum*	57,0	12	14,2	5,9	21,1	0,36	0,33	Pang *et al.*, 2016
Hidrolisado de eucalipto	*C. saccharoperbutylacetonicum*	29,9	-	8,2	4,3	13,1	0,11	0,41	Zheng *et al.*, 2015
Hidrolisado de palha de arroz	*C. acetobutylicum*	7-8	2-3	2,0	0,8	2,8	0,04	0,20	Moradi *et al.*, 2013
Hidrolisado de salgueiro *Salix schwerinii*	*C. acetobutylicum*	Não citado		8,1	3,7	12,4	0,10	0,33	Yang *et al.*, 2017
Hidrolisado de torta de palmiste	*C. acetobutylicum*	Não citado		3,6	2,0	5,7	0,08	0,24	Al Tabib *et al.*, 2018
Hidrolisado de algas marinhas	*C. beijerinckii*	7,6	-	7,2	0,9	8,2	0,08	0,27	Hou *et al.*, 2017
Meio quimicamente complexo rico em glicose	*C. acetobutylicum*	35,4	-	6,9	4,0	11,4	0,32	0,32	Presente estudo
Meio quimicamente complexo rico em xilose	*C. acetobutylicum*	-	37,7	9,5	7,5	18,0	0,32	0,48	Presente estudo
Hidrolisado **HC C6**	*C. acetobutylicum*	25,0	8,3	6,4	4,5	11,5	0,23	0,34	Presente estudo
Hidrolisado **HC C5+C6** com nutrientes*	*C. acetobutylicum*	28,4	9,4	9,1	5,5	15,5	0,43	0,41	Presente estudo
Hidrolisado **HC C5+C6** sem nutrientes	*C. acetobutylicum*	29,0	9,9	8,7	5,3	14,7	0,41	0,38	Presente estudo

**Nutrientes, em g/L: extrato de levedura, 1,0; $MnSO_4$, 0,01; $MgSO_4$, 0,2; KH_2PO_4, 0,5; K_2HPO_4, 0,5; acetato de sódio, 0,01 e $FeSO_4.7H_2O$, 0,01.*

Os ensaios com hidrolisado HC C5+C6, com e sem nutrientes, apresentaram valores de produtividade, em média, 30% superiores aos com meio quimicamente complexos e foram os valores maiores obtidos, comparando-se aos da literatura. Este resultado sinaliza uma potencial economia de capital, tanto em termos de operação (OPEX), quanto no projeto de reatores (CAPEX), pois diminui a necessidade de aquisição de produtos químicos e também de biorreatores muito grandes.

Usando uma cepa de *Clostridium acetobutylicum* geneticamente modificada, Liao e colaboradores (2019) alcançaram uma produção de butanol e ABE de 8 e 14,8 g/L, respectivamente, com hidrolisado de palha de soja. O consumo de açúcar foi de 58 g/L e os autores alcançaram um rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade (Q_P) de 0,25 g/L e 0,21 g/L.h, respectivamente. Esses valores foram mais elevados do que aqueles com a cepa silvestre, porém menores do que os encontrados neste trabalho.

Al-Shorgani *et al*. (2019) obtiveram resultados com hidrolisado destoxificado de farelo de arroz muito próximos aos alcançados no presente trabalho, quando o HC C6 foi utilizado. No entanto, os resultados com HC C5+C6 foram superiores, sem a necessidade de destoxificação e aporte de nutrientes. O suprimento de fosfato não foi totalmente fornecido pelo hidrolisado, porém esse *déficit* não interferiu no desempenho da fermentação. A mesma constatação vale para o extrato de leveduras, sendo provavelmente as fontes de nitrogênio presentes no hidrolisado suficientes para o metabolismo celular.

Outra vantagem do processo aqui descrito é que a destoxificação dos hidrolisados, que incluem aditivos químicos, tratamento enzimático, aquecimento e vaporização, extração líquido-líquido, extração líquido-sólido ou tratamento microbiano (Jönsson *et al.*, 2013) não se fez necessário, economizando custos no processo fermentativo.

5.2. Aplicação da pervaporação para a recuperação de butanol

Para fins de avaliação da aplicabilidade do processo de recuperação de butanol e acetona no meio fermentativo, foi realizado um ensaio de fermentação ABE com

hidrolisado HC C5+C6 sem adição de nutrientes e com o acionamento da pervaporação após 16h do início do processo. A **Figura 32** a seguir mostra uma fotografia com o biorreator e as partes do sistema de recuperação por membranas montadas em laboratório.

A **Figura 33** apresenta os gráficos da cinética de fermentação ABE do hidrolisado, quando as bombas de recirculação e de vácuo foram acionadas (vide esquema na **Figura 17**). O ensaio foi realizado em reator de 3,6L para se obter um volume maior de permeado.

Conforme apresentado, preferencialmente o microrganismo consome a glicose, com produção principalmente de ácido butírico até 12h. A partir deste tempo, a produção de butanol e acetona cresce acentuadamente, mediante a reutilização do ácido butírico produzido e do ácido acético proveniente do hidrolisado.

Figura 32: Fermentação ABE de hidrolisado HC C5+C6, com aplicação de pervaporação. (1) Biorreator de 3,6L; (2) Sistema de controle do biorreator; (3) Bomba de recirculação do meio fermentativo; (4) Células planas de silicone; (5) Unidade de vácuo; (6) Cristalizador.

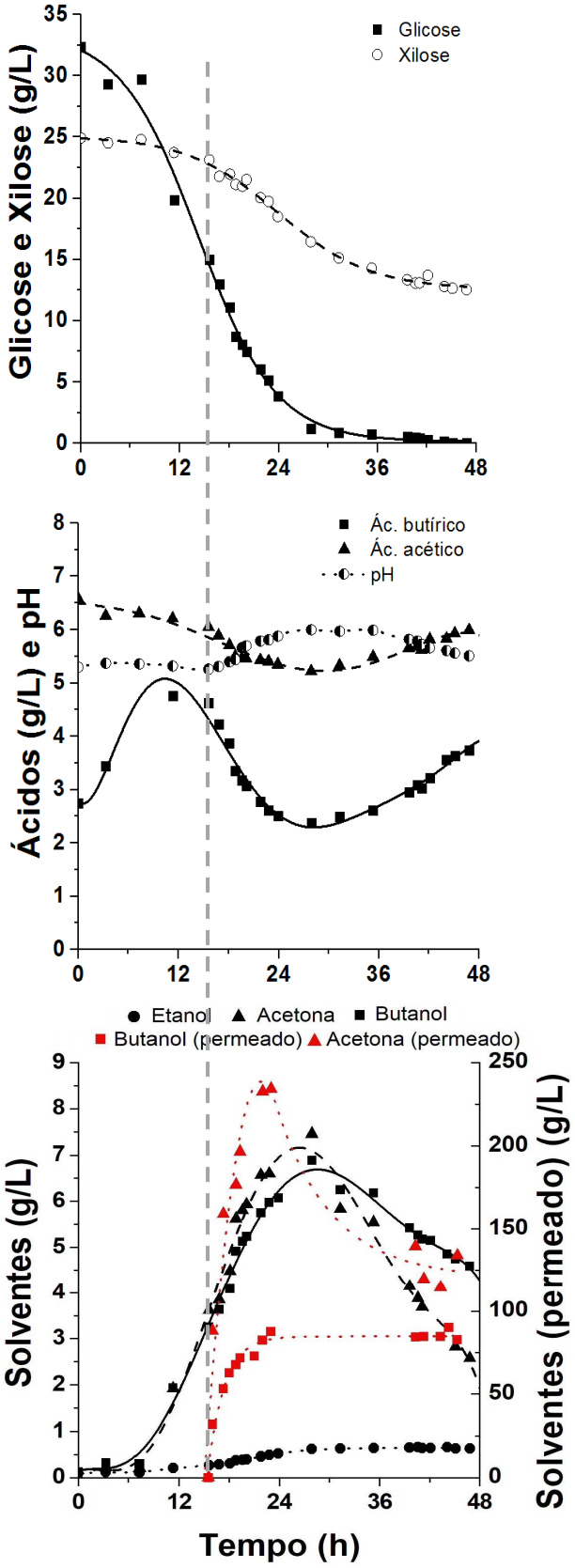


Figura 33: Cinética de fermentação ABE de hidrolisado HC C5+C6, com aplicação da pervaporação após 16h do início do processo (linha hachurada). As linhas em vermelho representam as concentrações de butanol e acetona no permeado. Temperatura: 37°C e 50 rpm, em biorreator de 3,6L.

Mesmo após o acionamento da pervaporação, que ocorreu 16h do início do processo fermentativo, é possível notar que a produção de solventes pelos microrganismos no meio fermentativo ainda supera a remoção, chegando-se a concentrações de butanol e acetona de 6,9 e 7,5 g/L, respectivamente, em 28h.

Com o decorrer do tempo, ocorre o decréscimo das quantidades de solventes no meio, ou seja, a taxa de remoção passa a ser maior do que a de produção. A partir daí ocorre então a retomada da fase acidogênica pela bactéria, pois a produção dos ácidos acético e butírico voltam a aumentar mediante o consumo da xilose, dando início a um novo ciclo metabólico. Consequentemente, o pH do meio diminuiu, conforme apresentado na **Figura 33**.

Durante todo o tempo do ensaio, a quantidade de carboidratos consumida foi de 44,4 g/L, maior do que nos ensaios realizados com o hidrolisado HC C5+C6 sem o acionamento da pervaporação (38 g/L), o que representa um aumento na capacidade de consumo do substrato pela cepa em 17%, com consequente ampliação da capacidade produtora de solventes (butanol e acetona).

Enquanto houve a remoção de butanol e acetona do meio fermentativo ocorreu o aumento nos teores dos solventes no permeado, chegando-se a valores de **87 g/L** e **234 g/L**, respectivamente, após cerca de 8h do acionamento da pervaporação. Foi possível realizar as amostragens no biorreator durante o turno da noite, mas não houve possibilidade de reposição do nitrogênio líquido para a continuidade da condensação dos vapores do permeado. Portanto, entre 8 e 25 horas, houve perda dos vapores que passavam pela membrana e também na solução condensada no cristalizador durante a fase noturna, no qual não houve possibilidade de amostragem. Estes são os motivos de não haver dados de concentração no permeado durante este período. Porém, percebe-se claramente altas concentrações de butanol e acetona no permeado, comprovando assim a eficiência da técnica na remoção e recuperação dos solventes produzidos.

A **Figura 34** apresenta as membranas de silicone das células de pervaporação, dispostas em série, após 30 horas de permeação. A primeira (a) apresenta uma sujidade maior que a da segunda, o que já era esperado, pois foi a primeira a ter contato com o

meio fermentativo. Após as membranas serem lavadas com água, apresentaram o mesmo comportamento que antes (dados não apresentados), ou seja, as incrustações foram facilmente removidas e não danificaram o material.

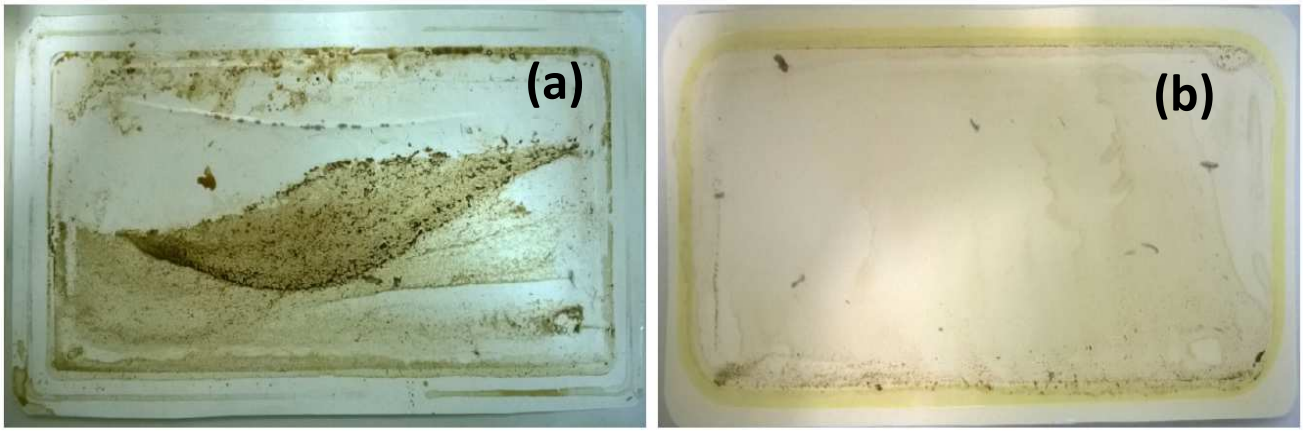


Figura 34: Membranas de silicone utilizadas em série no ensaio de pervaporação na fermentação ABE de hidrolisado HC C5+C6 ao final de 30 horas de utilização. (a) primeira célula; (b) segunda célula.

A **Figura 35** mostra o perfil do volume de fluxo permeado total do processo durante o tempo de pervaporação. Inicialmente, ocorre uma queda rápida no fluxo de 150 g/h.m^2 para valores entre 40 e 70 g/h.m^2 (média de 55,4 g/h.m²), provavelmente pela presença das incrustações citadas. Porém, após esta queda inicial, o fluxo se manteve estável, não havendo intensificação das incrustações com o tempo.

A **Figura 36** mostra os perfis de fluxo permeado de cada solvente recuperado, calculados pelas concentrações de butanol e acetona no permeado, em cada tempo. As linhas tracejadas são dos valores médios obtidos para butanol (4,3 g/h.m²) e acetona (8,7 g/h.m²). Foi calculado o fluxo permeado de butanol e acetona no período entre 8 e 25h (período noturno), através da medição da diferença de volume no biorreator, que foi de 540 mL, e as concentrações dos solventes nestes pontos. Obtiveram-se, portanto, os valores de **10 g/h.m² para butanol** e **17 g/h.m² para acetona**. Estes resultados foram submetidos a um pedido de patente nº BR 10 2018 070289-0, cujo depósito foi realizado em 02 de outubro de 2018, ou seja, a segunda propriedade intelectual obtida deste trabalho.

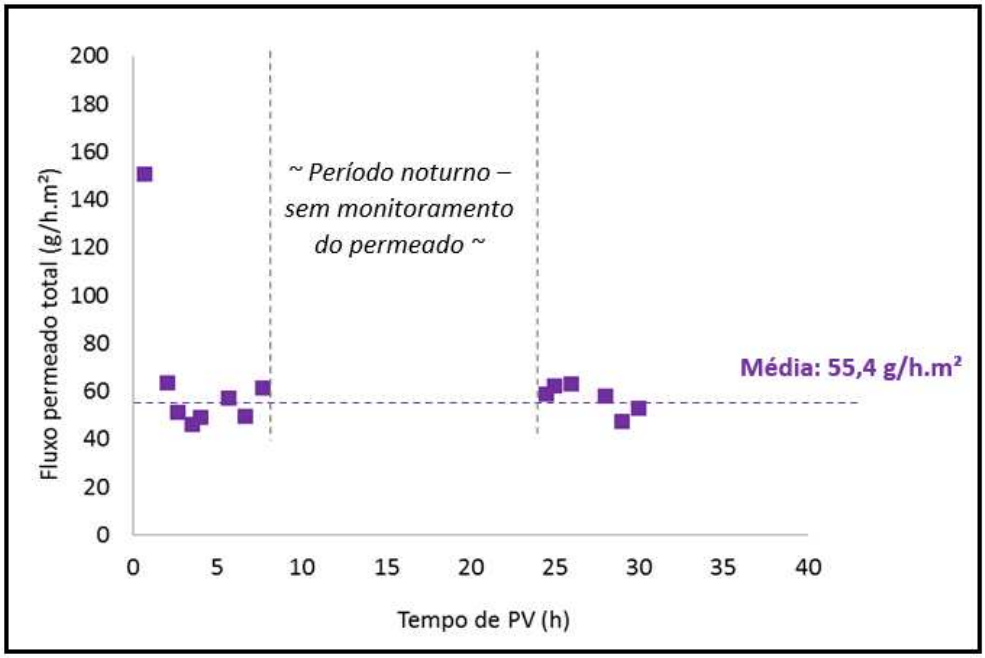


Figura 35: Perfil do fluxo permeado total da PV com o tempo.

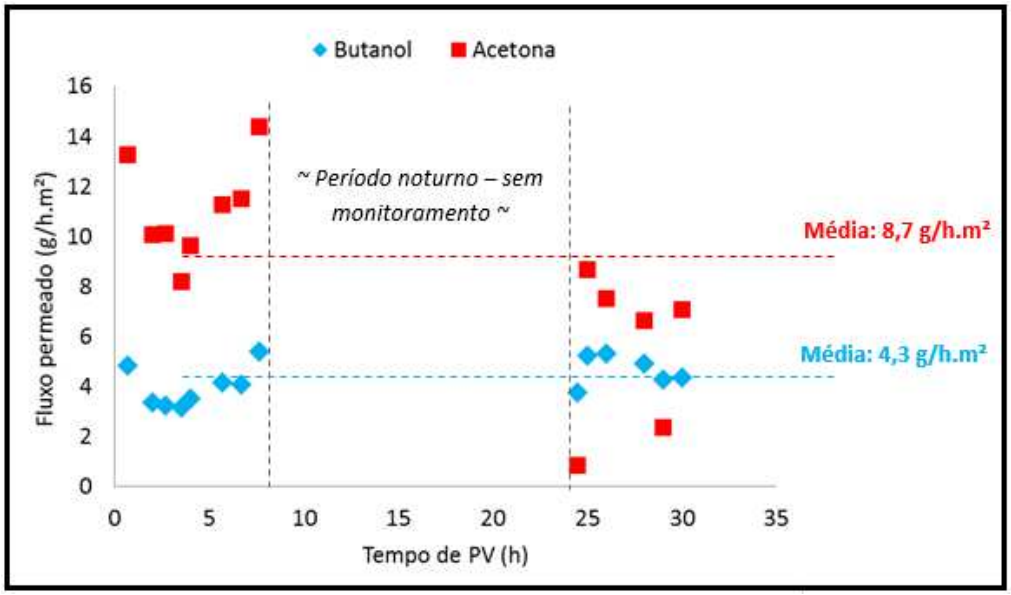


Figura 36: Perfis do fluxo permeado de butanol e acetona com o tempo.

Mesmo aumentando o volume do reator para 3,6L não foi possível realizar o balanço de massa do processo porque durante a noite o mesmo não foi assistido e não houve possibilidade de reposição de nitrogênio líquido no cristalizador para a condensação dos vapores recuperados, mas foi possível demonstrar a exequibilidade do processo por

meio da sua prova de conceito de recuperação do butanol e também da acetona, integrando a pervaporação ao processo fermentativo com uso de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, fermentado por *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228.

