

Uso de agentes redutores na fermentação ABE como uma estratégia para melhorar a produção de butanol

Vitória Babo Ventura de Souza¹, Bruna Pratto²

Departamento Engenharia Química, Centro Universitário FEI

vitoriababo@outlook.com e brunapratto@fei.edu.br

Resumo: O processo de fermentação de acetona-butanol-etanol (ABE) emerge como uma opção promissora para produção de biocombustíveis. Contudo, a viabilidade comercial do processo ABE tem sido comprometida devido aos baixos rendimentos e concentrações de produtos alcançados. No presente trabalho, foi investigado o uso de agentes redutores (L-cisteína e ácido ascórbico) de baixo custo como estratégia para melhorar a produção de butanol na fermentação. O uso de agentes redutores nas concentrações (0,3 e 0,6 mM) e momento de adição (0 h) avaliados apresentaram desempenho ligeiramente inferior ao controle (sem adição de agente redutor). Diante disso, sugere-se investigar concentrações menores e adição do agente redutor durante a fase exponencial de crescimento da bactéria fermentativa.

1. Introdução

O processamento de resíduos lignocelulósicos por meio de rotas fermentativas tem mostrado ser uma possibilidade promissora para produção de biocombustíveis e bioprodutos.

Dentre as vias bioquímicas para a produção de biocombustíveis, a fermentação ABE se destaca. Nessa via, os produtos formados são acetona, etanol e butanol na proporção mássica de 3:6:1, respectivamente. O resíduo lignocelulósico deve ser primeiramente pré-tratado para remoção de lignina e aumento de acessibilidade dos polissacarídeos, posteriormente hidrolisado para obtenção dos açúcares fermentescíveis e fermentado anaerobicamente por bactérias do gênero *Clostridium* para geração dos solventes ABE.

O biobutanol (n-butanol) é o produto de maior interesse, com várias vantagens como combustível veicular. Suas propriedades são similares às da gasolina, podendo ser misturado em até 40% (v/v) sem impactos negativos nos motores de ignição por centelha. Além disso, é menos corrosivo, possui maior poder calorífico e menor volatilidade do que o etanol (GUAN et al., 2016). Também é mais biodegradável e seguro para armazenagem se comparado à gasolina.

Um dos principais desafios no processamento de biomassa para biobutanol é a etapa de fermentação ABE, cujo rendimento de butanol é baixo (~ 0,3 g_{butanol}/g_{açúcar consumido}) devido à baixa tolerância do microrganismo ao próprio produto (biobutanol) e a compostos inibidores (fenólicos, furanos e ácidos alifáticos) provenientes do pré-tratamento da biomassa. Neste contexto, a utilização de agentes destoxicantes e redutores podem melhorar a eficiência da fermentação. Os agentes destoxicantes atuam na remoção de compostos fenólicos do hidrolisado lignocelulósico antes da fermentação. Já os agentes redutores utilizados

durante a fermentação fornecem elétrons para a regeneração oxidativa (dado que durante a fermentação uma sequência de reações REDOX ocorre) das células. O fornecimento adequado de NAD⁺ e NADH durante a fase de produção de solventes é crucial para obter uma boa concentração final de butanol.

Neste sentido, o presente estudo tem por objetivo avaliar o uso de agentes redutores e destoxicantes na eficiência da fermentação ABE de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, visando aumento da produção de butanol em comparação com o meio convencional (sem adição de agentes redutores). Para isso, foi utilizado polisorbato 80, conhecido também como *Tween* 80, na hidrólise enzimática, e posteriormente a destoxificação com carvão ativado, para remover compostos fenólicos presentes no hidrolisado. Além disso, outros compostos como a L-cisteína e ácido ascórbico foram empregados como agentes redutores na etapa fermentativa.

2. Metodologia

O resíduo lignocelulósico, após coletado e triturado, foi pré-tratado com ácido sulfúrico (1,4% m/m) a 121°C por 55 min (condição otimizada em estudos anteriores) [1]. Esse processo teve como objetivo desestruturar a matriz lignocelulósica e aumentar a acessibilidade da celulose. Em seguida, a biomassa pré-tratada foi submetida à hidrólise enzimática utilizando 20 FPU/g_{cellulose} da enzima comercial *Cellic*[®]*Ctec2* e 10% m/v de carga de sólidos. A mistura foi agitada a 250 rpm em incubadora shaker a 50 °C por 48 h, visando obter os açúcares fermentescíveis (glicose e xilose). Durante esta etapa, também foi adicionado *Tween* 80 (1% v/v_{reação}), que tem a função de minimizar a adsorção da enzima na lignina presente na biomassa.

O hidrolisado resultante foi submetido a um processo de destoxificação com carvão ativado (5% m_{carvão}/V_{reacional}) a 28 °C por 1 h para remoção dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado.

O microrganismo utilizado na fermentação ABE foi o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. A ativação dos esporos da bactéria foi feita em meio RCM (*Reinforced Clostridium Medium*) a 37 °C até densidade ótica (D.O) de 2-2,5 (aproximadamente 24 h).

5% V_{inóculo}/V_{total} das células ativadas foram ressuspendidos no hidrolisado celulósico, dando início a fermentação ABE. Dois agentes redutores (L-Cisteína e ácido ascórbico) foram adicionados no meio reacional no tempo inicial, em concentrações de 0,3 e 0,6 mM.

Após adição de todos os compostos, os frascos foram acondicionados na estufa a 37 °C por 96 h.

