

# ESTUDO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE CO-FERMENTAÇÃO DE HEXOSES E PENTOSAS PARA PRODUÇÃO DE BUTANOL

V.B. Ventura<sup>1</sup>, B. Pratto<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Chemical Engineering Department, FEI University Center, São Bernardo do Campo, Brasil.

\* brunapratto@fei.edu.br

**Resumo:** O biobutanol tem emergido como um biocombustível promissor devido à sua alta densidade energética e compatibilidade em misturas com gasolina. Uma etapa fundamental na produção de biobutanol é a fermentação de acetona-butanol-etanol (ABE), um bioprocessamento mediado por bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium* que podem assimilar diversas hexoses e pentoses. Embora a fermentação de hexoses e pentoses seja uma abordagem simples, a assimilação simultânea desses açúcares pode levar à supressão metabólica da xilose pela glicose. Assim, o presente projeto tem como objetivo avaliar diferentes estratégias para a co-fermentação de glicose e xilose de meios sintéticos. Foram avaliadas cinco estratégias, considerando glicose e xilose como fontes de carbono, fermentadas isoladamente, sequencialmente ou simultaneamente. A concentração de glicose (40 g/L) e xilose (20 g/L) foi definida de acordo com a composição típica de hidrolisados lignocelulósicos. A melhor estratégia avaliada foi utilizar primeiro a glicose, seguida da suplementação de xilose (S5). O rendimento e a concentração de butanol foram de 0,35 g<sub>butanol</sub>/g<sub>glicose</sub> consumida e 11,97 g/L, respectivamente.

## 1. Introdução

Os processos fermentativos para conversão de resíduos lignocelulósicos em biocombustíveis, produtos químicos e materiais são uma opção sustentável com baixa demanda energética no contexto das biorrefinarias. A fermentação ABE (acetona, butanol, etanol) ou IBE (isopropanol, butanol, etanol) é uma opção promissora para explorar glicose e xilose, os dois principais açúcares nas biomassas lignocelulósicas. Tais fermentações são mediadas por bactérias do gênero *Clostridium*, capazes de metabolizar uma variedade de monossacarídeos, incluindo muitas hexoses e pentoses, proporcionando uma vantagem significativa sobre os microrganismos produtores naturais de etanol, que só conseguem sintetizar algumas hexoses [1].

Embora cepas de *Clostridium* possam metabolizar a glicose ou a xilose individualmente, a assimilação da xilose é inibida quando a glicose está disponível no meio de reação [2]. Portanto, estudar estratégias de assimilação de hexoses e pentoses é essencial para a utilização eficiente de açúcares na biomassa lignocelulósica. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar diferentes estratégias de co-fermentação de glicose e xilose, adicionando essas fontes de carbono de forma individual, simultânea ou sequencial.

## 2. Materiais e Métodos

*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 da Coleção de Culturas ARS (Agricultural Research Services), EUA, foi utilizado em ensaios de fermentação.

A ativação dos esporos foi feita em meio RCM (*Reinforced Clostridium Medium*) com xilose ou glicose como fonte de carbono a 37°C até densidade óptica (D.O) de 2-2,5 (aproximadamente 24 h). Após a inoculação, 10% v/v de inóculo foi ressuspenso no meio com a seguinte composição (g/L): fonte de carbono (glicose (40) e/ou xilose (20)); acetato de amônio (2,2); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5); vitaminas (ácido para-aminobenzóico (0,1), tiamina (0,1) e biotina (0,01)) e sais minerais (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2); MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0,01); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01); NaCl (0,01)). O pH do meio de fermentação foi ajustado para 6,5 com HCl ou KOH, conforme necessário. As soluções foram autoclavadas por 15 minutos a 120°C para esterilizar o meio e depois seladas para garantir a anaeróbia do meio e evitar contaminação com o ambiente externo. A fermentação foi realizada estaticamente em meio anaeróbio a 37 °C.

Diferentes configurações de fermentação foram realizadas para determinar a estratégia ideal de metabolização da glicose e xilose, sendo elas: 1) Fermentação isolada de xilose (S1) ou glicose (S2); 2) Co-fermentação da glicose e da xilose, onde ambos os açúcares são fermentados simultaneamente (S3); 3) Lote sequencial: a primeira etapa contendo apenas xilose seguida de alimentação com glicose (S4), ou a primeira etapa contendo apenas glicose seguida de alimentação com xilose (S5). A segunda fonte de carbono foi adicionada quando a concentração de açúcar no meio caiu para menos de 10 g/L. As concentrações iniciais de glicose e xilose foram definidas com base nos níveis esperados em hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos.

Alíquotas foram retiradas durante a fermentação e analisadas por HPLC dos solventes (acetona, etanol, butanol) produzidos, bem como dos açúcares (glicose e xilose) consumidos. O cromatógrafo (Shimadzu LC-10AD) foi equipado com detector de índice de refração (Shimadzu RID-10A) e coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H utilizando ácido sulfúrico 5 mM a 0,6 mL/min e 35 °C.