De modo a possibilitar estudos mais detalhados destas conversões e melhor caracterização dos produtos separados e purificados, experimentos em maior escala devem ser conduzidos.

Embora a recuperação *in situ* dos solventes seja eficaz para contornar a toxicidade dos mesmos à célula bacteriana e facilitar a purificação do produto final de interesse, mais avanços no sentido de aplicação de processos híbridos podem resolver problemas inerentes a cada técnica individual de separação. A configuração depende de alguns critérios, tais como: diminuição dos fenômenos de incrustação, alto desempenho de recuperação, bem como baixo consumo energético. Estratégia de recuperação híbrida, com combinação de mais de um processo de recuperação de produtos oferece uma alternativa eficaz e vantajosa para as deficiências de processos de recuperação empregados (Xue *et al.*, 2017).

Com a obtenção dos rendimentos de butanol neste trabalho e também considerando a significativa produção de acetona no meio, foram retomados os cálculos realizados no item 2.8, considerando a balança comercial de butanol e acetona, os preços FOB de ambos em 2018 e os rendimentos obtidos para cada molécula. A seguir, são reapresentadas as premissas para o cálculo da magnitude do volume financeiro potencial na comercialização dos produtos:

1. Fermentação ABE com hidrolisado HC C5+C6 sem aporte de nutrientes, com os seguintes rendimentos para butanol e acetona:

$$\mathbf{Y_{P/S\ Butanol} = 0{,}24\ g.g^{-1}}$$

$$\mathbf{Y_{P/S\ Acetona} = 0{,}14\ g.g^{-1}}$$

2. Quantidade estimada de bagaço excedente à cogeração no Brasil, considerando a safra 2019/2020: **17,2 milhões de toneladas**, com **50% de umidade** (CONAB, 2019; Lopes, 2015; CONAB, 2011);

3. Quantidade em massa de carboidratos na fibra de bagaço: **70,5% m/m** (Gomes, 2009);
4. Preço (FOB) de exportação do **butanol** em 2018: **U$1.506,34/ton** (MDIC, 2019)
5. Preço (FOB) de exportação da **acetona** em 2018: **U$1.210,00/ton** (MDIC, 2019)

Portanto, as produções anuais de butanol e acetona a partir de matéria prima lignocelulósica seriam de 1,46 milhões e 849 mil toneladas, respectivamente. A ordem de grandeza do volume financeiro atrelado à produção de butanol confirma ser de US$ 2,2 bilhões e em relação à acetona, o potencial é de cerca de US$ 1,0 bilhão.

Capítulo 6

Conclusões

Neste capítulo são apresentadas as conclusões da presente tese de doutorado. Sugestões de propostas de trabalhos futuros de pesquisa são apresentados em seguida, como desdobramentos dos resultados gerados.

6.1. *Conclusões*

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- Através dos delineamentos experimentais (PB 12 e DCCR) foi possível otimizar o meio de propagação de *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228, passando de nove para três componentes. O meio final de propagação otimizado ficou constituído de peptona, extrato de levedura e glicose, com concentrações de 6 g/L, 6 g/L e 12 g/L, respectivamente, para maximização da concentração celular em até 12 horas;

- A aplicação da técnica do planejamento de experimentos, possibilitou reduzir os custos com insumos na fase de propagação em 76%, substituindo o meio comercial RCM pelo meio otimizado, obtendo-se uma concentração de células de 10,4 g/L em 8 horas;

- Os hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar HH C5, HC C6 e HC C5+C6 possuem concentrações expressivas de carboidratos (glicose mais xilose) de 60,7; 69,1 e 122,0 g/L, respectivamente, sendo fontes interessantes de substratos para a produção de butanol por *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228.

- Utilizando o meio hidrolisado HC C6 obteve-se uma produção de butanol pelo consumo total tanto da glicose quanto da xilose, de 6,4 g/L. A produtividade volumétrica e o rendimento obtidos, considerando o butanol, foram 0,13 g/L.h e 0,19 $g.g^{-1,}$ respectivamente. A concentração total, produtividade volumétrica e o rendimento de solventes foram 11,5 g/L, 0,24 g/L.h e 0,34 $g.g^{-1}$, respectivamente. Não foi verificada inibição pela presença de 5-HMF, furfural e polifenóis no meio.

- Utilizando o meio hidrolisado HC C5+C6 obteve-se uma produção média de butanol pelo consumo total da glicose e de 50% da xilose, de 9,1 g/L. A produtividade

volumétrica média e o rendimento médio obtidos, considerando o butanol, foram de 0,25 g/L.h e 0,24 $g.g^{-1}$, respectivamente. A concentração média, a produtividade volumétrica média e o rendimento médio de solventes foram 15,5 g/L, 0,43 g/L.h e 0,41 $g.g^{-1}$, respectivamente. Também não se verificou inibição pela presença de 5-HMF, furfural e polifenóis no meio.

- Os ensaios com hidrolisado HC C5+C6, com e sem nutrientes, apresentaram valores de produtividade, em média, 30% superiores aos com meio quimicamente complexos e foram os valores maiores obtidos, comparando-se aos da literatura. Este resultado sinaliza uma potencial economia de capital, tanto em termos de operação (OPEX), quanto no projeto de reatores (CAPEX), pois diminui a necessidade de aquisição de produtos químicos e também de biorreatores muito grandes.

- Não houve necessidade de suplementação de nutrientes na fermentação ABE com o hidrolisado HC C5+C6, pois os sais minerais (cátions e ânions) e fontes de nitrogênio existentes no meio foram suficientes para atender à demanda nutricional exigida pela cepa microbiana. Este resultado contribuiu para a redução dos custos com insumos na etapa de fermentação.

- ✓ A aplicação da pervaporação como técnica para a recuperação dos produtos resultou em sucesso na remoção de butanol e acetona do meio em fermentação, obtendo-se fluxos permeados de 10 e 17 $g/h.m^2$, respectivamente, comprovando a viabilidade técnica do processo com membranas planas de silicone. As concentrações no permeado de butanol e acetona alcançadas durante o período de 8h de acionamento da pervaporação concomitante à fermentação ABE foram de 87 g/L e 234 g/L, respectivamente;

- ✓ Comprovou-se com a pervaporação o decréscimo das quantidades de solventes no meio em fermentação. Como consequência, ocorreu a retomada da fase

acidogênica pela bactéria, dando início a um novo ciclo metabólico com o consumo da xilose e aumentando a capacidade produtora de solventes pela cepa em 17%;

- ✓ Os resultados obtidos de produção de butanol a partir de bagaço de cana excedente suportam os cálculos do potencial de produção de 1,46 milhões de tonelada do produto no país, com volume financeiro envolvido na ordem de U$ 2 bilhões, considerando preço de exportação. Levando-se em conta a acetona também, a quantidade em potencial de produção deste solvente é de 849 mil toneladas, com estimativa de U$ 1 bilhão;

- ✓ Este trabalho contribui de maneira significativa para a viabilização do uso da Biotecnologia, dentro do conceito de Biorrefinaria de segunda geração, através do uso de materiais lignocelulósicos como substrato para a produção de solventes, além de ampliar as possibilidades de participação no mercado de baixo carbono.

6.2. Propostas para trabalhos futuros

- Estudar a fermentação ABE com hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, acoplada à pervaporação, em maior escala e com monitoramento constante do meio fermentativo e do permeado;

- Obtenção do balanço de massa e energia do processo para as estimativas de custos operacionais;

- Estudo da fermentação ABE em modo contínuo com a aplicação da pervaporação, visando o aumento da produtividade;

- Desenvolvimento e utilização de cepas geneticamente modificadas com maior tolerância aos solventes e a maiores concentrações de açúcares;

- Uso de modelos híbridos de recuperação dos produtos (*gas stripping* – *gas stripping*, *gas stripping* - pervaporação) para aumentar a produtividade e diminuir custos envolvidos no processo.

Referências Bibliográficas

ABD-ALLA, M. H.; EL-ENANY, A. E. Production of acetone-butanol-ethanol from spoilage date palm (*Phoenix dactylifera L.*) fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*. **Biomass Bioener**., v.42, p. 172-178, 2012.

ABIQUIM. **Anuário da Indústria Química Brasileira**. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria Química, Ano 42, 2015.

AL-SHORGANI, N.K.; KALIL, M.S.; YUSOFF, W.M. Continuous butanol fermentation of dilute acid-pretreated de-oiled rice bran by *Clostridium acetobutylicum* YM1. **Sci Rep**, v. 9, p. 462, 2019.

AL TABIB, A. I.; AL-SHORGANI, N. K. N.; HASAN, H. A.; HAMID, A. A.; KALIL, M. S. Assessment of the detoxification of palm kernel cake hydrolysate for butanol production by *Clostridium acetobutylicum* YM1. **Biocatal Agric Biotechnol**, v. 13, p. 105-109, 2018.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresour. Technol**., v. 101, p. 4851-4861, 2010.

AMIRI, H.; KARIMI, K.; ZILOUEI, H. Organosolv pretreatment of rice straw for efficient acetone, butanol, and ethanol production. **Bioresour. Technol**., v. 152, p. 450–456, 2014.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnol. Biofuels**, v. 4, n. 3, p. 1–16, 2011.

BARCELOS, C. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; MAEDA, R.; PEREIRA JR., N. Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench].**Boletim Técnico da PETROBRAS**, v. 54, n. 3, p: 29-46, 2011.

BASF. **BASF na América do Sul – Relatório 2018**. Disponível em: <https://www.basf.com/br/pt/who-we-are/sustainability/relatorio-anual-2018111.html>, Acesso em: 11 jul. 2019.

BAUCHER, M.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Crit. Rev. Plant Sci.** v.17, p. 125–197, 1998.

BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electron. J. Biotechnol.**, v.13, n.3, 2010.

BÖRNER, R. A.; ZAUSHITSYNA, O.; BERILLO, D.; SCACCIA, N.; MATTIASSON, B.; KIRSEBOM, H. Immobilization of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 as macroporous aggregates through cryogelation for butanol production. **Process Biochem.**, v.49, p. 10-18, 2014.

BOX, J.D. Investigation of the Folin-Ciocalteau Phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. **Water Resource**, v. 17, n. 5, p. 511-525, 1983.

BRAMONO, S. E.; LAM, Y. S.; ONG, S. L.; HE, J. A mesophilic *Clostridium* species that produces butanol from monosaccharides and hydrogen from polysaccharides. **Bioresour. Technol**., v. 102, p.9558-9563, 2011.

BURANOV, A.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Ind. Crops Prod.**, v.28, p. 237-259, 2008.

BUTANEXT. **Final publication: As easy as A-B-E**. Disponível em <http://butanext.eu/en/publications>, Acesso em 06 jul. 2019.

CARVALHO, M. L. A. Otimização da produção de celulases por *Penicillum funiculosum* em fermentação submersa. 2007 (Dissertação de Mestrado., Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, 2007.

CELTIC RENEWABLES. **Process Overview**. Disponível em: <http://www.celtic-renewables.com/process/process-overview>, Acesso em: 09 jul. 2019.

CGEE. **Química Verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

CONAB. **A geração termoelétrica com a queima do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil – Análise do Desempenho da Safra 2009-2010**. Brasília, DF: Companhia Nacional de Abastecimento, 2011.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira-cana-de-açúcar. Observatório Agrícola, v.6, SAFRA 2019/20 – N.1 – Primeiro levantamento.** Brasília, DF: Companhia Nacional de Abastecimento, 2019.

COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 321–326, 2000.

DÜRRE, P. Fermentative production of butanol – the academic perspective. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, p. 331-336, 2011.

EZEJI, T.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H.P. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 97, p. 1460-1469, 2007.

EZEJI, T.; BLASCHEK, H.P. Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic *Clostridium*. 2013, v.99, p. 5232–5242, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood-Chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlin and New York: Walter de Gruyter, 1984.

GHESHLAGHI, R.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; CHOU, C. P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. **Biotechnol. Adv.**, v.27, p.764-781, 2009.

GOMES, A. C. **Aplicação de surfactantes no pré-tratamento ácido e na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol**. 2009. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GOTTUMUKKALA, L.D.; PARAMESWARAN, B.; VALAPPIL, S.K.; MATHIYAZHAKAN, K.; PANDEY, A.; SUKUMARAN, R.K. Biobutanol production from rice straw by a non acetone producing *Clostridium* sporogenes BE01. **Bioresour. Technol**., v. 145, p.182–187, 2013.

GREEN, E.M. Fermentative production of butanol – the industrial perspective. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, p. 337-343, 2011.

Jones, D.T.; Woods, D.R. Acetone–butanol fermentation revisited. **Microbiol. Rev.**, v.50, p. 484-524, 1986.

GU, Y.; JIANG, Y.; YANG, S.; JIANG, W. Utilization of economical substrate-derived carbohydrates by solventogenic *Clostridium*: pathway dissection, regulation and engineering. **Curr. Opin. Biotechnol.,** v. 29, p. 124-131, 2014.

GUO, T.; HE, A.; DU, T.; ZHU, D.; LIANG, D.; JIANG, M.; WEI, P.; OUYANG, P. Butanol production from hemicellulosic hydrolysate of corn fiber by a *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor-tolerance. **Bioresource Technology**, v.135, p. 379-385, 2013.

HASSUANI, S.J. **Resíduos agrícolas – palha**: Curso Internacional Energia na Indústria de açúcar e álcool. São Paulo: Centro de Tecnologia Canavieira, 2005.

HENDRIKS A.T.W.M., ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 10-18, 2009.

HOAREAU, W. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 86, p. 567-576, 2004.

HOU, X; FROM, N.; ANGELIDAKI, I.; HUIJGEN, W. J. J.; BJERRE, A. Butanol fermentation of the brown seaweed *Laminaria digitata* by *Clostridium beijerinckii* DSM-6422. **Bioresour. Technol.**, v. 238, p. 16-21, 2017.

HU, J.; ARANTES, V.; PRIBOWO, A. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy Environ. Sci.**, v. 7, p. 2308–2315, 2014.

INVESTING.COM. **Petróleo Brent Futuros**. Disponível em: https://br.investing.com/commodities/brent-oil-streaming-chart, Acesso em: 10 jul. 2019.

JANG, Y.; MALAVI, J. Y.; LEE, J; PARK, J. H.; IM, J. A.; EOM, M.; LEE, J.; LEE, S.; SONG, H.; CHO, J.; SEUNG, D. Y.; LEE, S. Y. Enhanced Butanol Production Obtained by Reinforcing the

Direct Butanol-Forming Route in *Clostridium acetobutylicum*. **American Society for Microbiology**, v. 3, n. 5, 2012.

JANG, Y.;MALAVIYA, A.; CHO, C.; LEE, J.; LEE, S. Y. Butanol production from renewable biomassa by *Clostridium*. **Bioresour. Technol.**, v. 123, p. 653-663, 2012.

JENKINS, R.W.; MUNRO, M.; NASH, S.; CHUCK, C. J. Potential renewable oxygenated biofuels for the aviation and road transport sectors. **Fuel**, v. 103, p. 593-599, 2013.

JIANG, M.; CHEN, J.; HE, A.; WU, H.; KONG, X.; LIU, J.; YIN, C.; CHENG, W.; CHEN, P. Enhanced acetone/butanol/etanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH control strategy. **Process Biochem**, v.49, p. 1238-1244, 2014.

JÖNSSON, L.J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnol. Biofuels,** v.6, p. 1-10, 2013.

KHEYRANDISH, M.; ASADOLLAHI, M. A.; JEIHANIPOUR, A.; DOOSTMOHAMMADI, M; RISMANI-YAZDI, H.; KARIMI, K. Direct production of acetone-butanol-ethanol from waste starch by free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. **Fuel**, v.142, p.129-133, 2015.

KIM, I. J.; LEE, H. J.; CHOI, I.-G.; KIM, K. H. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, n. 20, p. 8469–8480, 2014.

KUMAR, M.; GAYEN, K. Developments in biobutanol production: New insights. **Appl. Energy**, v. 88, p. 1999-2012, 2011.

LI, S.; ZHOU. Y.; LUO, Z.; CUI, Y.; XU, Y.; LIN, L.; ZHAO, M.; GUO, Y.; PANG, Z. Dual function of ammonium acetate in acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. **Bioresour. Technol.**, v. 267, p.319-325, 2018.

LI, J.; DU, Y.; BAO, T.; DONG, J.; LIN, M.; SHIM, H.; YANG, S.T. *n*-Butanol production from lignocellulosic biomass hydrolysates without detoxification by *Clostridium tyrobutyricum* Δack-adhE2 in a fibrous-bed bioreactor. **Bioresour. Technol.**, v. 289, 121749, 2019.

LIAO, Z.; GUO, X.; HU, J.; SUO, Y.; FU, H.; WANG, J. The significance of proline on lignocellulose-derived inhibitors tolerance in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Bioresour. Technol.**, v. 272, p. 561-569, 2019.

LIU, S. Bioprocess Engineering – Kinetics, Sustainability and Reactor Design: 2 Ed. Syracuse, NY, USA: Elsevier, 2013.

LIU, Z.; YING, Y.; LI, F.; MA, C.; XU, P. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran. J. Ind. **Microbiol. Biotechnol**., v. 37, p. 495 – 501, 2010.

LOPES, E. S. **Cinética, estudo e avaliação do processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído**. 2015. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

LOPEZ-CONTRERAS, A.M.; CLAASSEN, P.A.; MOOIBROEK, H.; DE VOS, W.M. Utilization of saccharides in extruded domestic organic waste by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for production of acetone, butanol and ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.54, p. 162–167, 2000.

LU, C.; ZHAO, J.; YANG, S.T.; WEI, D. Fed-batch fermentation for butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping. **Bioresour. Technol.**, v. 104, p. 380–387, 2012.

LU, C.; DONG, J.; YANG, S. Butanol production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation-gas stripping process. **Bioresour. Technol.**, v.143, p. 467-475, 2013.

MAGALHÃES, B. L.; GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G.; BROCCHI, M. Improved n-butanol production from lignocellulosic hydrolysate by *Clostridium* strain screening and culture-medium optimization. **Biomass Bioenergy**, v. 108, p. 157-166, 2017.

MAITI, S.; GALLASTEGUI, G.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L.; DROGUI, P.; BUELNA, G.; VERMA, M. A re-look at the biochemical strategies to enhance butanol production. **Biomass Bioenergy**, v. 94, p.187-200, 2016.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS DO BRASIL. Disponível em <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>. Acesso em: 02 jul. 2019.