A fermentação foi realizada em 18 ensaios com réplicas sendo distribuídas conforme a tabela 1 a seguir:

Tabela 1 – Ensaios fermentação ABE

| Hidrolisado não-destoxificado | | | Hidrolisado destoxificado | | |
|-------------------------------|-----------------------------|---------|---------------------------|-----------------------------|---------|
| Ensaio | Condição | Réplica | Ensaio | Condição | Réplica |
| 1 | Sem agentes redutor | | 10 | Sem agente redutor | |
| 2 | Hid. + ác. ascórbico 0,3 mM | A | 11 | Hid. + ác. ascórbico 0,3 mM | A |
| 3 | | B | 12 | | B |
| 4 | Hid. + L-cisteína 0,3 mM | A | 13 | Hid. + L-cisteína 0,3 mM | A |
| 5 | | B | 14 | | B |
| 6 | Hid. + ác. ascórbico 0,6 mM | A | 15 | Hid. + ác. ascórbico 0,6 mM | A |
| 7 | | B | 16 | | B |
| 8 | Hid. + L-cisteína 0,6 mM | A | 17 | Hid. + L-cisteína 0,6 mM | A |
| 9 | | B | 18 | | B |

Durante a fermentação, alíquotas foram retiradas para análise dos produtos formados e substrato consumido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. Resultados

Apenas as condições que levaram aos resultados mais expressivos foram apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Desempenho Fermentação

| | Hid. s/ redutores | Hid. Destox s/ redutores | Hid. + ác. ascórb. 0,3 mM | Hidrolis. destox. + ác. Ascórb. 0,3 mM |
|---|-------------------|--------------------------|---------------------------|--|
| Glicose Inicial (g/L) | 33,42 | 33,46 | 29,88 | 29,91 |
| Xilose Inicial (g/L) | 4,92 | 4,80 | 4,39 | 4,29 |
| Glicose consumida (g/L) | 32,97 | 32,98 | 29,43 ± 0,01 ^a | 29,44 ± 0,07 ^a |
| Consumo xilose (%) | 56 | 41 | 41 ± 0,04 ^a | 65 ± 0,01 ^a |
| Consumo glicose (%) | 99 | 99 | 98 | 98 |
| Acetona (g/L) | 2,65 | 2,84 | 2,17 ± 0,12 ^a | 1,97 ± 0,45 ^a |
| Butanol (g/L) | 7,70 | 7,51 | 6,86 ± 0,12 ^a | 6,57 ± 0,56 ^a |
| Etanol (g/L) | 1,65 | 1,25 | 1,58 ± 0,07 | 1,08 ± 0,04 ^a |
| Total ABE (g/L) | 12,00 | 11,60 | 10,61 ± 0,07 ^a | 9,61 ± 0,15 ^a |
| Rend. produto (g _{butanol} /g _{glicose consumida}) | 0,23 | 0,23 | 0,23 | 0,22 |
| Ácido Acético (g/L) | 2,91 | 3,80 | 2,81 ± 0,03 ^a | 3,52 ± 0,26 ^a |

^aValor médio ± desvio padrão representam a média de ensaios realizados em duplicata.

4. Discussões e conclusão

Através da tabela 2, observa-se que o efeito da destoxificação mostrou-se pouco significativo, uma vez apresentou valores similares ao hidrolisado não-destoxificado. Análises realizadas indicaram baixa concentração (0,3 g/L) de compostos fenólicos no hidrolisado bruto, o que sugere que a destoxificação não teve efeito positivo na fermentação. Trabalhos da literatura [2,3] relatam que concentração de fenólicos acima de 0,8 g/L tornam-se inibidoras para *Clostridium*.

A adição de agentes redutores durante a fermentação resultou em uma produção ligeiramente menor de butanol em comparação com o experimento controle. Possivelmente, as concentrações avaliadas foram altas e adicionadas em fase de crescimento inadequada para as células.

Como estudos posteriores, faz-se necessário adicionar os agentes redutores após 12 h de fermentação, que corresponde ao meio da fase exponencial de crescimento (alta atividade metabólica) e, portanto, permite uma maior conversão de NADH [4]. Além disso, sugere-se a investigação de concentrações menores de agentes redutores e a possível suplementação de glicose, uma vez que todo o açúcar foi consumido durante a fase acidogênica, não havendo fonte de carbono para iniciar a fase solvatogênica.

5. Referências

- [1] da SILVA, L.F.L. *et al.* Dilute-acid pretreatment optimization targeting full sugars exploitation and minimal generation of degradation products. XXIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Búzios, RJ, 2022.
- [2] LEE, K.M. *et al.*, 2015. In situ detoxification of lignocellulosic hydrolysate using a surfactant for butyric acid production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755. *Process Biochem.* 50, 630–635.
- [3] PRATTO, B. *et al.*, **Biobutanol production from sugarcane straw: Defining optimal biomass loading for improved ABE fermentation.** *Industrial crops and products*, v. 148, p. 112265, 2020.
- [4] CHANDGUDE, V. *et al.*, **Reducing Agents Assisted Fed-Batch Fermentation to Enhance ABE Yields.** *Energy Conversion and Management*, 2021.

Agradecimentos

À instituição Centro Universitário FEI por ceder o local, equipamentos e as tecnologias que permitiram a realização deste trabalho. Também aos colegas, familiares e professores que deram o suporte durante todo o processo.

¹ Aluno de IC do Centro Universitário FEI (CNPq – processo 125532/2022-9). Projeto com vigência de 09/2022 a 09/2023.