Para avaliar os parâmetros de fermentação foram avaliados o rendimento e a produtividade de butanol, calculados pelas equações 1 e 2, respectivamente:

$$\text{Rendimento} \left( \frac{\text{g Butanol}}{\text{g Açúcar consumido}} \right) = \frac{C_{\text{Butanol}}}{C_{\text{Açúcar},0} - C_{\text{Açúcar},f}} \quad (1)$$

onde: C<sub>butanol</sub> é a concentração (g/L) de butanol obtida ao final da fermentação; C<sub>açúcar,0</sub> é a concentração de açúcares no início da fermentação, e C<sub>açúcar, f</sub>, final é a concentração de açúcares no final da fermentação.

$$\text{Produtividade} \left( \frac{\text{g Butanol}}{\text{L.h}} \right) = \frac{C_{\text{Butanol}}}{\text{Tempo de fermentação}} \quad (2)$$

O tempo de fermentação variou entre as diferentes estratégias e foi definido como o período até que o consumo de açúcar e a produção de butanol estagnassem.

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas. Os resultados são relatados como média ± erro padrão. O teste de Tukey avaliou a significância estatística das diferenças entre os grupos, considerando o nível de confiança de 90% (p < 0,10).

## 3. Resultados e discussão

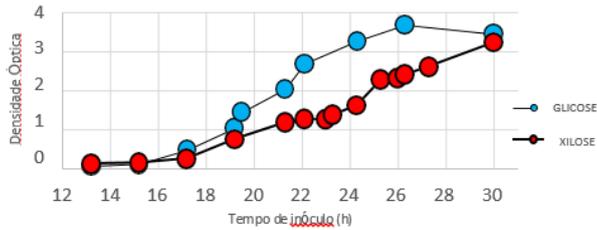
### Ativação de bactérias em meio RCM com diferentes fontes de carbono

A ativação dos esporos foi realizada em glicose ou xilose para analisar seu tempo de crescimento em diferentes fontes de carbono. A Figura 1 mostra o crescimento celular usando densidade óptica em função do tempo de inoculação.

O perfil de crescimento mostra que *C. acetobutylicum* pode crescer em ambas as fontes de carbono, mas cresce mais rapidamente em glicose. A fase de crescimento exponencial inicia-se por volta das 19 horas no meio com glicose, enquanto no meio com xilose inicia-se às 24 horas. Fermentações bem-sucedidas requerem crescimento celular exponencial, caracterizado por intensa atividade metabólica e densidades ópticas.

Os resultados confirmaram a preferência das bactérias pela glicose, o que é esperado, uma vez que a glicose é a fonte de carbono mais facilmente metabolizável pelos microrganismos.

**Figura 1 - Cinética de crescimento em diferentes fontes de carbono**



**Avaliação das estratégias de fermentação**

A Tabela 1 representa os principais resultados de concentração, produtividade e rendimento de butanol. O tempo de fermentação em cada teste referiu-se ao momento em que o consumo de substrato e a geração de produto estagnaram:

**Tabela 1 - Resultados de fermentação para as diferentes estratégias avaliadas**

	S1 20 g/L xil.	S2 40 g/L glic.	S3 20 g/L xil + 40 g/L glic.	
	47 h	146 h	96 h	
Consumo de glicose (%)	0%	63%	95%	
Consumo de Xilose (%)	44%	0%	15%	
Butanol (g/L)	3.57 ± 0.22 <sup>a</sup>	8.84 ± 0.31 <sup>b</sup>	8.47 ± 0.70 <sup>b</sup>	
Rendimento Butanol (gbutanol/g açúcar consumido)	0.43 ± 0.012 <sup>d</sup>	0.32 ± 0.017 <sup>e</sup>	0.21 ± 0.001 <sup>f</sup>	
Taxa do consumo de substrato (g/(L.h))	0.08 ± 0.00	0.17 ± 0.03	0.25 ± 0.01	
Produtividade de butanol (g/(L.h))	0.076 ± 0.005 <sup>h</sup>	0.061 ± 0.002 <sup>i</sup>	0.088 ± 0.005 <sup>h</sup>	
	S4 20 g/L xil sup. 40 g/L glic.		S5 40 g/L glic. sup. 20 g/L xil.	
	Antes sup. 72 h	Após sup. 168 h	Antes sup. 146 h	Após sup. 216 h
Consumo de glicose (%)	0%	55%	70%	100%
Consumo de Xilose (%)	69%	0%	0%	0%
Butanol (g/L)	3.29 ± 0.49 <sup>a</sup>	9.15 ± 0.27 <sup>b</sup>	8.55 ± 0.42 <sup>b</sup>	11.97 ± 0.26 <sup>c</sup>
Rendimento Butanol (gbutanol/g açúcar consumido)	0.24 ± 0.017 <sup>f,9</sup>	0.28 ± 0.026 <sup>h,9</sup>	0.35 ± 0.018 <sup>e</sup>	0.34 ± 0.007 <sup>e</sup>
Taxa do consumo de substrato (g/(L.h))	0.17 ± 0.00	0.01 ± 0.02	0.16 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Produtividade de butanol (g/(L.h))	0.039 ± 3E-4	0.054 ± 0.002 <sup>i</sup>	0.059 ± 0.003 <sup>i</sup>	0.055 ± 0.001 <sup>i</sup>

As letras minúsculas sobrescritas representam o teste de Tukey para comparações múltiplas entre linhas (p < 0,1) de cada ensaio.