MORADI, F.; AMIRI, H.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; EHSANI, M. R.; KARIMI, K. Improvement of acetone, butanol and ethanol production from rice straw by acid and alkaline pretreatments. **Fuel**, v. 112, p. 8-13, 2013.

MORDOR INTELLIGENCE. **Bio-butanol market – growth, trends and forecast (2019-2024)**. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/bio-butanol-market?gclid=CjwKCAjw04vpBRB3EiwA0IieapiKoIjSWZd9ygBbeDmFafCKcQo2jYSFwYxKPa46dNUZKzgAPj0NthoCkCAQAvD_BwE>, Acesso em 08 jul. 2019.

NATALENSE, J. C. **Prospecção tecnológica de biobutanol no contexto brasileiro de biocombustíveis**. 2013. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Nuclear – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

NDABA, B.; CHIYANZU, I.; MARX, S. *n*-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review. **Biotechnol. Rep.**, v. 8, p. 1-9, 2015.

NETO, H. F. S.; MARQUES, M. O.; PAULI, F. A.; JÚNIOR, L.C.T. **Produção e produtividade de bagaço da cana-de-açúcar ao longo da safra, visando a cogeração de energia**. Goiânia: Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, 2011.

NEXANT Inc. **Biobutanol and Downstream Markets: Will you be buying bio?** Topical Report, 2013.

NOTÍCIAS AGRÍCOLAS. **Home/Vídeos/Sucroenergético**. Disponível em: <http://www.noticiasagricolas.com.br/videos/sucroenergetico/176995-precos-internacionais-do-acucar-melhoram-e-brasil-registra-recordes-em-reais-mesmo-com-queda-do-dolar.html#.WBctXE2QzIU>. Acesso em: 31 out. 2016.

NOVOZYMES BIOENERGY. **Novozymes Cellic® CTec3**. Disponível em: <http://www.bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/CellicCTec3/Pages/default.aspx>. Acesso em: 01 out. 2016.

PACHAPUR, V.L.; SARMA, S.J.; MAITI, S.; BRAR, S.K. Chapter 26 – Case Studies on the Industrial Production of Renewable Platform Chemicals. In: __. **Platform Chemical Biorefinery**. 1 ed. Quebec, Canada: Elsevier, 2016. cap. 26, p. 485-493.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanism of inhibition. **Bioresour. Technol.**, v.74, p. 25-33, 2000.

PANG, Z. W.; LU, W.; ZHANG, H.; LIANG, Z.W.; LIANG, J.J.; DU, L. W.; DUAN, C. J.; FENG, J. X. Butanol production employing fed-batch fermentation by *Clostridium acetobutylicum* GX01 using alkali-pretreated sugarcane bagasse hydrolysed by enzymes from *Thermoascus aurantiacus* QS 7-2-4. **Bioresour. Technol.**, v. 212, p. 82-91, 2016.

PHYTONIX SOLAR CHEMICALS. **Phytonix Corporation Featured in Industrial Biorenewables: A Practical Viewpoint**. Disponível em: <https://phytonix.com/?p=645>. Acesso em: 08 jul. 2019.

POPOVIC, J.; YE, X.; HALUSKA, A.; FINNERAN, K. T. Ferric iron and extracellular electron shuttling increase xylose utilization and butanol production during fermentation with multiple solventogenic bacteria. **Appl. Microbiol. Biot.**, v. 101(21), p. 8053-8061, 2017.

PORRO, D.; BRANDUARDI, P.; SAUER, M. Old obstacles and new horizons formicrobial chemical production. **Curr. Opin. Biotechnol**. v.30, p. 101–6, 2014.

PUBCHEM. **Open Chemistry Database.** Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 10 jun. 2019.

PUGAZHENDHI, A.; MATHIMANI, T.; VARJANI, S.; RENE, E.; KUMAR, G.; KIM, S.; PONNUSAMY, V. K.; YOON, J. Biobutanol as a promising liquid fuel for the future – recent updates and perspectives. **Fuel**, v. 253, p. 637-646, 2019.

QURESHI, N.; EZEJI, T.C.; EBENER, J.; DIEN, B.S.; COTTA, M.A.; BLASCHEK, H.P. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. **Bioresour. Technol.**, v.99, p.5915–5922, 2008.

QURESHI, N.; SAHA, B.C.; DIEN, B.; HECTOR, R.E.; COTTA, M.A. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I - Use of barley straw hydrolysate. **Biomass Bioenergy**, v. 34, p.559–565, 2010a.

QURESHI, N.; BLASCHEK, H.P. Butanol recovery from model solution/fermentation broth by pervaporation: evaluation of membrane performance. **Biomass Bioenergy**, v.17 (2), p. 175-184, 1999.

QURESHI, N.; SAHA, B.C.; HECTOR, R.E.; DIEN, B.; HUGHES, S.; LIU, S.; ITEN, L.; BOWMAN, M.J.; SARATH, G.; COTTA, M.A. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II - Use of corn stover and switchgrass hydrolysates. **Biomass Bioenergy,** v.34, p.566–571, 2010b.

QURESHI, N.; SAHA, B.C.; COTTA, M.A. Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, v.30, p.419– 427, 2007.

RAGANATI, F.; PROCENTESE, A.; OLIVIERI, G.; RUSSO, M. E.; SALATINO, P.; MARZOCCHELLA, A. MFA of *Clostridium acetobutylicum* pathway: the role of glucose and xylose on the acid formation/uptake. **Chem. Eng. Trans.**, v. 38, p. 337-342, 2014.

RANJAN, A.; KHANNA, S.; MOHOLKAR, V.S. Feasibility of rice straw as alternative substrate for biobutanol production. **Appl. Energy**, v.103, p. 32-38, 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** Campinas: Cárita Editora, 2014.

RUGGIERO, R. Photodegradation of sugarcane bagasse fibers. Influence of acetylation or grafting UV-absorber and/or hindered nitroxide radical on their photostability**. J. Braz. Chem. Soc.** v. 17, n. 4, p. 763-770, 2006.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconvertion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.,** v. 30, p. 279-291, 2003.

SAIJONKARI-PAHKALA, K. **Non-woods plants as raw material for pulp and paper**. 2001. 101 f. Tese de Doutorado - MTT Agrifood Research Finland, Finland, 2001.

SALOHEIMO, M.; PALOHEIMO, M.; HAKOLA, S.; PERE, J.; SWANSON, B.; NYYSSÖNEN, E.; BHATIA, A.; WARD, M.; PENTTILÄ, M. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, n. 17, p. 4202–4211, 2002.

SAUER, M. Industrial production of acetone and butanol by fermentation – 100 years later. **Biotechnology & Synthetic Biology**, v. 363, n. 13, 2016.

SHLESER, R. **Ethanol Production in Hawaii: Processes, Feedstocks and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii**. Disponível em: <www.hawaii.gov.> Acesso em: 15 nov. 2015.

SLUITER A.; HAMES, B.; RUIZ R.; SCARLATA, C.; SLUITER J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. Disponível em: < https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>, Acesso em 20 mar 2015.

SLUITER A.; RUIZ R.; SCARLATA, C.; SLUITER J.; TEMPLETON, D. **Determination of Extractives in Biomass**. Disponível em: < https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42619.pdf>. Acesso em 20 mar 2015.

SLUITER, J.; RUIZ, R.O.; SCARLATA, J.; SLUITER, A.D.; TEMPLETON, D. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 9043-9053, 2010.

SLUITER, J.; CHUM, H.; GOMES, A.C; TAVARES, R.P.A.; AZEVEDO, V. PIMENTA, M.T.B.; RABELO, S. C.; MARABEZI, K.; CURVELO, A.A.S; ALVES, A.R.; GARCIA, W. T.; CARVALHO, W.; ESTEVES, P. J.; MENDONÇA, S.; OLIVEIRA, P. A.; RIBEIRO, J.A.A.; MENDES, T. D.; VINCENTIN, M. P.; DUARTE, C. L.; MORI, M. N. Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study. **Anal. Sci.**, v. 99, p. 579-585, 2016.

SUN, Z.; LIU, S. Production of butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. **Biomass Bioenergy**, v.39, p. 39-47, 2012.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresour. Technol.**, v. 83(1), p. 1-11, 2002.

SUN, F. F.; HONG, J.; HU, J.; SADLLER, J.; FANG, X.; ZHANG, Z.; SHEN, S. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 79, p. 42-48, 2015.

SYDNES, M. O. One-Pot Reactions: A Step Towards Greener Chemistry. **Curr. Green Chem**., v. 3, p. 216-226, 2016.

SZCZERBOWSKI, D.; PITARELO, A. P.; FILHO, A. Z.; RAMOS, L. P. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydr. Polym.**, v. 114, p. 95-101, 2014.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **Int. J. Mol. Sci**, v.9, p. 1621–1651, 2008.

TUDOR, R.; ASHLEY, M. Enhancement of industrial hydroformylation processes by the adoption of Rhodium-based catalyst: Part II. **Platinum Metals Rev**. v.51, p. 164-171, 2007.

TRACY, B. P.; JONES, S. W.; FAST, A. G.; INDURTHI, D. C.; PAPOUTSAKIS, E. T. *Clostridium*: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.23, p. 364-381, 2012.

TSAI, T.; LO, Y.; CHANG, J. Effect of medium composition and pH control strategies on butanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum*. **Energy Procedia**, v. 61, p. 1691-1694, 2014.

VAN DER MERWE, A. **Evaluation of Different Process Designs for Biobutanol Production from Sugarcane Molasses**. Dissertação de Mestrado - Stellenbosch: Universidade de Stellenbosch, mar. 2010.

WU, H.; HE, A.; KONG, X.; JIANG, M.; CHEN, X.; ZHU, D.; LIU, G.; JIN, W. Acetone-butanol-ethanol production using pH control strategy and immobilized cells in an integrated fermentation-pervaporation process. **Process Biochem.**, v. 50, p. 614-622, 2015.

WU, Y.; YANG, Y.; REN, C.; YANG, C.; YANG, S.; GU, Y.; JIANG, W. Molecular modulation of pleiotropic regulator CcpA for glucose and xylose coutilization by solvent-producing *Clostridium acetobutylicum*. **Metab. Eng.**, v. 28, p. 169-179, 2015.

YANG, M.; KUITTINEN, S.; VEPSÄLÄINEN, J.; ZHANG, J.; PAPPINEN, A. Enhanced acetone-butanol-ethanol production from lignocellulosic hydrolysates by using starchy slurry as supplement. **Bioresource Technol.,** v. 243, p. 126-134, 2017.

YERUSHALMI, L. Physiological aspects of the acetone-butanol fermentation. 1985. (Thesis Doctor of Philosophy) – **McGill University**, Department of Chemical Engineering, Montreal, Canada, 1985.

XUE, C.; ZHAO, J.; CHEN, L.; YANG, S.; BAI, F. Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnol. Adv.**, v. 35, p. 310-322, 2017.

ZABIHI, R.; MOWLA, D.; KARIMI, G.; SETOODEH, P. Examination of the impacts of salinity and culture media compositions on *Clostridium acetobutyilicum* NRRL B-591 growth and acetone-butanol-ethanol biosynthesis. **J. Environ. Chem. Eng.**, v. 7, 102835, 2019.

ZHANG, G.; CHENG, H.; SU, P.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; LU, Y; LIU, Q. PIM-1/PDMS hybrid pervaporation membrane for high-efficiency separation of n-butanol-water mixture under low concentration. **Sep. Purif. Technol.**, v. 216, p. 83-91, 2019.

ZHENG, J.; TASHIRO, Y.; WANG, Q.; SAKAI, K.; SONOMOTO, K. Feasibility of acetone–butanol–ethanol fermentation from eucalyptus hydrolysate without nutrients supplementation. **Appl. Energy**, v. 140, p. 113-119, 2015.

ANEXOS

Artigos publicados em periódicos e pedidos de patentes (depósito e publicação)

Electronic Journal of Biotechnology 42 (2019) 16–22

Contents lists available at ScienceDirect

Electronic Journal of Biotechnology

Acetone–butanol–ethanol fermentation from sugarcane bagasse hydrolysates: Utilization of C5 and C6 sugars

Absai da Conceição Gomes [a,*], Maria Isabel Rodrigues [b], Douglas de França Passos [c], Aline Machado de Castro [a], Lidia Maria Mello Santa Anna [a], Nei Pereira Jr. [c]

[a] Biotechnology Division, Research and Development Center, PETROBRAS, Av. Horácio Macedo, 950, Rio de Janeiro, RJ 21941-915, Brazil
[b] Protimiza Consulting and Training in Experimental Design and Process Optimization, Campinas, SP 13085-000, Brazil
[c] Biochemical Engineering Department, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Horácio Macedo 2030, Bloco E, Rio de Janeiro, RJ 21949-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 June 2019
Accepted 15 October 2019
Available online 23 October 2019

Keywords:
Acetone
Bagasse
Biofuels
Butanol
Clostridium acetobutylicum
Ethanol
Fermentation
Hydrolysate
Saccharum
Sugarcane bagasse

ABSTRACT

Background: Fuels and chemicals from renewable feedstocks have a growing demand, and acetone, butanol and ethanol (ABE) are some relevant examples. These molecules can be produced by the bacterial fermentation process using hydrolysates generated from lignocellulosic biomass as sugarcane bagasse, one of the most abundant sources of lignocellulosic biomass in Brazil. It originates as a residue in mills and distilleries in the production of sugar and ethanol.

Results: In the present work, two strategies to generate hydrolysates of sugarcane bagasse were adopted. The fermentation of the first hydrolysate by *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228 resulted in final concentrations of butanol, acetone and ethanol of 6.4, 4.5 and 0.6 g/L, respectively. On the other hand, the second hydrolysate presented better results (averages of 9.1, 5.5 and 0.8 g/L, respectively), even without the need for nutrient supplementation, since key elements were already present in the medium. The productivity (Q_P) and yield ($Y_{P/S}$) of the solvents with second hydrolysate were 0.5 g/L·h^{-1} and 0.4 g/g, respectively.

Conclusions: The results described herein open new perspectives for the production of important molecules from residual lignocellulosic biomass for the fuel and chemical industries within the context of second-generation biorefinery.

How to cite: Gomes AC, Rodrigues MI, Passos DF, et al. Acetone-butanol-ethanol fermentation from sugarcane bagasse hydrolysates: utilization of C5 and C6 sugars. Electron J Biotechnol 2019;42. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.10.004.

© 2019 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

The industrial demand for renewable and sustainable fuels and chemicals is already a reality today and is expected to grow significantly in the future [1]. Several companies are currently investing in development for the production of biobutanol, using the infrastructure of corn or sugarcane ethanol production. Efforts are being applied in genetic modification and in downstream stages, in addition to the use of other substrate sources [2]. In this context, lignocellulosic biomass represents a feedstock with massive potential for the production of biofuels and chemicals because it is the most abundant renewable material in the world and because in many cases, it is considered a residue that does not compete with food. In Brazil alone, the main agricultural sectors generate approximately 350 million tons of biomass annually, of which approximately 20% is available for use [3], and sugarcane bagasse is the major biomass. The 2019/2020 harvest season yielded a sugarcane production of 615.98 million tons, with an average amount of bagasse of 154 million tons [4].

In recent decades, there has been an increase in microbial production aimed at high-value molecules in the market and, at the same time, the search for inexpensive and environmentally friendly substrates that can make the biotechnology process viable. In this context, traditional fermentations such as the production of acetone, butanol and ethanol, named ABE fermentation, have returned to the market, adding new technologies of bioprocessing, genetic and metabolic engineering [5]. This bioprocess occurs in two steps: the first step is an acidogenic phase, where substrates (sugars) are consumed for the production of organic acids (butyric acid and acetic acid), resulting in a pH drop to 4–5; then, acids are converted to solvents (butanol, acetone and ethanol) in a second step, known as the solventogenic phase. Butanol and acetone are the main

* Corresponding author.
E-mail address: absai1278@gmail.com (Absai da Conceição Gomes).
Peer review under responsibility of Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.10.004
0717-3458/© 2019 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

metabolites from ABE fermentation, produced by *Clostridia*, followed by ethanol (in a small amount).

The literature presents several fermentation studies based on wild or genetically modified microorganisms to obtain these chemicals. Al-Shorgani et al. [6] used batch and continuous fermentations of dilute acid-pretreated deoiled rice bran for butanol production. Pretreatment of biomass with dilute sulfuric acid (1%) resulted in the production of hydrolysate with 42.1 g/L total sugars (25.6 g/L glucose, 15.1 g/L xylose and 1.5 g/L cellobiose). The hydrolysate was used as the fermentation medium. The maximum concentration of solvents achieved was 11.2 g/L (4.4 g/L acetone, 5.9 g/L butanol and 0.9 g/L ethanol), which was attained by hydrolysate detoxification with activated charcoal to remove fermentation inhibitors such as furfural, 5-hydroxymethilfurfural (5-HMF), acetic acid, formic acid and levulinic acid.

Hydrolysates of corn fiber, cotton stalk, soybean hull and sugarcane bagasse obtained from dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis were submitted to acetone–butanol–ethanol fermentation without a previous detoxification step. The maximum butanol concentration of 15.6 g/L was obtained with a corresponding yield of 0.31 g/g and productivity of 0.31 g/L·h^{-1} by the fermentation of cotton stalk hydrolysate. These values are the highest reported in the literature for a lignocellulosic feedstock obtained by immobilized genetically engineered *Clostridium tyrobutyricum* [7].

Liao et al. [8] compared the different performances of naturally occurring and genetically modified *Clostridium acetobutylicum* bacteria. The authors used soybean straw that was pretreated with dilute acid and enzymatically hydrolyzed. The initial glucose and xylose levels were 50 and 15 g/L, respectively. The butanol concentrations were 8 g/L with the genetically modified strain, reaching maximum volumetric productivity and butanol yield of 0.11 g/L·h^{-1} and 0.14 g/g, respectively. The hydrolysate was not detoxified, and the engineered strain presented twice the productivity when compared to that of the wild strain.

Magalhães et al. [2] used sugarcane bagasse hydrolysate to produce ABE by *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923. The authors reported the production of 4.5, 1.4 and 0.3 g/L of butanol, acetone and ethanol, respectively, with an ABE yield and volumetric productivity of 0.09 g/g and 0.30 g/L·h^{-1}, respectively. The hydrolysate was not detoxified, and the strain showed a consumption of 96.1% glucose and 53.1% xylose.

Liu et al. [9] used switchgrass hydrolysate for butanol production by naturally occurring *C. acetobutylicum*. Fermentability of the hydrolysate was only possible after the detoxification procedure with activated carbon, generating a concentration of 11 g/L butanol with a total solvent (ABE) concentration of 17 g/L. The corresponding response variables included a butanol yield of 0.20 g/g and a volumetric productivity of 0.15 g/L·h^{-1}.