A taxa de consumo de xilose em (S1) foi 2,1 vezes menor que a de glicose (S2), reiterando a preferência do microrganismo por esta última. Além disso, em S2, a produção de butanol foi 2,48 vezes maior. A concentração de butanol foi possivelmente baixa em S1 devido à baixa concentração inicial de xilose, que foi insuficiente para sustentar as fases acidogênica e solvatogênica. Nesse sentido, foi proposta a estratégia S3 para aumentar a concentração inicial de substrato, onde glicose e xilose estivessem disponíveis. Em 96 horas de reação, o consumo de substrato foi de 95% para glicose e 15% para xilose, indicando repressão catabólica pela glicose, onde a célula suprime a assimilação de pentose em favor da presença de glicose, fonte de carbono mais facilmente metabolizável. Apesar do baixo consumo de xilose, a produção de butanol foi satisfatória (8,47 g/L), atingindo valores estatisticamente iguais ao S2.

Curiosamente, a produtividade de butanol em S3 foi 1,4 vezes maior que em S2 e maior que nas demais condições. Este comportamento provavelmente está associado à maior concentração inicial de substrato, o que leva a uma maior taxa de crescimento celular, aumentando assim a produtividade dos metabólitos.

A estratégia S4 é proposta para explorar a xilose de forma mais eficiente, uma vez que esta é a única fonte de carbono até o momento da suplementação. Neste ensaio, 69% da xilose foi consumida antes da suplementação, rendendo 0,24 gbutanol/gxilose consumida e 3,3 g/L de butanol. Após a suplementação de glicose, o consumo de xilose foi completamente inibido, com 55% de utilização de glicose após mais 96 horas de fermentação. O consumo incompleto de glicose está provavelmente associado à inibição celular pelo produto (butanol). Ao final da fermentação obteve-se uma concentração de butanol de 9,15 g/L.

As estratégias S1 e S4 (antes da suplementação) não apresentaram diferença estatística (p < 0,1) na concentração de butanol, o que já era esperado, pois as condições eram as mesmas. O mesmo comportamento é observado em S2, S3 e S5 (antes da suplementação), que também apresentam condições iniciais iguais. O ensaio S3, apesar de conter xilose, não apresenta diferenças significativas, pois a xilose não foi metabolizada para produzir butanol.

O ensaio S1 apresenta diferenças significativas quanto ao rendimento de butanol devido à baixa concentração de xilose consumida. S2, S4 (após a suplementação) e S5 (antes e após a suplementação) não apresentaram diferenças significativas (p < 0,1) no rendimento de butanol. Observa-se que a suplementação de glicose (S4) aumentou o rendimento de butanol, aumentando de 0,24 para 0,28 g/g. S1 e S3 não apresentaram diferenças significativas na produtividade de butanol, com valores maiores que nos demais ensaios. Esse comportamento está associado à estagnação da fermentação em um curto espaço de tempo, gerando, portanto, um valor de produtividade maior.

A produção de butanol atingiu o título máximo (11,97 g/L) no S5 após suplementação com xilose. Após a suplementação, a glicose foi totalmente consumida. Conforme observado em S3, a presença simultânea de pentoses e hexoses pode melhorar a fermentação, levando a maior concentração e/ou produtividade de butanol. Certamente, a xilose não foi consumida porque o nível de butanol alcançado já era tóxico para as bactérias. Estudos descobriram que a síntese de xilose por *C. acetobutylicum* é altamente sensível ao butanol [3].

**4. Conclusões**

A fermentação ABE é uma estratégia promissora para a produção de biocombustíveis a partir de hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos, uma vez que *C.acetobutylicum* demonstrou a capacidade de fermentar açúcares C5 e C6. A estratégia S3 e S5 foram as melhores estratégias para produção de butanol, alcançando o melhor desempenho fermentativo. Para estudos futuros, exploraremos concentrações mais elevadas de xilose (entre 40 e 60 g/L) para investigar o potencial de aumento da produção de butanol exclusivamente a partir desta fonte de carbono.

**5. Referências**

[1] LIN, X. TAO, S. LIU, S. HUANG, H. NICHOLS, N, N. 2023. Energies. 16 (13). 4945-4966.  
 [2] YANG, M. et al. Bioresour. Technol. 2015. 179. 128-135  
 [3] XIAO, H. GU, Y. NING, Y. YANG, Y. MITCHELL, W, J. JIANG, W. YANG, S. 2011. Appl. Environ. Microbiol. 77 (22). 7886-7895.

**6. Agradecimentos**

Os autores agradecem à Universidade Centro FEI pelo apoio financeiro e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) pela bolsa (número 142667/2023-4).