In another study, sugarcane bagasse was pretreated with alkali and enzymatically hydrolyzed. The hydrolysates were used to produce butanol in fed-batch fermentation by *C. acetobutylicum*. At 60 h, 14.2 and 21.0 g/L of butanol and acetone–butanol–ethanol (ABE) were produced from 68.9 g/L of total sugars with yields of 0.22 and 0.33 g/g, respectively. In fed-batch fermentation, glucose was completely consumed in 56 h, but xylose was consumed more slowly; after 56 h, xylose utilization ceased, and 45% of the pentose remained in the fermented medium [10].

The main motivation of this work is to contribute to the development of a bioprocess within the context of the second-generation (2G) biorefinery, i.e., lignocellulosic biorefinery. This concept is of utmost importance, particularly for countries with agricultural activities as a natural vocation. The approach is based on exploiting the use of biomass for the production of fuels and chemicals in a more integrated production system. The most interesting aspect of the second-generation technologies is the use of abundant agricultural residues, positioning them as feedstocks. In this context, this work is aimed at investigating ABE fermentation, defining strategies for improving the production performance. Thus, dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis were defined and executed producing hydrolysates rich in sugars, which are fermented promptly, with no detoxification step and nutrient addition prior to fermentation. Therefore, the present work aims to produce acetone, butanol and ethanol using non-detoxified sugarcane bagasse hydrolysates rich in xylose and glucose by *C. acetobutylicum* DSM 6228.

2. Materials and methods

2.1. Hydrolysates

Sugarcane bagasse was provided by a sugarcane mill in Goiás State, Brazil. The wet biomass (5 kg with 50% moisture) was submitted to pretreatment with 25% (*w*/*w*) bagasse in 1% (*v*/*v*) sulfuric acid at 121°C for 30 min in an 80 L pilot plant. The resulting wet solid was pressed, and then, the pH of the liquid fraction (named HC5) and solid fraction was adjusted to 5.0 using 30% (*v*/*v*) ammonium hydroxide. The solid fraction was subjected to enzymatic hydrolysis with two different liquid phases (water or HC5) in a mechanically stirred bioreactor with the commercial preparation CellicCTec® 3 (15 mg protein/g cellulose), which was kindly supplied by Novozymes® Latin America LTDA. The total solid content was 20% (*w*/*w*) suspended in water or HC5, and hydrolysis was carried out for 72 h at pH 5 and 50°C. The reaction mixture was centrifuged at 30,000 × g for 20 min at 20°C. The resulting liquid fraction using water was named sugarcane bagasse hydrolysate 1 (SBH-1), and the resulting liquid fraction using HC5 instead of water (under the same operating conditions described above) was named sugarcane bagasse hydrolysate 2 (SBH-2).

2.2. Microorganism, activation and propagation steps

The study was carried out with *C. acetobutylicum* DSM6228, purchased from the DSMZ (Deutsche Sammulung von Mikroorganismen und Zellkulturen) culture collection. The microorganism was kept in a stock solution of 30% (*v*/*v*) glycerol in 2 mL tubes at -80°C [11]. The activation step consisted of transferring one tube to each of the two 100 mL vials each containing 50 mL of RCM (reinforced clostridial medium) and resazurin at 1 mg/L (anaerobiosis indicator). The components of RCM are as follows: beef extract (10 g/L), peptone (10 g/L), sodium chloride (5 g/L), glucose (5 g/L), yeast extract (3 g/L), sodium acetate (3 g/L), starch (1 g/L), L-cysteine-HCl (0.5 g/L) and agar (0.5 g/L). The flasks were kept without stirring at 37°C for 24 h [12]. The microorganism propagation step was carried out in a 1.3 L bioreactor (BioFlo 110, New Brunswick Co.) at 37°C and 50 rpm for 8 h with 500 mL of medium containing: glucose (12 g/L), peptone (6 g/L) and yeast extract (6 g/L). This step used 100 mL of inoculum from the activation flask.

2.3. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates

After 8 h of propagation in the bioreactor, 500 mL of substrate was added to the bioreactor, and the fermentation was carried out for the next 80–84 h under the same conditions used for propagation. Assays were first carried out with chemically defined media (glucose and xylose solutions, separately, according to the work of Sun and Liu [13] and Jiang et al. [14]), then with SBH-1 and finally with SBH-2. During all fermentations, the pH was measured but not controlled. The supplementation of nutrients was performed based on the medium composition reported by Sun and Liu [13], composed of (in g/L in the final solution) yeast extract (1.0), $MnSO_4$ (0.01), $MgSO_4$ (0.2), KH_2PO_4 (0.5), K_2HPO_4 (0.5), sodium acetate (0.01), and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.01). SBH-2 was the chosen substrate to carry out fermentations with and without nutrient addition. The yield of product per consumed substrate ($Y_{P/S}$) was determined for each fermentation through the

ratio between the total solvent concentration (butanol, acetone and ethanol, in g/L) and the total consumed substrate (glucose and xylose, also in g/L). Productivity (Q_P) was calculated using the ratio between solvent concentration (g/L) and time (h).

2.4. Analytical methods

The concentrations of glucose, xylose, acetone, butanol, ethanol, butyric acid and acetic acid (or acetate) were determined using an HPLC (Thermo Scientific) according to the method developed for this work. The analyses were conducted with 0.005 M H_2SO_4 (mobile phase) at 0.5 mL/min at 80°C and a Vertex Eurokat® H column. External standards of each chemical with a minimum purity of 99% were used for the identification and quantification. The total polyphenols (TP) in lignocellulosic hydrolysates were quantified according to the Folin–Ciocalteu method [15] using a HACH DR6000 spectrophotometer ($\lambda = 510$ nm), and tannic acid was used as a standard. The cell concentration on a dry basis was quantified by turbidity in the same spectrophotometer at a wavelength of 600 nm [16,17,18]. Quantification of the sulfate and phosphate content in the hydrolysates was carried out by ion chromatography with an 861 Advanced Compact IC system (Metrohm) with a Metrosep A Supp4 250/4.0 column, eluent containing 1.8×10^{-3} mol/L Na_2CO_3 and 1.7×10^{-3} mol/L $NaHCO_3$, flow at 1 mL/min, and injection volume of 20 µL at room temperature.

Metal analysis (Mn^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Na^+ and Fe^{2+}) was performed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), with a Perkin Elmer Sciex Optima 3300 DV system, according to the methodology of ASTM D1976 96 [19]. Ammoniacal nitrogen and total nitrogen were measured according to the methodologies of 4500-NH_3 nitrogen (ammonia) [20] and ASTM D5176–08 [21], respectively.

3. Results and discussion

3.1. Fermentation of sugarcane bagasse hydrolysates

The fermentation tests carried out with chemically defined media using glucose and xylose as the carbon sources and with the addition of nutrients are presented in Fig. 1 and Fig. 2. For the assays with glucose and xylose as substrates, the yield ($Y_{P/S}$) values obtained, based on the solvents as the products, were 0.32 and 0.47 g/g, respectively, and the productivity (Q_P) values were 0.36 and 0.32 g/L·h^{-1}. The glucose fermentation assay was carried out for 80 h with almost total consumption of the substrate in 32 h, i.e., 35.4 g/L,

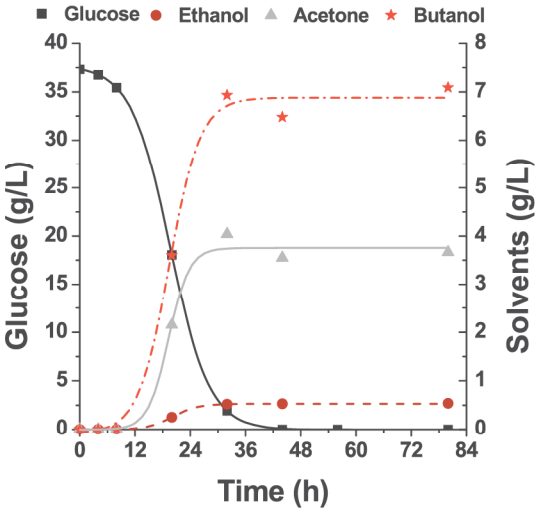


Fig. 1. Time course of ABE fermentation with glucose as substrate. Temperature: 37°C and 50 rpm in 1 L bioreactor.

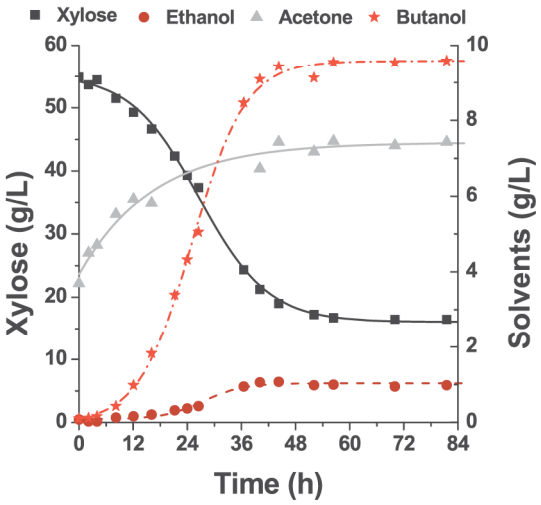


Fig. 2. Time course of ABE fermentation with xylose as substrate. Temperature: 37°C and 50 rpm in 1 L bioreactor.

with a butanol, acetone and ethanol production of 6.9, 4.0 and 0.5 g/L, respectively. The time required for xylose fermentation was 56 h, consuming 38 g/L of carbohydrate and leaving a residual of 16.7 g/L. In this test, the production of butanol, acetone and ethanol was 9.6, 7.5 and 1.0 g/L, respectively. Although xylose remained, the values obtained were even higher than those of the glucose assay. It is also seen that the amount of substrate used by the microorganism was between 30 and 40 g/L. The most important finding of these tests is the ability of the strain to metabolize both glucose and xylose to produce the solvents, with butanol as the major product. Jiang et al. [14] used glucose as a substrate for the production of butanol by *Clostridium beijerinckii* IB4, obtaining butanol, acetone and ethanol concentrations of 11, 3 and 0.2 g/L, respectively, after 40 h of fermentation. The glucose consumption in this period was 41 g/L, leaving a residual of 18 g/L. The yield and productivity of the solvents obtained were 0.34 g/g and 0.35 g/L·h^{-1}, respectively. Kheyrandish et al. [22] used glucose as a substrate for the production of butanol, acetone and ethanol at initial substrate concentrations of 20, 40, 60 and 80 g/L. The authors obtained an increase of 80% in butanol production when they increased the glucose concentration from 20 to 40 g/L but did not observe a significant increase in the product with higher initial concentrations of substrate. The authors attributed the results to catabolic repression caused by glucose at substrate amounts above 40 g/L. The butanol, acetone and ethanol concentrations achieved were 9.3, 3.4 and 0 g/L, respectively, after 48 h of fermentation and starting with 40 g/L of glucose. Sun and Liu [13] used xylose as a substrate for butanol production by *C. acetobutylicum* ATCC 824, obtaining butanol, acetone and ethanol concentrations of 7.9, 2.0 and 1.5 g/L after 96 h of fermentation. The consumption of xylose in this period was 47 g/L, leaving a residual of 13 g/L. The solvent yield and productivity were 0.24 g/g and 0.12 g/L·h^{-1}, respectively. After fermentation with chemically defined media,

Table 1
Composition of sugarcane bagasse enzymatic hydrolysates (in g/L) for 2G ABE fermentation.

Component	SBH-1	SBH-2
Glucose	51.30 ± 0.97	69.83 ± 0.05
Xylose	17.80 ± 0.35	52.06 ± 1.54
Acetic acid	5.42 ± 0.02	11.58 ± 0.52
5-HMF	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.02
Furfural	0.36 ± 0.01	0.62 ± 0.10
Total polyphenol	1.83 ± 0.02	3.21 ± 0.04

sugarcane bagasse hydrolysates (SBH-1 and SBH-2) were used separately as substrates for ABE production in the instrumented bioreactor. Table 1 presents the composition of the hydrolysates used in this work.

The processes for deconstructing the biomass fibers (pretreatment and enzymatic hydrolysis) were applied to use the main lignocellulosic sugars, glucose and xylose, which together account for more than 70% of the composition of sugarcane bagasse on a dry basis. SBH-1 contained a total carbohydrate concentration of approximately 70 g/L, with glucose being the predominant sugar, and hydrolysate SBH-2 presenting a total sugar concentration of approximately 122 g/L. The concentrations of furfural and total polyphenols obtained were higher in SBH-2 than in SBH-1 because of the C5 liquid stream that was gather together with the pretreated solids to generate SBH-2. The dilute acid pretreatment is intended to disrupt the lignocellulosic material and chemically hydrolyze most of the hemicellulose, with xylose as the major sugar in this fraction, which continues to react with the acid catalyst in the medium, generating furfural. A small portion of lignin is also solubilized under acid pretreatment conditions, generating polyphenols. For the preparation of SBH-1, the pretreatment liquid fraction was mostly removed by filter press. The residual solid was mixed with water and enzyme to undergo enzymatic hydrolysis and generate the hydrolysate SBH-1, thereby diluting furfural and polyphenols in the medium.

SBH-1 and SBH-2 were subjected to ABE fermentation with *C. acetobutylicum* DSM 6228, and the results are presented in Fig. 3 and Fig. 4, respectively. It can be observed from the time course of Fig. 3 that the acidogenic phase occurred in the first 24 h of fermentation. After this period, butanol, acetone and ethanol (solventogenic phase) were produced, achieving concentrations of 6.4, 4.5 and 0.6 g/L, respectively, after 48 h, corresponding to a total concentration of solvents of 11.5 g/L. The volumetric productivity (Q_P) was 0.25 g/L·h^{-1}. Concerning the consumption of substrates, the bacterium used 25 g/L of glucose and 8.3 g/L of xylose during the process. These results showed that it was possible to harness the SBH-1 hydrolysate without the need for detoxification to remove potential inhibitors, such as 5-HMF, furfural and polyphenols.

Regarding SBH-2, the acidogenic phase was shorter (8 h), followed by a partial consumption of organic acids and the production of solvents (Fig. 4). The substrate consumption was 28.4 g/L for glucose and 9.4 g/L for xylose. Glucose was preferably consumed by the strain, and at the end of the process, 55% of xylose remained unconsumed. The total use of glucose and part of xylose was due to the higher initial concentration of sugars in this stream (approximately 55 g/L), which inhibited xylose uptake due to catabolic repression caused by glucose, as reported by Kheyrandish et al. [22]. It is worth noting that in contrast to SBH-2, in the SBH-1 strategy, both sugars were totally consumed. The reason behind this result is that the initial sugar concentration was approximately 35 g/L lower in SBH-1 than in SBH-2. *C. acetobutylicum* consumes sugars in a range of 30–40 g/L. The maximum butanol, acetone and ethanol production was 9.1, 5.5 and 0.9 g/L, respectively. The values of Q_P and yield ($Y_{P/S}$) were 0.5 g/L·h^{-1} and 0.4 g/g, respectively. The possibility of eliminating inputs of nutrients in the fermentation medium was evaluated by assessing the fermentability of SBH-2, without supplementation, to verify whether such additions were truly essential. Fig. 4 shows the fermentation profiles of the media with and without nutrient addition. No significant differences were observed in either medium. Table 2 shows the overall results of the 2G ABE fermentation processes reported in the literature.

The maximum solvent concentration in this work of approximately 15 g/L was obtained after only 30 h of fermentation, reflecting the highest productivity values of the fermentation process (approximately 0.5 g/L·h^{-1}). Another interesting feature of the process developed herein is that by using the combined hydrolysate SBH-2, there was no need for nutrient supplementation to achieve high

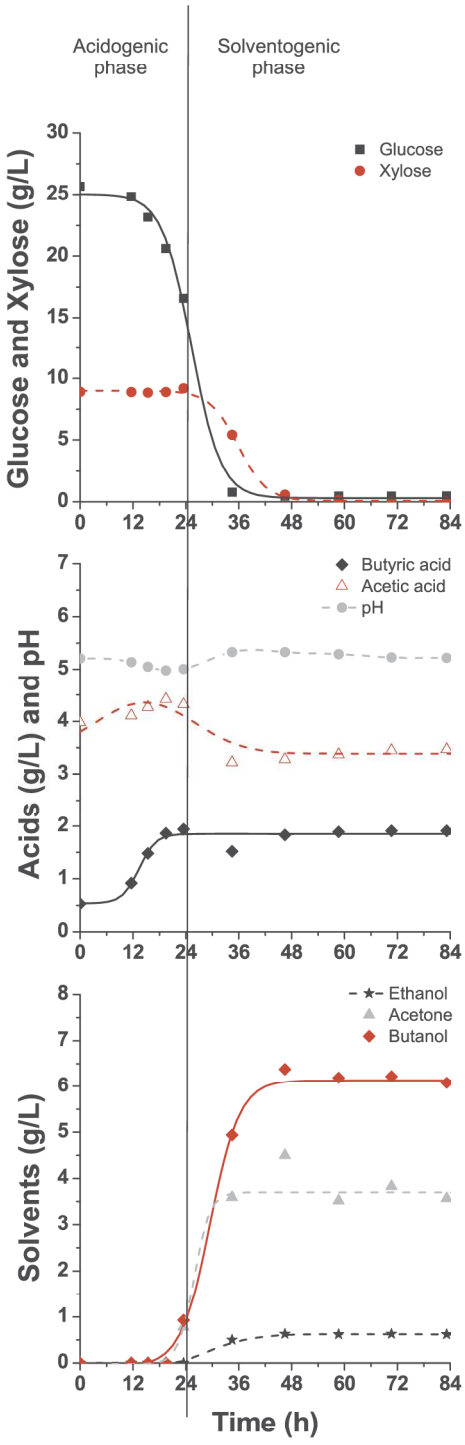


Fig. 3. Time course of 2G ABE fermentation by *C. acetobutylicum* DSM 6228 using SBH-1. (Temperature: 37°C, volume: 1 L, agitation: 50 rpm and addition of supplementation).

butanol, acetone, and ABE yield and productivity values. At the beginning of this work, the liquid fraction HC5, arisen from dilute acid pretreatment, presented toxicity to fermentation media. Since enzymatic hydrolysis presents the advantage of non-generation of fermentation inhibitors, two strategies were planned: SBH-1 (enzymatic hydrolysis of pretreated solids in water) and SBH-2 (enzymatic hydrolysis of pretreated solids gather together with the HC5). Nonetheless, the SBH-2 displayed the best results in terms of yield and productivity. In other word, the hemicellulosic hydrolysate did not impair fermentation performance in this case.

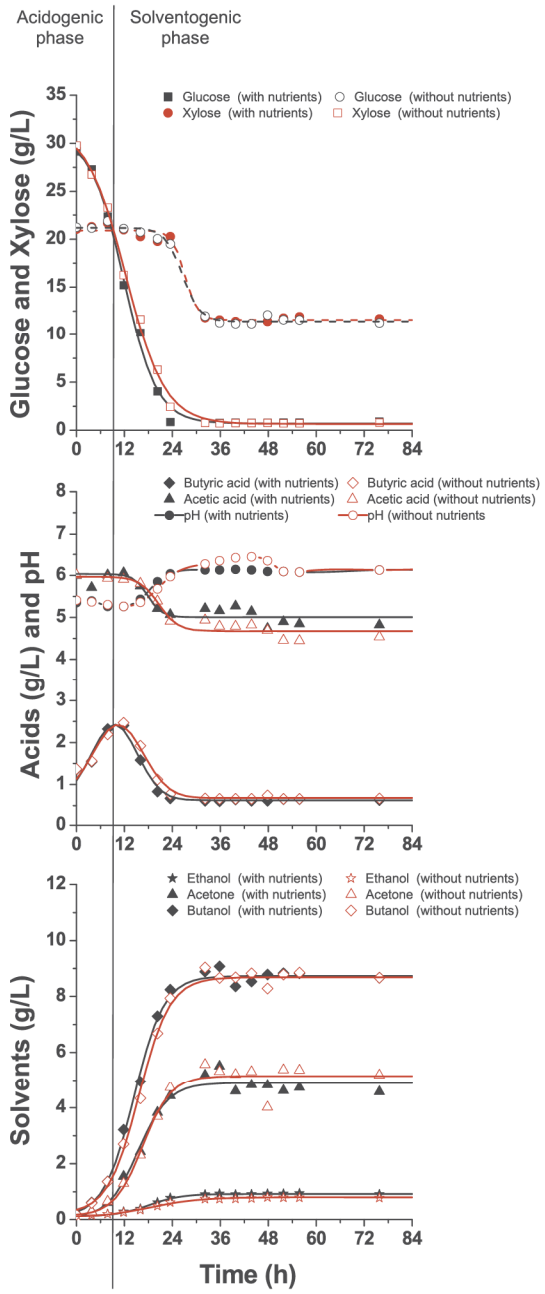


Fig. 4. Time course of 2G ABE fermentation by *C. acetobutylicum* DSM 6228 using SBH-2 with and without nutrient addition. (Temperature: 37°C, Volume: 1 L, Agitation: 50 rpm).

The results achieved in this work are in accordance with those reported in the literature, as can be observed in Table 2. Pang et al. [10] reported butanol and ABE production of 14.2 and 21.1 g/L, respectively, using sugarcane bagasse hydrolysate that contained 69 g/L of sugars. However, the reported values for the yield ($Y_{P/S}$) and volumetric productivity (Q_P) were slightly lower than those obtained in the present study, which used less sugar.

Zheng et al. [23] obtained an ABE concentration of 13.1 g/L using eucalyptus hydrolysate without nutrient supplementation. However, this result was obtained after 120 h of fermentation, resulting in a low value of productivity (0.11 g/L·h^{-1}). In this work, the achieved productivity value was 0.41 g/L·h^{-1}, even without the consumption of all xylose available, with a solvent production of 14.7 g/L.

Using a genetically modified *C. acetobutylicum* strain, Liao et al. [8] achieved a butanol and ABE production of 8 and 14.8 g/L, respectively, with soybean straw hydrolysate. The consumption of sugars was 58 g/L, and the authors achieved a yield ($Y_{P/S}$) and productivity (Q_P) of 0.25 g/L and 0.21 g/L·h^{-1}, respectively. These values are higher than those using the wild strain and lower than those found in this paper.

Al-Shorgani et al. [6] obtained results with detoxified deoiled rice bran hydrolysate that were similar to those achieved in this work when SBH-1 was used. However, the results with SBH-2 were superior, without the need for detoxification.

Table 3 shows the concentrations of cations and anions in the hydrolysates used in ABE fermentation and the required cell demand for some trace nutrients, according to Sun and Liu [13] and Monot et al. [24]. The ions Mn^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Na^+, Fe^{2+} and SO_4^{2-} are at higher concentrations in SBH-2 than in SBH-1. Phosphate were not fully supplied by the hydrolysates and probably it was provided by the propagation step, but this was not analyzed in the present work. It is well known that some ions are important in the metabolism of microorganisms, as they represent cofactors of enzymes that catalyze bioreactions such as glycolysis, redox reactions, and electron transport and that are essential for maintaining cell viability. According to Monot et al. [24] the presence of ions Mg^{2+} and K^+ in the recommended concentration ranges plays an important role in the formation of acetone by bacterial enzymes. According to Zabihi et al. [25] the increasing of NaCl concentration from 0.01 to 20 g/L prolonged the lag phase of *C. acetobutylicum* from 30 to 93 h. The salt has a destructive effect on cell growth and ABE production, as well as inhibiting the shift between acidogenic and solventogenic phases. High salinity causes dehydration of the bacterial cytoplasm and cell lysis. According to Maiti et al. [26] NaCl is reported in a list of inhibitory compounds present in biomass hydrolysates. This salt inhibits cell growth at a concentration of 2 g/L, which corresponds to 786 mg/L of Na^+, and increases cell membrane permeability. The reduction in solvent production occurs at a concentration of 5 g/L, corroborating the previous study [25]. In the present work, the concentrations of Na^+ in SBH-1 and SBH-2 are 34 and 125 mg/L, respectively, which are lower than the inhibitory concentration. The enzyme phosphofrutokinase (PFK) catalyzes a single step in glycolysis, known as fructose-6-phosphate phosphorylation, using ATP and phosphate to form fructose-1,6-diphosphate and ADP. The PKF needs Mg^{2+} associated with NH_4^+ or only K^+. Magnesium cation is important in medium because it forms a complex with ATP that is probably the true substrate for PKF. NH_4^+ has been suggested to stimulate glycolysis through the action of PFK to increase synthesis rate [27]. One of the important steps in the *Clostridium* Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) metabolic pathway is the cleavage of pyruvate, obtained from glycolysis, by the action of the pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFOR) enzyme in the presence of coenzyme-A (Co-A) to the formation of acetyl CoA and CO_2 with concomitant conversion of oxidized ferredoxin and its reduced form. The enzyme PFOR contains sulfur and iron chromophore in its composition that carries electrons from pyruvate to ferredoxin. Compositional analysis of the enzyme confirmed the presence of thiamine pyrophosphate, iron and sulfur [27].

The addition of iron ions in the culture medium influences *Clostridium* metabolism to alter the normal flow of carbon and electrons during xylose fermentation, thereby increasing both solventogenesis and xylose utilization in ABE-producing organisms. Both of these are desirable outcomes for eventual use in reactors with wild-type organisms in biofuel production [28]. Concerning the nitrogen source (yeast extract), the concentration required for ABE fermentation is 1.0 g/L, according to Sun and Liu [13]. However, the total nitrogen in SBH-1 and SBH-2 was determined to be 2.7 and 8.5 g/L, respectively, with ammoniacal nitrogen concentrations of 1.9 and 6.5 g/L, which is due to NH_4OH addition for pH adjustment during enzymatic hydrolysis of the pretreated bagasse. Based on the results shown in Fig. 4, these amounts were probably enough for the nitrogen supply since no significant differences were observed in $Y_{P/S}$ and Q_P in

Table 2
Comparison of literature data with the results obtained in the present work for ABE fermentation.

Feedstock	Microrganism	Glucose consumed (g/L)	Xylose consumed (g/L)	Butanol (g/L)	Acetone (g/L)	ABE (g/L)	Q_P (g/L·h^{-1}) ABE	$Y_{P/S}$ (g/g) ABE	Reference
De-oiled rice bran hydrolysate	*C. acetobutylicum*	25.6	15.1	5.9	4.4	11.2	0.22	0.34	[6]
Soybean straw hydrolysate	*C. acetobutylicum*	24.2	8.4	4.0	3.1	7.1	0.10	0.22	[8]
	C. acetobutylicum (engineered strain)	47.4	11.0	8.0	6.0	14.8	0.21	0.25	
Sugarcane bagasse hydrolysate	*C. acetobutylicum*	12.0	5.0	4.5	1.4	6.2	0.08	0.36	[9]
Sugarcane bagasse hydrolysate	*C. acetobutylicum*	57.0	12	14.2	5.9	21.1	0.36	0.33	[11]
Eucalyptus hydrolysate	*C. saccharoperbutylacetonicum*	29.9	–	8.2	4.3	13.1	0.11	0.41	[23]
Rice straw hydrolysate	*C. acetobutylicum*	7–8	2–3	2.0	0.8	2.8	0.04	0.20	[31]
Willow *Salix schwerinii* hydrolysate	*C. acetobutylicum*	Not cited	–	8.1	3.7	12.4	0.10	0.33	[32]
Palm kernel cake hydrolysate	*C. acetobutylicum*	Not cited	–	3.6	2.0	5.7	0.08	0.24	[33]
Brown seaweed hydrolysate	*C. beijerinckii*	7.6	–	7.2	0.9	8.2	0.08	0.27	[34]
SBH-1	*C. acetobutylicum*	25.0	8.3	6.4	4.5	11.5	0.23	0.34	This study
SBH-2 with nutrients*	*C. acetobutylicum*	28.4	9.4	9.1	5.5	15.5	0.43	0.41	This study
SBH-2 without nutrients*	*C. acetobutylicum*	29.0	9.9	8.7	5.3	14.7	0.41	0.38	This study

* Nutrients (in g/L): yeast extract (1.0); $MnSO_4$ (0.01); $MgSO_4$ (0.2); KH_2PO_4 (0.5); K_2HPO_4 (0.5); sodium acetate (0.01) and $FeSO_4.7H_2O$ (0.01).

the assays with and without added nutrients. In addition, the acidogenic phase with SBH-2 was shorter than that with SBH-1, i.e., the fermentation with SBH-2 showed higher productivity. Li et al. [29] used several nitrogen sources, including yeast extract, peptone, tryptone, urea and ammonium acetate, to improve ABE fermentation. The authors concluded that ammonium acetate used as the sole source of nitrogen at a concentration of 3 g/L increased the cell growth by at least 1.26 times, and that this component contributed by improving cell growth and solvent production and by shortening the fermentation time. It has also been reported that ammonium ions affect the relative expression of six genes involved in the butanol metabolic pathway, i.e., *ackA* (acetate kinase), *buk* (butyrate kinase), *adc* (acetoacetate decarboxylase), *ctfAB* (acetoacetyl-CoA/acyl-CoA transferase), *adhE2* (bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase) and *bdhB* (NADH-dependent butanol dehydrogenase). The acetic acid (or acetate) concentration is higher in SBH-2 than in SBH-1 (Table 1). Therefore, the presence of higher ammonium acetate in SBH-2 possibly increased the productivity in this assay.

One of the advantages of the process developed in this work was the effectiveness of the pretreatment procedures and also the promptly fermentation of the generated hydrolysates without the need for detoxification, which includes some steps using chemical additives, enzymatic treatment, heating and vaporization, liquid–liquid extraction, liquid–solid extraction or microbial treatment [30]. Therefore, these results reduce the costs and increase the viability of the acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation process.

Table 3
Demand of nutrients in 2G ABE fermentation according to Sun and Liu [14] and Monot [24] and composition of trace nutrients in SBH-1 and SBH-2 (in mg/L).

Ions required	Range of concentration (mg/L)	Concentration in SBH-1 (mg/L)	Concentration in SBH-2 (mg/L)
Mn^{2+}	0–7.3	2	13
Mg^{2+}	10–40	16	75
K^+	314–4188	90	335
Na^+	0–1966	34	140
Fe^{2+}	0.4–18.4	14	550
PO_4^{3-}	700–1400	14	125
SO_4^{2-}	0.6–160	1750	6500

4. Conclusions

This study showed that fermentation of sugarcane bagasse hydrolysates achieved results that were similar to or even better than those reported in recent literature, achieving yield ($Y_{P/S}$) and volumetric productivity (Q_P) values of 0.4 g/g and 0.4 g/L·h^{-1}, respectively, when using SBH-2 as a source of sugars (glucose and xylose) and nutrients, without the need for detoxification to remove inhibitors. The use of lignocellulosic sugars by this strain highlighted the potential for future development of the ABE fermentation scale up using lignocellulosic biomass.

Financial support

The authors would like to thank the Brazilian Petroleum Company (PETROBRAS) for the financial support and laboratory infrastructure that enabled this research. There is no conflict of interest for the publication of this work.

Declaration of competing interest

PETROBRAS has intellectual property in this area. However, on behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

[1] Brar SK, Sarma SJ, Parkshirajan K. Platform chemical biorefinery. . 1st ed.Amsterdam: Elsevier; 2016 528 p. https://doi.org/10.1016/C2014-0-02394-5.
[2] Magalhães BL, Grassi MCB, Pereira GAG, et al. Improved *n*-butanol production from lignocellulosic hydrolysate by *Clostridium* strain screening and culture-medium optimization. Biomass Bioenergy 2018;108:157–66. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.10.044.
[3] Assunção FCR, Carioca JOB, Almeida MFL, et al. Química Verde no Brasil 2010–2030. 1st ed. Brasilia: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos; 2010.
[4] CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira-cana-de-açúcar. Observatório Agrícola, safra 2019/20. Available at https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana, Accessed date: 5 August 2019.
[5] Lu C, Dong J, Yang ST. Butanol production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation-gas stripping process. Bioresour Technol 2013;143:467–75. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.012 PMid: 23827441.
[6] Al-Shorgani NKN, Al-Tabib AI, Kadier A, et al. Continuous butanol fermentation of dilute acid-pretreated de-oiled rice bran by *Clostridium acetobutylicum* YM1. Sci Rep-UK 2019;9:4622. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40840-y PMid: 30874578.
[7] Li J, Du Y, Bao T, et al. *n*-Butanol production from lignocellulosic biomass hydrolysates without detoxification by *Clostridium tyrobutyricum* Δ*ack-adhE2* in a fibrous-

bed bioreactor. Bioresource Technol 2019;289:121749. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121749 PMid: 31323711.

[8] Liao Z, Guo X, Hu J, et al. The significance of proline on lignocellulose-derived inhibitors tolerance in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Bioresource Technol 2019; 272:561–9. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.038 PMid: 30396113.

[9] Liu K, Atiyeh HK, Pardo-Planas O, et al. Butanol production from hydrothermolysis-pretreated switchgrass: quantification on inhibitors and detoxification of hydrolysate. Bioresour Technol 2015;189:292–301. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.018 PMid: 25898092.

[10] Pang ZW, Lu W, Zhang H, et al. Butanol production employing fed-batch fermentation by *Clostridium acetobutylicum* GX01 using alkali-pretreated sugarcane bagasse hydrolysed by enzymes from *Thermoascus aurantiacus* QS 7–2-4. Bioresource Technol 2016;212:82–91. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.013 PMid: 27089425.

[11] Dürre P. Fermentative production of butanol – the academic perspective. Curr Opin Biotech 2011;22(3):331–6. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.010 PMid: 21565485.

[12] Börner RA, Zaushitsyna O, Berillo D, et al. Immobilization of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 as macroporous aggregates through cryogelation for butanol production. Process Biochem 2014;49(1):10–8. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.09.027.

[13] Sun Z, Liu S. Production of n-butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. Biomass Bioenergy 2012;39: 39–47. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.07.026.

[14] Jiang M, Chen J, He A, et al. Enhanced acetone/butanol/ethanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH control strategy. Process Biochem 2014;49(8): 1238–44. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.017.

[15] Box JD. Investigation of the Folin-Ciocalteau phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. Water Resource 1983;17(5):511–25. https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90111-2.

[16] Abd-Alla MH, El-Enany AE. Production of acetone-butanol-ethanol from spoilage date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*. Biomass Bioenergy 2012;42:172–8. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.006.

[17] Guo T, He A, Du T, et al. Butanol production from hemicellulosic hydrolysate of corn fiber by a *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor-tolerance. Bioresour Technol 2013;135:379–85. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.029 PMid: 22985825.

[18] Tsai T, Lo Y, Chang J. Effect of medium composition and pH control strategies on butanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum*. Energy Proced 2014;61:1691–4. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.12.193.

[19] ASTM. D1976-96 – standard test method for elements in water by inductively-coupled argon plasma atomic emission spectroscopy. American Society for Testing and Materials. Available from https://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/D1976-96.htm, Accessed date: 28 September 2018.

[20] 4500-NH3 Nitrogen (Ammonia). Edge Analytical. Available at https://www.edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Waste_SM4500-NH3.pdf, Accessed date: 18 April 2018.

[21] ASTM D5176-–08. Standard test method for total chemically bound nitrogen in water by pyrolysis and chemiluminescence detection. American Society for Testing and Materials. Available at https://www.astm.org/Standards/D5176.htm; 2015, Accessed date: 28 September 2018.

[22] Kheyrandish M, Asadollahi M, Jeihanipour A, et al. Direct production of acetone-butanol-ethanol from waste starch by free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. Fuel 2015;142:129–33. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.11.017.

[23] Zheng J, Tashiro Y, Wang Q, et al. Feasibility of acetone-butanol-ethanol fermentation from eucalyptus hydrolysate without nutrients supplementation. Appl Energy 2015;140:113–9. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.11.037.

[24] Monot F, Martin JR, Petitdemange H, et al. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. Appl Environ Microb 1982;44 (6):1318–24. PMid: 16346149.

[25] Zabihi R, Mowla D, Karimi G, et al. Examination of the impacts of salinity and culture media compositions on *Clostridium acetobutyilicum* NRRL B-591 growth and acetone-butanol-ethanol biosynthesis. J Environ Chem Eng 2019;7(1):102835. https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.102835.

[26] Maiti S, Gallastegui G, Sarma SJ, et al. A re-look at the biochemical strategies to enhance butanol production. Biomass Bioenergy 2016;94:187–200. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.09.001.

[27] Gheshlaghi R, Scharer JM, Moo-Young M, et al. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. Biotechnol Adv 2009;27(6):764–81. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.002 PMid: 19539744.

[28] Popovic J, Ye X, Haluska A, et al. Ferric iron and extracellular electron shuttling increase xylose utilization and butanol production during fermentation with multiple solventogenic bacteria. Appl Microbiol Biot 2017;101(21):8053–61. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8533-9 PMid: 28963627.

[29] Li S, Zhou Y, Luo Z, et al. Dual function of ammonium acetate in acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. Bioresour Technol 2018;267: 319–25. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.055 PMid: 30029177.

[30] Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. Biotechnol Biofuels 2013;6(16). https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16 PMid: 23356676.

[31] Moradi F, Amiri H, Soleimanian-Zad S, et al. Improvement of acetone, butanol and ethanol production from rice straw by acid and alkaline pretreatments. Fuel 2013; 112:8–13. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.05.011.

[32] Yang M, Kuittinen S, Vepsäläinen J, et al. Enhanced acetone-butanol-ethanol production from lignocellulosic hydrolysates by using starchy slurry as supplement. Bioresour Technol 2017;243:126–34. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.021 PMid: 28651132.

[33] Al-Tabib AI, Al-Shorgani NKN, Hasan HA, et al. Assessment of the detoxification of palm kernel cake hydrolysate for butanol production by *Clostridium acetobutylicum* YM1. Biocatal Agric Biotechnol 2018;13:105–9. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.015.

[34] Hou X, From N, Angelidaki I, et al. Butanol fermentation of the brown seaweed *Laminaria digitata* by *Clostridium beijerinckii* DSM-6422. Bioresour Technol 2017; 238:16–21. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.035 PMid: 28432948.

AGRICULTURAL MATERIALS

Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study

JUSTIN B. SLUITER and HELENA CHUM
National Bioenergy Center, National Renewable Energy Laboratory, 1617 Cole Blvd, Golden, CO 80401-3305
ABSAI C. GOMES, RENATA P.A. TAVARES, and VINICIUS AZEVEDO
CENPES/Petrobras, Gerência de Biotecnologia, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello, Av Horácio de Macedo, 950, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21941-598, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
MARIA T.B. PIMENTA and SARITA C. RABELO
CTBE/CNPEM, Brazilian Center for Research in Energy and Materials, Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000, Guará, 13083-970, Campinas, SP, Brazil
KAREN MARABEZI and ANTONIO A.S. CURVELO
CTBE/CNPEM, Brazilian Center for Research in Energy and Materials, Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000, Guará, 13083-970, Campinas, SP, Brazil
Universidade de São Paulo - IQSC/USP, Instituto de Química de São Carlos, Av Trabalhador São-Carlense, 400, Centro, 13560-970 - São Carlos, SP, Brazil
APARECIDO R. ALVES and WOKIMAR T. GARCIA
Cane Technology Center - CTC, Fazenda Santo Antônio, s/n Santo Antônio, 13400-970, Piracicaba, SP, Brazil
WALTER CARVALHO and PAULA J. ESTEVES
Universidade de São Paulo - EEL/USP, Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Biotecnologia, Estrada Municipal do Campinho s/n, Campinho, 12602-810, Lorena, SP, Brazil
SIMONE MENDONÇA, PATRICIA A. OLIVEIRA, JOSÉ A.A. RIBEIRO, and THAIS D. MENDES
Embrapa Agroenergy, Parque Estação Biológica - PqEB s/n, Av W3 Norte (final), 70770-901, Brasília, DF, Brazil
MARCOS P. VICENTIN
National Institute of Metrology, Quality and Technology - INMETRO, Division of Chemical Metrology, Laboratory of Organic Analysis, Av N. Sra. das Graças, 50, Xerém, 25250-020, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
CELINA L. DUARTE and MANOEL N. MORI
Nuclear and Energy Research Institute - IPEN/CNEN, Av Prof. Lineu Prestes, 2242, 05508000, São Paulo, SP, Brazil

This paper describes a study of the variability of measured composition for a single bulk sugarcane bagasse conducted across eight laboratories using similar analytical methods, with the purpose of determining the expected variation for compositional analysis performed by different laboratories. The results show good agreement of measured composition within a single laboratory, but greater variability when results are compared among laboratories. These interlaboratory variabilities do not seem to be associated with a specific method or technique or any single piece of instrumentation. The summary censored statistics provide mean values and pooled standard deviations as follows: total extractives 6.7% (0.6%), whole ash 1.5% (0.2%), glucan 42.3% (1.2%), xylan 22.3% (0.5%), total lignin 21.3% (0.4%), and total mass closure 99.4% (2.9%).

The necessity of replacing fossil fuels with sustainable renewable fuels is internationally recognized. Among the crucial issues to be addressed when considering potential solutions are techno–economic feasibility, life cycle assessments of the proposed bioenergy system in terms of materials and energy flows and environmental impacts, crude material availability, and composition (1). Brazil has been a world leader in proving the use of ethanol as a liquid transportation fuel to replace traditional fossil fuels, in particular by using sugarcane juice for ethanol and sugarcane bagasse for process heat and electricity (2). The ability to assess the starting material composition is critical to the success of the biorefinery process. Sugarcane-to-ethanol is a model for successful liquid fuel replacement, and because sugarcane bagasse is a coproduct available in other parts of the world, its compositional analysis as a feedstock for future biorefineries is of interest to hundreds of countries that can produce sugarcane. Unlike the situation for many materials, such as transportation fuels, biomass compositional analysis is not yet regulated by any governmental agencies. In the United States four biomass reference samples are available from the National Institute of Standards and Technologies. The composition of these samples and associated analytical methodologies were determined through multicountry and multilaboratory work, led by the National Renewable Energy Laboratory (NREL). The adoption of a single-bagasse reference material, due to the large quantities of material available in Brazil, is useful to the Brazilian biomass industry. In response to this, Brazilian and U.S. institutions performed compositional analysis of a single homogenized sugarcane-bagasse feedstock. The most common procedures for characterizing the chemical components of lignocellulosic feedstocks use a two-stage sulfuric acid hydrolysis to fractionate biomass for gravimetric and instrumental analyses. Although

Received March 16, 2015. Accepted by NT March 7, 2016.
Corresponding author's e-mail: justin.sluiter@nrel.gov
DOI: 10.5740/jaoacint.15-0063

methods used are generally similar, there are differences in the methodology developed at laboratories that routinely perform the analysis. As each institution had different expertise in this subject and performed the analysis with slightly different methods, this provided a unique opportunity to examine the effects of the varying methods on the measured composition. Participating laboratories included NREL and eight Brazilian institutes: Gerência de Biotecnologia, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello (CENPES/Petrobras); Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CTBE/CNPEM); Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (IQSC/USP); Cane Technology Center (CTC); Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP); Embrapa Agroenergy; Nuclear and Energy Research Institute (IPEN/CNEN); and Laboratory of Organic Analysis, Division of Chemical Metrology, National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO). Other Brazilian institutions participated in discussions. Comparative results are presented.

Experimental

In the winter of 2010, Brazil sent NREL 10 kg of a sugarcane bagasse collected by CTC from the Santa Lucia mill in Araras, São Paulo, Brazil. The entire sample was air-dried and reduced in a Thomas Model 4 Wiley knife mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) to pass through a 2 mm screen. The milled material was shaker-sieved to a −20/+80 particle size and thoroughly homogenized with a riffle splitter (3). The sample was riffle-split into two halves; in turn, those halves were each riffle-split, etc., until the requisite number of samples was obtained. The homogenized sample was separated into plastic bags for shipping. Each participating institution received approximately 450 g of material. Prior to shipping, each bag was tested for homogeneity by near-infrared partial least squares (NIR/PLS) prediction and no compositional differences were detected based on known variabilities (4).

Description of Methods

Complete biomass compositional analysis of the sample was accomplished by similar methods. Each institution selected the methodology with which they were most proficient and performed replicate analysis ($n \approx 10$) of the sugarcane bagasse feedstock. Replicates were typically performed in one compositional analysis batch. Equipment and reagents varied at each location. Details of the specific equipment are discussed later.

The parameters analyzed and discussed were whole ash, glucan, xylan, galactan, arabinan, acetate, lignin (acid-soluble and acid-insoluble lignin), and total extractives. Although the structural carbohydrates and total lignin determination were carried out on extractive-free material, data were expressed on a whole basis.

Three general analytical methods were used by the laboratories, each with a different combination of extraction, hydrolysis, and lignin measurement techniques. The three methods were called "NREL method," "TAPPI method," and "Rocha" for simplicity. All three methods relied on similar techniques. The sugarcane bagasse was extracted prior to sulfuric acid digestion. The resulting solutions of sugars and their degradation products were analyzed by liquid chromatography. Soluble lignin was measured by UV spectrometry, where each institution applied specific wavelengths and absorptivity constants. Acid-insoluble lignin was measured as weight obtained after filtration of the hydrolyzed biomass and corrected for ash contribution.

The most commonly used hydrolysis procedure was the NREL method, which is described in detail on the Internet (5) and in the literature (6, 7). This method is published by NREL and publicly available. In the NREL method, replicate samples were sequentially extracted with water followed by ethanol. The insoluble portion of the extraction was subjected to a two-stage acid hydrolysis consisting of a first-stage 72% (w/w) sulfuric-acid treatment in a 30°C water bath for 1 h with frequent stirring, followed by a second stage applying 4% (w/w) sulfuric acid in an autoclave for 1 h at 121°C. The resulting suspension was filtered and the filtrate was characterized by chromatography to determine concentrations of glucose, xylose, arabinose, galactose, and acetic acid. Soluble lignin in the filtrate was determined from UV absorption (320 nm and 30 L/g·cm or 240 nm and 25 L/g·cm). Insoluble lignin was gravimetrically determined as the solid residue from hydrolysis with ash content subtracted.

The second procedure was the Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) method. Samples were extracted in a soxhlet by sequential extraction with cyclohexane–ethanol (1 + 1) then water, in accordance with TAPPI T204 cm-97 (8). The hydrolysis step was performed using TAPPI T222 om-98 (9), in which the first stage hydrolysis was room temperature with 72% (w/w) sulfuric acid for 2 h. This was followed by a second stage hydrolysis of 3% (w/w) acid at boiling reflux conditions for 4 h. This procedure is often used when an autoclave is not available. The resulting suspension was filtered and the filtrate was characterized by chromatography to determine concentrations of glucose, xylose, arabinose, galactose, and acetic acid. Soluble lignin in the filtrate was measured by scanning the sample in an UV spectrophotometer from 190 to 400 nm.

The absorbance at wavelengths of 280 and 215 nm was used to calculate the percentage of soluble lignin and the concentration was calculated according to Equation 1. Insoluble lignin was determined gravimetrically as the solid residue from hydrolysis with ash content subtracted.

$$C_{\text{soluble lignin}}\left(\text{g/L}\right) = \frac{\left(4.53A_{215}\right) - A_{280}}{300} \quad (1)$$

where A_{215} and A_{280} are the absorptions at 215 and 280 nm and $C_{\text{soluble lignin}}$ (g/L) is the concentration of soluble lignin in the hydrolysate. Equation 1 results from the simultaneous resolutions of two equations (Equations 2 and 3):

$$A_{280} = 0.68\ \text{CD} + 18\ \text{CL} \quad (2)$$

$$A_{215} = 0.15\ \text{CD} + 70\ \text{CL} \quad (3)$$

where A_{280} is the absorbance value of the solution at 280 nm, A_{215} is the absorbance value of the solution at 215 nm, CD is the furfural derivatives concentration (g/L), and CL is the soluble lignin concentration (g/L). The values 0.68 and 0.15 are furfural-derivatives molar absorptivity at 280 and 215 nm, respectively, and the values 18 and 70 are lignin molar absorptivity at 280 and 215 nm, respectively.

The third method is the Rocha method, which is a derivative of the TAPPI method. The extraction of the biomass was performed in a soxhlet by sequential extraction with cyclohexane–ethanol (1 + 1) then water, according to TAPPI T204 cm-97 (8). The hydrolysis method was developed by Rocha et al. (10) and validated by Gouveia et al. (11). The first stage of hydrolysis was performed with 72% (w/w) sulfuric acid in a 45°C water bath for 8 min with continual stirring. This was followed by the second stage hydrolysis with 4% (w/w) sulfuric acid in an autoclave for 30 min at 121°C. The resulting suspension was filtered and the filtrate was characterized by chromatography to determine concentrations of sugars (cellobiose, glucose, xylose, arabinose, and galactose), organic acids (acetic acid, formic acid, and glucuronic acid), and furan aldehydes [furfural and hydroxymethyl-furfural (HMF)]. Insoluble lignin was gravimetrically determined as the solid residue from hydrolysis with ash content subtracted. For the soluble lignin, an aliquot of the hydrolysate obtained in the acid hydrolysis step was transferred to a flask with distilled water and the final pH was adjusted to 12 with a solution of 6.5 mol/L NaOH. Soluble lignin was determined from UV absorption at 280 nm using Equation 4:

$$C_{lig} = \frac{\left(A_{280} \times DF\right) - \left(\varepsilon_{HMF} \times C_{HMF} + \varepsilon_{furfural} \times C_{furfural}\right) - B}{A} \quad (4)$$

where C_{lig} is the soluble lignin concentration in hydrolysate (g/L), A_{280nm} is the absorbance of hydrolysate at 280 nm, DF is the dilution factor, ε_{HMF} is the absorptivity of HMF (114.00 L/g.cm – experimental value), $\varepsilon_{furfural}$ is the absorptivity of furfural (146.85 L/g.cm – experimental value), C_{HMF} is the HMF concentration in hydrolysate (g/L), $C_{furfural}$ is the furfural concentration in hydrolysate (g/L), B is the linear coefficient (0.018 – experimental value), and A is the angular coefficient equal to absorptivity of lignin (23.7 L/g·cm – experimental value).

Description of Statistical Analyses

All calculations were performed in the R statistical program Version 2.15.2 (12). The plyr (13) and xlsx (14) packages were loaded during calculations. Calculated means are an arithmetic mean. Standard deviations are calculated as the square root of the sum of the squared differences of the individual value from the mean divided by the total number of replicates. Pooled standard deviations are calculated as

$$s_p^2 = \frac{\left(n_1 - 1\right)s_1^2 + \left(n_2 - 1\right)s_2^2 + \ldots + \left(n_k - 1\right)s_k^2}{n_1 + n_2 + \ldots + n_k} \quad (5)$$

where n_k is the sample size of population k and s_i^2 is the standard deviation squared.

Results and Discussion

Eight laboratories performed replicate ($n \approx 10$) analyses of the shared sugarcane bagasse material. Components measured were whole ash, extractable material (water-soluble and organic-soluble), glucan, xylan, galactan, arabinan, acetate, and lignin (acid-soluble and acid-insoluble lignin). Due to equipment failures that resulted in a loss of data at certain laboratories, only portions of the experimental data were available for statistical analysis. Several laboratories reported issues with carbohydrate analysis, and as a result, carbohydrates are the least represented measurement in the study. Any laboratory that failed to report a component was necessarily removed from statistics related to that component, and also for total mass closure. Data for the five most abundant components (total extractives, whole ash, glucan, xylan, and total lignin) and total mass closure are reported here. Table 1 summarizes the number of replicate measurements provided by each laboratory for each constituent.

Analysis of Standard Deviations

Pooled standard deviations were calculated for each constituent measured. This is the mean pooled standard deviation weighted for the number of samples provided by each institute. Pooling combines the individual laboratory standard deviations rather than looking at all values as a single population. Examination of the data grouped by origin is valuable in understanding the intralaboratory uncertainties, or uncertainty within a single laboratory. The mean standard deviations for individual laboratories are smaller than the standard deviations for a single population that includes all laboratories (Table 2). This indicates that among-institution variation is larger than within-institution variation. Similar trends were previously reported by Templeton et al. (15). Simply put, most institutions can replicate their own data well, but data may not necessarily be comparable across institutions.

The analysis of the standard material shared among participating laboratories allowed for the direct comparison of compositional results. Analysis of such a standard material is recommended by the NREL method, with the material being provided by an outside standards agency. A good understanding of the composition of the shared material is critical, as outliers can be traced back to deficiencies in methodology. This shared material was concurrently analyzed with unknown samples, and served to check the quality of analysis. Such material should have a similar compositional matrix to the samples of interest. Table 2 and Figure 1 both show the deviation results of compositional analysis performed by all participating laboratories.

Table 1. Number of replicate constituent values provided by each laboratory

	Laboratory							
Constituent	A	B	C	D	F	H	I	J
Total extractives	10	10	10	10	10	2	10	9
Whole ash	10	10	10	10	10	2	10	9
Glucan	8	10	3	—	10	2	10	9
Xylan	8	10	3	10	10	2	9	9
Arabinan	10	10	3	10	9	2	10	9
Galactan	9	10	3	10	—	2	10	9
Acetyl	10	10	10	10	—	2	10	9
ASL	10	10	10	10	10	2	10	9
AIR[a]	10	10	10	10	10	2	10	9
Total lignin	10	10	10	10	9	2	9	8
Total mass closure	10	10	3	—	10	2	10	9

[a] AIR = Acid-insoluble residue or Klason lignin.

Table 2. Deviations of compositional results obtained in this interlaboratory comparison

Constituent	Mean	Standard deviation	Pooled standard deviation	Sample count
Total extractives	6.7	0.9	0.6	71
Whole ash	1.5	0.3	0.2	71
Glucan	42.3	1.7	1.2	52
Xylan	22.3	1.3	0.5	61
Galactan	0.6	0.4	0.1	53
Arabinan	2.2	0.4	0.2	63
Total lignin	21.3	1.4	0.4	68
Acetyl	3.5	1.1	0.3	61
Total mass closure	99.4	3.7	2.9	54

Comparison of pooled standard deviation values with Templeton et al. (15) show a good comparison for all components except for glucan and total mass closure, which are approximately two to three times greater in this study. The statistics from the pooled data represent the measurement uncertainties expected from analysis of replicate samples at a single, well-practiced institution. It is our opinion that the standard deviation values from this study, including glucan, closely represent what should be expected from compositional analysis data received from any qualified analytical laboratory.

Methods Comparisons

As each institution performed the analysis with slightly different methods, this study provided a unique opportunity to examine the effects of the varying methods on the measured composition. The NREL method was more commonly performed than the other two methods, which were often only performed by one or two institutions. The lack of an experimentally balanced design and a large number of uncontrolled compounding interferences do not allow for good statistics around method differences, but still provide preliminary results and the expected variance among laboratories with slightly different procedures. In most cases, an analysis of variance (ANOVA) is reported along with any notable interferences. ANOVA was performed in base R statistical program Version 2.15.2 (12). As this data were

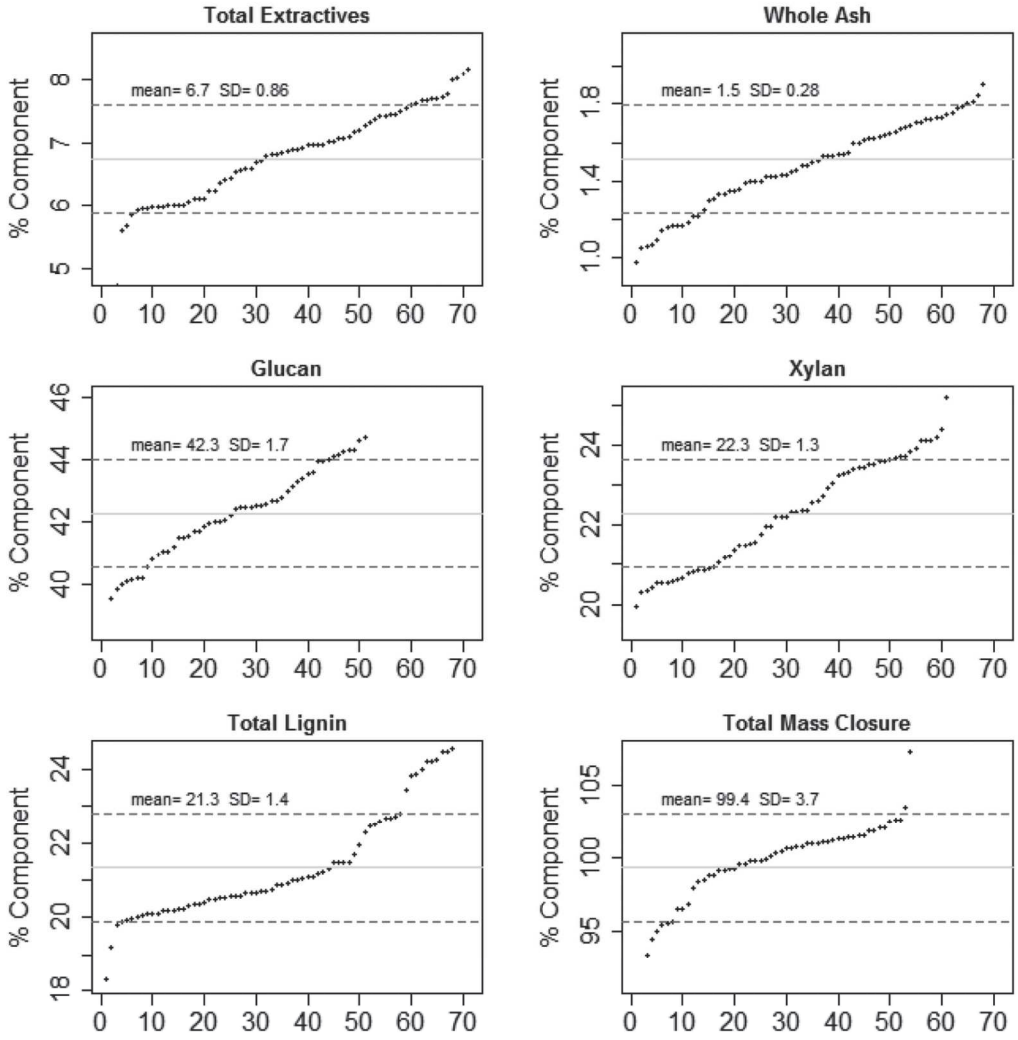


Figure 1. Sorted values for measured components with the mean and one SD outlier limits. The sample number is plotted on the *x*-axis and the percent of the component is plotted on the *y*-axis.

not produced with a balanced experimental design, the results of the ANOVA can provide general trends and information, but are not robust. We made assumptions of normality and equal variance, although we did not have triplicate values. Post-hoc analyses for mean measured differences are not reported here, as the unbalanced design does not lend itself to a robust measure of these means. A more directed and balanced study would be necessary to accurately assess the differences in analytical techniques.

The following sections examine the variabilities of individual constituents.

Methods Comparison: Extraction

First we examine the extraction methods and values obtained from each method. Table 3 shows the results obtained in the different extraction methods: accelerated solvent extraction (ASE), performed with sequential water and ethanol; organic soxhlet–water, a soxhlet extraction performed with sequential ethanol:cyclohexane and water; and soxhlet extraction performed with sequential water and ethanol.

The measured extractives content examined by type of extraction shows excellent comparison between the ASE extraction and the organic soxhlet/water extraction, but the soxhlet extraction shows a potentially higher mean value. This may indicate that the sequential water and ethanol soxhlet extraction is a more thorough extraction than the other two methods, or it may be that there are not enough data points to make that determination. ANOVA of the data shows no significant trend of total extractives with extraction type using the cutoff of $P < 0.05$, although the calculated value was 0.08.

Methods Comparison: Glucan, Xylan, and Lignin

Next we examine component compositions for glucan, xylan, and lignin obtained from the different hydrolysis methods separated by laboratory (Table 4). To mitigate the potential effect of variation in extraction technique, the constituent values are reported here on an extractives-free (EF) basis. Incomplete removal of nonstructural material can affect the measurement of structural constituents. However, we saw no difference in extractives with extraction technique, so we are confident in the structural comparisons. It is important to note that this examination is confounded by influences of the different carbohydrate measurement techniques, which are also examined. In most cases, institutions performed hydrolysis according to the NREL laboratory analytical procedures (LAP), and a wide variance was observed. The large-scale method (hydrolysis with 1 g of biomass at reflux conditions for 4 h) and the Rocha method (described in detail in the *Description of Methods* section) were each only performed by a single institution. This is a critical point to note, because the NREL method includes several laboratories, whereas the other two include standard deviation from only one laboratory. ANOVA indicates that there is a significant ($P < 0.05$) difference associated with the hydrolysis method for all components except for glucan.

Carbohydrate concentrations were measured across a variety of separation and detection techniques and are summarized in Table 5. The four carbohydrate analysis techniques with corresponding measured carbohydrate concentrations (reported on an EF basis) are presented in Table 6. ANOVA indicates that the carbohydrate analysis instrumentation is significant ($P < 0.05$) for all measured compounds. This examination is confounded by influences of the different hydrolysis techniques.

Methods Comparison: Acid-Soluble Lignin

The acid-soluble lignin (ASL) measurement is one of the most interference-prone measurements in the array of compositional analysis methods. This measurement is based on the UV absorbance of the solution obtained after two-step acid hydrolysis, measured at a particular wavelength according to Beer's law. The measurement contains notable interferences from HMF and furfural, which are carbohydrate degradation products produced during the acid hydrolysis and absorb in the same region.

Table 7 presents a comparison of the measured ASL separated by measurement method. Of the four ASL methods used, three of them make some attempt to correct for carbohydrate degradation products. The Rocha method (11) makes corrections to the measured ASL absorbance by removing HMF and furfural concentrations, which are measured independently. The NREL 320 method measures the absorbance of lignin at 320 nm, a region that has significantly less absorbance from HMF and furfural. The TAPPI method makes a correction to the measured lignin

Table 3. Extraction methods used in this interlaboratory comparison[a]

Constituent	ASE	Organic soxhlet/water	Soxhlet
Water extractives	4.5 (0.9)	4.3 (0.7)	5.7 (0.2)
Organic extractives	2.1 (0.1)	2.5 (0.4)	1.8 (0.1)
Total extractives	6.6 (1.0)	6.7 (0.7)	7.2 (0.7)
Sample count	39	20	12

Note: Standard deviations included in parentheses.

[a] ASE and soxhlet were performed with sequential water and ethanol extractions. Organic soxhlet/water was performed with sequential ethanol:cyclohexane and water extractions.

Table 4. Results of component compositions obtained from different hydrolysis methods[a]

Constituent	NREL Method	Rocha	TAPPI
Glucan, extractives-free	45.2 (1.9)	45.2 (2.7)	45.9 (1.1)
Xylan, extractives-free	23.4 (1.2)	25.1 (0.8)	25.3 (0.3)
Arabinan, extractives-free	2.5 (0.3)	1.7 (0.3)	2.3 (0.1)
Galactan, extractives-free	1.0 (0.2)	0.2 (0.1)	0.2 (0.1)
Acetyl, extractives-free	4.3 (1.0)	2.5 (0.1)	2.8 (0.2)
ASL, extractives-free[b]	3.7 (1.7)	2.2 (0.6)	1.9 (0.1)
AIR, extractives-free[c]	19.5 (1.3)	20.6 (0.6)	19.6 (0.4)
Total lignin, extractives-free	23.1 (1.6)	22.8 (0.5)	21.6 (0.3)
Sample count	51	10	10

Note: Standard deviations included in parentheses.

[a] *See* the *Description of Methods* section for descriptions of the methods.

[b] ASL = Acid-soluble lignin.

[c] AIR = Acid-insoluble residue or Klason lignin.

Table 5. Differences in carbohydrate separation and detection across institutions

Method name	Analytical column	Detection
87H	Aminex HPX-87H Bio-Rad, Hercules, CA USA	Refractive index
87P	Pb^{2+} ligand exchange (Bio Rad HPX-87P Bio-Rad, Hercules, CA USA or similar)	Refractive index
IC	Dionex IC, CarboPac PA1 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	Amperometric detector
SCR 101 ELSD	Shimpack SCR 101-P Shimadzu, Kyoto, Japan	Evaporative light scattering detector

Table 6. Carbohydrate concentrations obtained through different analysis methods

Constituent	87H	87P	IC	SCR 101P/ ELSD
Glucan extractives-free	45.5 (2.0)	44.5 (1.9)	44.7 (0.8)	46.6 (1.1)
Xylan extractives-free	25.1 (0.6)	23.7 (1.1)	25.5 (0.5)	23.0 (0.8)
Arabinan extractives-free	2.0 (0.4)	2.5 (0.3)	2.6 (0.1)	2.6 (0.1)
Galactan extractives-free	0.2 (0.1)	1.1 (0.2)	0.6 (0.0)	NA
Sample count	20	21	10	10

Note: Standard deviations included in parentheses.

absorbance for the concentrations of soluble furfural derivatives, which are measured independently. The only method that does not attempt to correct for the degradation product interference is NREL 240, which measures absorbance at 240 nm and shows clear high bias with regards to the other methods. ANOVA analysis indicates that these techniques are significantly different in the final measured lignin concentration.

Conclusions

Despite the differences among the methodologies for compositional analysis of sugarcane bagasse—differences including the use of different equipment for sample preparation and analysis—the results of the eight participating laboratories were similar. ASL analysis was the only one to have larger discrepancies as a result of interference from polysaccharide degradation product in the UV measurement.

Acknowledgments

The research reported is a result of the Memorandum of Understanding to Advance Biofuels Collaboration (16) between the governments of Brazil and the United States, which started in 2007 and transfered to the Strategic Energy Dialogue in 2011. On the Brazilian side, participants were Science, Technology and Innovation (MCTI); Mines and Energy (MME); Development, Industry and Foreign Trade (MDIC); and Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), led by the Department of Energy of the Ministry of Foreign Relations. On the U.S. side, the Department of State led activities and the U.S. Department of Energy through the Bioenergy Technologies Office led bilateral research and development activities, which were conducted through the National Renewable Energy Laboratory for this work, with the participation of the U.S. Department of Agriculture. We also acknowledge these institutions and the managers involved, as well as their agencies, such as Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), and the state of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and Helena Chum for coordination of this work. We also acknowledge the research supported by various agencies.

Table 7. Comparison of the measured ASL separated by measurement method[a]

ASL method	NREL 240	Rocha	NREL 320	Tappi
ASL extractives-free	5.0 (0.8)[b]	2.2 (0.6)[b]	1.3 (0.0)[b]	2.1 (0.2)[b]
Sample count	31	10	10	20

[a] ASL = Acid-soluble lignin.

[b] *Note*: Standard deviations included in parentheses.

References

(1) De La Torre Ugarte, D.G., He, L., Jensen, K.L., & English, B.C. (2010) *Biomass Bioenergy* **34**, 1586–1596. doi:10.1016/j.biombioe.2010.06.006

(2) Luo, L., van der Voet, E., & Huppes, G. (2009) *Renew. Sustain. Energy Rev.* **13**, 1613–1613. doi:10.1016/j.rser.2008.09.024

(3) Hames, B., Ruiz, R.O., Scarlata, C., Sluiter, A., Sluiter, J., & Templeton, D. (2004) *Preparation of Samples for Compositional Analysis. Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure* NREL/TP-510-42620, National Renewable Energy Laboratory, Golden Colorado

(4) Wolfrum, E.J., & Sluiter, A.D. (2009) **16**, 567–576. doi:10.1007/s10570-009-9320-2 http://link.springer.com/10.1007/s10570-009-9320-2 (accessed October 30, 2013)

(5) Sluiter, J., & Sluiter, A. (2010) Summative mass closure Laboratory Analytical Procedure (LAP) Review and Integration: Feedstocks, NREL/TP-510-48087, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado

(6) Sluiter, J.B., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, A.D., & Templeton, D.W. (2010) *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9043–9053. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2923870&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (accessed May 26, 2014)

(7) Sluiter, A., Sluiter, J., & Wolfrum, E.J. (2013) Methods for biomass compositional analysis. in *Catalysis for the Conversion of Biomass and Its Derivatives. Edition Op*, M. Behrens, & D. Abhaya (Eds), Max Planck Research Library, Berlin, Germany, Ch 8, 213–254

(8) TAPPI (2004) T204 cm-97: Solvent extractives of wood and pulp. in *TAPPI Test Methods 2005*. Atlanta, Georgia USA

(9) TAPPI (2004) T222 om-98: Acid-insoluble lignin in wood and pulp. in *TAPPI Test Methods 2005*. Atlanta, Georgia USA

(10) Rocha, G.J.M., Silva, F.T., Araújo, G.T., & Curvelo, A.A.S. (1997) A fast and accurate method for determination of cellulose and polyosees by HPLC. in *Proceedings of the Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components*, Sépia Editora e Gráfica, Curitiba, PR, Brazil, Vol 5

(11) Gouveia, E.R., do Nascimento, R.T., Souto-Maior, A.M., & Rocha, G.J de M. (2009) *Quim. Nova* **32**, 1500–1503

(12) R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.r-project.org/

(13) Wickham, H. (2011) *J. Stat. Softw.* **40**, 1–29. http://www.jstatsoft.org/v40/i01/

(14) Dragulescu, A.A. (2013) xlsx: Read, write, format Excel 2007 and Excel 97/2000/XP/2003 files. http://cran.r-project.org/package=xlsx

(15) Templeton, D.W., Scarlata, C.J., Sluiter, J.B., & Wolfrum, E.J. (2010) *J. Agric. Food. Chem.* **58**, 9054–9062. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2923869&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (accessed June 17, 2014)

(16) (2007) Memorandum of Understanding Between the U.S. and Brazil to Advance Cooperation on Biofuels, http://www.state.gov/p/wha/rls/158654.htm.

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014024610-0 A2

(22) Data do Depósito: 02/10/2014

(43) Data da Publicação: 26/04/2016
(RPI 2364)

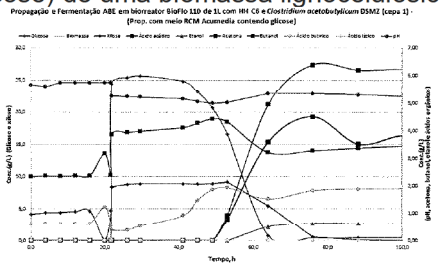
(54) Título: PRODUÇÃO DE SOLVENTE À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

(51) Int. Cl.: C12P 7/10; C12P 7/16; C12P 7/28; C12R 1/145

(73) Titular(es): PETROLEO BRASILEIRO S. A. - PETROBRAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ

(72) Inventor(es): ABSAI DA CONCEIÇÃO GOMES, LÍDIA PEREIRA JUNIOR, CAROLINA ARAÚJO BARCELOS, ANA PAULA RODRIGUES TORRES, NEI PEREIRA JUNIOR

(57) Resumo: PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. É descrito um processo para a produção de solventes, mais especificamente acetona, butanol e etanol, pela fermentação com bactérias do gênero Clostridium de uma mistura de correntes de hidrolisado hemicelulósico (xilose) e celulósico (glicose) de uma biomassa lignocelulósica.



PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo de processos fermentativos para a produção de solventes, em especial butanol, acetona e etanol. Mais especificamente o processo envolve a hidrólise ácida de uma biomassa lignocelulósica, onde a fração sólida obtida é posteriormente submetida a hidrólise enzimática, sendo os hidrolisados recuperados submetidos a fermentação ABE .

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] O processo de fermentação anaeróbica para a produção de acetona, butanol e etanol, ou fermentação ABE (*acetona-butanol-etanol*) já é conhecido há mais de cem anos.

[003] Tal processo emprega bactérias do gênero *Clostridium*, na forma de bacilos gram-positivos, formadores de esporos, em especial as espécies: *Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, Clostridium saccharobutylicum e Clostridium saccharoperbutylacetonicum.*

[004] A principal vantagem na aplicação deste gênero de bactéria em processos fermentativos deve-se ao fato destes serem capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono, tal como hexoses (glicose, frutose, manose, sucrose, lactose, galactose), pentoses (xylose e arabinose) e fontes de amido, sem a necessidade de hidrólise dos polímeros de açúcares.

[005] Embora sendo uma rota já conhecida e ser baseado na utilização de matérias-primas renováveis, um dos maiores entraves no emprego de tal rota em larga escala é o aspecto econômico, mais especificamente no que diz respeito a matéria-prima (biomassa) e a energia dispendida nos processos de separação.

[006] Atualmente inúmeros estudos vêm sendo efetuados no sentido de se utilizar como matéria-prima biomassa residuais, ou seja, resíduos ou

subprodutos e excedentes de outros processos produtivos, em especial resíduos lignocelulósicos (bagaço, palha, madeira, resíduos de dendê, dentre outros).

[007] O pedido de patente WO2010098694 descreve um processo para a produção de solventes orgânicos, mais especificamente acetona, butanol e etanol, pela fermentação anaeróbica . O processo envolve a sacarificação de matéria-prima de origem vegetal, previamente triturada fisicamente, com enzimas capazes de degradar ou converter tal material em açúcares solúveis; fermentação dos açúcares pela ação de uma bactéria produtora de ABE e recuperação dos solventes por evaporação difusa através de uma membrana pela aplicação de vácuo. Neste caso, há dificuldades na disponibilização dos açucares presentes nos resíduos lignocelulósicos, pela utilização de uma única etapa de sacarificação, além disso, a matéria-prima empregada, lascas de madeira, faz necessária uma etapa adicional de remoção de piche por extração com solventes, preferencialmente acetona ou etanol.

[008] A utilização de meios hidrolisados açucarados oriundos do pré-tratamento tais resíduos lignocelulósicos possui, ainda, o inconveniente de gerar inibidores, em especial furfural, 5-HMF, e polifenóis, que inibem tanto o crescimento quanto o metabolismo bacteriano.

[009] Algumas tentativas vêm sendo realizadas com o intuito de superar tais obstáculos.

[010] O pedido de patente US 20100330633, por exemplo, descreve o processo de obtenção de butanol por fermentação ABE a partir de resíduos lignocelulósicos pré-tratados, com uma etapa prévia de destoxificação pelo uso de sistemas de resinas de troca iônica, de maneira a reduzir as altas concentrações de inibidores gerados no processo de pré-tratamento, que utiliza a hidrólise ácida à altas temperaturas, entre 170° e 230° C.

[011] Apesar de ser responsável pela remoção dos inibidores a etapa

de destoxificação acarreta alto custo ao processo tecnológico, além de ocasionar perdas representativas de substrato e de nutrientes, fundamentais na obtenção de altos rendimentos na fermentação ABE.

[012] Sendo assim, não há na literatura, descrição nem sugestão de um processo para a produção de solventes, mais especificamente acetona-butanol e etanol, de forma que não seja necessária a utilização de uma etapa para a remoção de compostos inibidores, sendo este processo descrito e reivindicado a seguir.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[013] A presente invenção propõe a produção fermentativa para a obtenção de butanol, acetona e etanol utilizando uma bactéria do gênero *Clostridium* a partir de uma mistura de uma corrente rica em glicose (concentração acima de 60%m/m) e uma corrente rica em xilose (concentração acima de 60%m/m), provenientes do processo hidrolítico de uma biomassa lignocelulósica.

[014] Neste processo, uma carga composta por biomassa lignocelulósica é submetida à uma etapa de pré-tratamento ácido em condições brandas (temperaturas de 110°C a 120°C), sendo obtidas duas fases: uma fase sólida e uma fase líquida rica em xilose, a fase sólida é submetida a etapa adicional de hidrólise enzimática empregando um tensoativo como aditivo, e, posteriormente, uma corrente líquida rica em glicose, obtida após a prensagem da fase sólida, é misturada com a corrente líquida rica em xilose, sendo a mistura submetida então a uma etapa de fermentação ABE.

[015] O processo possibilita atingir rendimento global na faixa de 0,35 a 0,47 g/g, com concentração ABE final de 11,5 a 18,7 g/L, valores este similares aos encontrados na literatura, e produtividade volumétrica global de 0,17 a 0,67 $g.L^{-1}.h^{-1}$, sem o inconveniente da necessidade de uma etapa adicional de destoxificação para a remoção de compostos inibidores (furfural, 5-hidroximetil-furfural e compostos fenólicos).

[016] De um modo amplo o processo aqui descrito combina três vantagens em relação ao estado da técnica quanto a produção por rota bioquímica de solventes:

a) Emprego de um microrganismo capaz de utilizar o açúcar na sua forma oligomérica, evitando o emprego de grandes quantidades de enzimas celulásicas, acima de 10%m/m na hidrólise de biomassa lignocelulosica, já que o objetivo de tais enzimas é quebrar estes oligossacarídeos em monômeros.
b) Emprego de tensoativo:
    i) Na etapa de hidrólise: ao modificar a propriedade da superfície da celulose, minimiza a ligação irreversível das celulases sobre a celulose, o que promoveria a perda de atividade das celulases.
    ii) Na etapa de fermentação ABE: aumento da produtividade;
c) Hidrólise ácida a temperatura inferior às empregadas usualmente, de modo que os compostos inibidores (HMF, furfural e compostos fenólicos) são produzidos em uma concentração tal que não é necessária a etapa prévia de destoxificação.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[017] A Figura 1 apresenta o perfil cinético de uma fermentação ABE, empregando uma cepa de Clostridium acetobutilycum, tendo como substrato uma mistura de um hidrolisado hemicelulósico (xilose) e celulósico (glicose) de uma biomassa lignocelulósica, contendo 25 g/l de glicose e 8 g/L de xilose respectivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[018] A presente invenção trata de um processo fermentativo ABE (acetona, butanol e etanol), utilizando como fonte de substrato e nutrientes o hidrolisado proveniente do processo hidrolítico de biomassa lignocelulósica.

[019] Tal biomassa lignocelulósica pode ser escolhida dentre: resíduos de milho, capim elefante, palha de arroz, palha de trigo, bagaço de cana, palha ou resíduos de dendê, madeira.

[020] Neste processo, a carga de biomassa lignocelulósica é submetida a uma etapa de cominuição, sendo geradas partículas de sólido de tamanho variando de 1 a 60 mm, que são então submetidas a um pré-tratamento com uma solução aquosa de um ácido forte em concentrações variando de 0,5-1%m/m, numa relação sólido/líquido variando de 1:2 a 1:4, por um período de tempo de 20 a 40 minutos e pressão variando de 1 a 2atm.

[021] Dentre os ácidos fortes úteis para a presente invenção podemos citar: ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico, ou misturas destes.

[022] A biomassa é então submetida a uma etapa de separação física, mais especificamente prensagem, onde é removida uma fase líquida rica em xilose (concentração acima de 60%m/m) e uma fase sólida. A fase sólida é então submetida à hidrólise enzimática, na presença de um tensoativo em concentrações variando de 3 a 5%m/m, seguida de nova separação física, dando origem a uma corrente líquida rica em glicose (concentração acima de 65%m/m).

[023] Os tensoativos uteis para a presente invenção são tensoativos não iônicos, escolhidos dentre: poli(oxietileno), sorbitan-monolaurato, polietilenoglicol, ou ainda misturas destes.

[024] Durante a hidrólise enzimática as celulases diminuem a sua atividade, sendo a adsorção irreversível das celulases sobre a celulose parcialmente responsável por essa desativação. A adição de tensoativos durante a etapa de hidrólise é relevante, pois é capaz de modificar a propriedade da superfície da celulose, minimizando a ligação irreversível das celulases sobre a celulose.

[025] A hidrólise enzimática é efetuada com o auxilio de um preparado enzimático celulásico com uma concentração de proteínas variando de 60

a 90 mg proteínas/L, composto por uma mistura de enzimas escolhidas dentre :celobiohidralases e beta-glicosidades. A adição de tais preparados à fase sólida é efetuada sob pH controlado, na faixa de 4,5 a 5,5, e numa proporção sólido/líquido de 10 a 20%. Esta etapa tem duração de 48 a 72 horas (ou de no mínimo – 48 horas) e ocorre a temperaturas variando de 45 a 55°C.

[026] A corrente rica em glicose e a corrente rica em xilose obtidas nas etapas anteriormente descritas são misturadas em uma razão (xilose) / (glicose) de 1:2 a 1:6 e servem como carga para um reator contendo biomassa de bactérias do gênero *Clostridium,* obtida após uma etapa de propagação bacteriana utilizando meio nutriente otimizado (6g/L de peptona, 6g/L de extrato de levedura e 12g/L de glicose) no período de 8 a 24 horas, a 37^0 C.

[027] Dentre as bactérias do gênero Clostridium, as úteis para a presente invenção são aquelas das espécies: *Clostridium saccharobutylicum, Clostridium saccharoperbutylacetonicum, Clostridium beijerinckii*, em especial a da espécie *Clostridium acetobutylicum.*

[028] A fermentação ABE ocorre a uma temperatura variando de 35 a 40, por um período de pelo menos 48 horas para o consumo de glicose e xilose.

[029] Assim, a presente invenção trata de um processo para a produção de solventes, mais especificamente acetona, butanol e etanol, por fermentação ABE, empregando a bactéria do gênero *Clostridium,* dito processo incluindo as seguintes etapas:

1) Prover uma carga para o processo, constituída por biomassa lignocelúlosica;
2) Acrescentar uma solução aquosa de um ácido forte à carga em uma concentração variando de 0,5-1%m/m, numa relação sólido/líquido de 1:2 a 1:4, à temperatura entre 110°C e 120 °C, e sob agitação de

modo a obter uma corrente com alto teor de sólidos, de pelo menos 20% m/m;

3) Submeter a corrente de alto teor de sólidos a um processo de separação, obtendo-se uma fase sólida, com razão sólido/líquido de pelo menos 20%, e uma fase líquida rica em xilose (concentração acima de 60%m/m);
4) Acrescentar à fase sólida um preparado enzimático celulásico, na presença de um tensoativo, e na proporção sólido/líquido entre 10% e 20% m/m, a um pH entre 4,0 e 5,5 por um tempo necessário para a geração de uma fase líquida rica em glicose (concentração acima de 6,5%);
5) Misturar a fase líquida rica em xilose com a fase líquida rica em glicose na proporção 1:2 a 1:6;
6) Adicionar a mistura obtida no item (5) a um reator contendo biomassa compreendendo bactérias do gênero Clostridium, numa proporção 1:1v/v, iniciando-se assim a fermentação a uma temperatura variando de 35 a 40°C, por um período de pelo menos 48 horas, de modo a produzir os solventes, acetona, butanol e etanol.

[030] Os exemplos, a seguir, correspondem a experimentos em escala de laboratório sem limitar o escopo do processo, detalhadamente descrito até aqui.

EXEMPLO 1

[031] Num reator foi efetuada a etapa de propagação microbiana de uma cultura de uma bactéria da espécie *Clostridium acetobutylicum* (DSMZ cepa1), caracterizada nas primeiras 20 horas com a formação de ácidos butírico e acético. Após este período, foi adicionado ao reator o hidrolisado hemicelulósico (xilose) e celulósico (glicose), contendo 25 g/l de glicose e 8 g/L de xilose para a promoção da fermentação ABE, conforme a Figura 1. A fase acidogênica da fermentação (formação de

ácido butírico e ácido acético) ocorreu entre 16 e 50 horas de processo e, em seguida, a fase solventogênica, que atingiu o máximo de concentração dos solventes butanol, acetona e etanol em 80 h, com concentrações de 6,5 g/L, 4,9 g/L e 0,8 g/L, respectivamente. O processo fermentativo (sem contar com a propagação) teve duração de 48 horas, com utilização da glicose primeiramente e, em seguida da xilose. Ambos os substratos foram esgotados no meio, obtendo-se um rendimento global ($Y_{P/S}$) de 0,37g/g, concentração ABE final de 12,2 g/L e produtividade volumétrica global de 0,25 $g.L^{-1}.h^{-1}$, valores compatíveis com a literatura.

REIVINDICAÇÕES

1- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, **caracterizado por** compreender a fermentação, empregando bactérias do gênero Clostridium, utilizando como fonte de substrato e nutrientes o hidrolisado proveniente do processo hidrolítico de biomassa lignocelulósica.

2- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

1) Prover uma carga para o processo, constituída por biomassa lignocelúlosica;
2) Acrescentar uma solução aquosa de um ácido forte à carga em uma concentração variando de 0,5-1%m/m, numa relação sólido/líquido de 1:2 a 1:4, à temperatura entre 110°C e 120 °C, e sob agitação de modo a obter uma corrente com alto teor de sólidos, de pelo menos 20% m/m;
3) Submeter a corrente de alto teor de sólidos a um processo de separação, obtendo-se uma fase sólida, com razão sólido/líquido de pelo menos 20%, e uma fase líquida rica em xilose (concentração acima de 60%m/m);
4) Acrescentar à fase sólida um preparado enzimático celulásico, na presença de um tensoativo, e na proporção sólido/líquido entre 10% e 20% m/m, a um pH entre 4,0 e 5,5 por um tempo necessário para a geração de uma fase líquida rica em glicose (concentração acima de 6,5%);
5) Misturar a fase líquida rica em xilose com a fase líquida rica em glicose na proporção 1:2 a 1:6
6) Adicionar a mistura obtida no item (5) a um reator contendo biomassa compreendendo bactérias do gênero Clostridium, numa proporção 1:1v/v, iniciando-se assim a fermentação a uma

temperatura variando de 35 a 40°C, por um período de pelo menos 48 horas, de modo a produzir os solventes, acetona, butanol e etanol.

3- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA,** de acordo com as reivindicações 1 ou 2, **caracterizado por** a biomassa lignocelulósica ser escolhida dentre: resíduos de milho, capim elefante, palha de arroz, palha de trigo, bagaço de cana, palha ou resíduos de dendê, madeira.

4- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA,** de acordo com as reivindicações 1 ou 2, **caracterizado por** a biomassa lignocelulósica ser submetida a uma etapa de cominuição, sendo geradas partículas de sólido de tamanho variando de 1 a 60 mm.

5- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por** o ácido forte ser escolhido: ácido sulfúrico, ácido nítrico, e ácido clorídrico, ou misturas destes.

6- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por a** por a adição do ácido forte ser efetuada durante um período de tempo de 20 a 40 minutos e sob pressão variando de 1 a 2atm.

7- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA,** de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** a adição do preparado enzimático celulásico ser efetuada na presença de um tensoativo em concentrações variando de 3 a 5%m/m.

8- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** o tensoativo ser um tensoativo não iônico.

9- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE**

BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** o tensoativo ser escolhido dentre: poli(oxietileno), sorbitan-monolaurato, polietilenoglicol, ou ainda misturas destes.

10- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** o preparado enzimático celulásico com uma concentração de proteínas variando de 60 a 90 mg proteínas/L, composto por uma mistura de enzimas escolhidas dentre: celobiohidrolases e beta-glicosidases.

11- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** o tempo necessário para a geração da fase líquida rica em glicose ter duração de 48 a 72 horas e sob temperaturas variando de -45 a 55°C.

12- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** a biomassa de bactérias ser obtida após uma etapa de propagação de uma cultura de bactéria do gênero *Clostridium* utilizando meio nutriente otimizado (6g/L de peptona, 6g/L de extrato de levedura e 12g/L de glicose) no período de 8 a 24 horas, a 37^0 C.

13- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** a bactéria do gênero Clostridium, ser escolhida dentre uma bactéria das espécies: *Clostridium saccharobutylicum, Clostridium saccharoperbutylacetonicum, Clostridium beijerinckii*, em especial a da espécie *Clostridium acetobutylicum.*

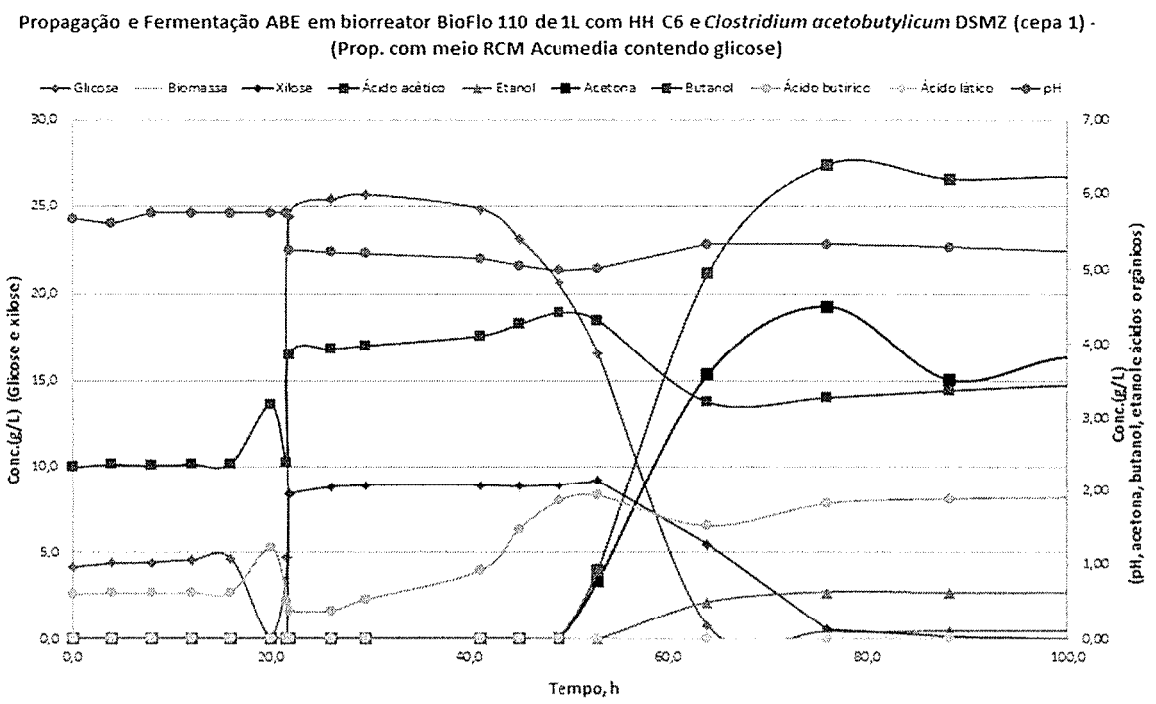

Propagação e Fermentação ABE em biorreator BioFlo 110 de 1L com HH C6 e Clostridium acetobutylicum DSMZ (cepa 1) - (Prop. com meio RCM Acumedia contendo glicose)
Glicose
Biomassa
Xilose
Ácido acético
Etanol
Acetona
Butanol
Ácido butírico
Ácido lático
pH
Conc.(g/L) (Glicose e xilose)
Conc.(g/L) (pH, acetona, butanol, etanol e ácidos orgânicos)
Tempo, h
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
0,0
20,0
40,0
60,0
80,0
100,0

FIG. 1

RESUMO

PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

É descrito um processo para a produção de solventes, mais especificamente acetona, butanol e etanol, pela fermentação com bactérias do gênero Clostridium de uma mistura de correntes de hidrolisado hemicelulósico (xilose) e celulósico (glicose) de uma biomassa lignocelulósica.

Instituto Nacional da
Propriedade Industrial
Ministério da Economia

Consulta à Base de Dados do INPI

Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: BR 10 2018 070289 0

(22) Data do Depósito: 02/10/2018

(43) Data da Publicação: -

(47) Data da Concessão: -

(71) Nome do Depositante: PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS (BR/RJ) / UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ (BR/RJ)

(74) Nome do Procurador: BIANCA DE CASTRO LEYEN

Anuidades

Petições

Serviço	Pgo	Protocolo	Data	Imagens	Cliente	Delivery	Data
Serviços							
249	✓	870180156026	28/11/2018	- - -	PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS		-
200	✓	870180136907	02/10/2018	- - -	PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS		-
Anuidade							
Outros							

Publicações

RPI	Data RPI	Despacho	Img	Complemento do Despacho
2507	**22/01/2019**	25.1	-	
2501	**11/12/2018**	2.1	-	
2492	**09/10/2018**	2.10	-	- Número de Protocolo '870180136907' em 02/10/2018 12:16 (WB)

Dados atualizados até **22/10/2019** - Nº da Revista: **2546**

Documentos Publicados

Rua Mayrink Veiga, 9 - Centro - RJ - CEP: 20090-910

Fale Conosco