

IMOBILIZAÇÃO DE *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* VISANDO APLICAÇÃO EM PROCESSOS FERMENTATIVOS

João Pedro Ferrarezzo de Lima¹, Bruna Pratto¹

¹ Departamento de Engenharia Química, FEI
jpferrarezzo@gmail.com; brunapratto@fei.edu.br

Resumo: A fermentação ABE (acetona-butanol-etanol) é uma rota sustentável para biocombustíveis e químicos a partir de resíduos agroindustriais, utilizando bactérias *Clostridium* em condições anaeróbicas. Essas bactérias, embora capazes de metabolizar diferentes hexoses e pentoses, possuem baixa tolerância ao butanol, limitando a produção a cerca de 10 g/L, além de serem sensíveis aos inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos. A imobilização das células em matriz polimérica surge como uma alternativa para protegê-las do meio reacional. Este trabalho visa imobilizar células de *Clostridium Acetobutylicum* para aumentar a eficiência da fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, buscando resultados superiores aos métodos convencionais.

1. Introdução

A fermentação ABE (Acetona-Butanol-Etanol) usa bactérias do gênero *Clostridium* para produzir solventes a partir de açúcares e amidos renováveis. Embora tenha sido substituída por métodos petroquímicos mais baratos, a fermentação ABE está ressurgindo devido ao interesse em alternativas sustentáveis. Seus principais desafios incluem a baixa concentração de butanol (máximo de 10 g/L), causada pela baixa tolerância das bactérias ao butanol e aos compostos gerados durante o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica [1,2].

Uma forma de reduzir a toxicidade dos produtos e melhorar a eficiência da fermentação é usar células imobilizadas, que são fixadas em um material de suporte. Isso permite que o substrato e o produto se difundam através da matriz onde as células estão confinadas. Comparadas às células livres, as imobilizadas tendem a ser mais estáveis em termos de temperatura, pH e resistência a inibidores [2]. Os métodos de imobilização incluem a ligação direta a suportes insolúveis e o encapsulamento em matrizes poliméricas, sendo este último mais estudado devido à sua simplicidade e eficiência na retenção celular. O encapsulamento é uma técnica amplamente estudada para a imobilização de células devido à sua simplicidade e eficiência. Baseia-se no aprisionamento das células em um suporte rígido de maneira a impedir a liberação das células enquanto permite a difusão de substratos e produtos [3].

Dado o contexto apresentado, o projeto visa imobilizar células de *Clostridium acetobutylicum* em polímero de PVA (álcool polivinílico)-alginato. O PVA foi escolhido, pois oferece maior resistência mecânica,

durabilidade e maior estabilidade química em soluções ácidas e alcalinas. Já o alginato de sódio apresenta boas características difusionais.

2. Metodologia

Para os ensaios de fermentação foram utilizadas cepas da bactéria *Clostridium Acetobutylicum* obtida da Coleção de Cultura dos Serviços de Pesquisa Agrícola, EUA. Como suporte de imobilização foi utilizado gel de álcool polivinílico com alginato de sódio e ácido bórico com cloreto de cálcio para reticulação induzida e formação da matriz polimérica.

Primeiramente, as células esporuladas de *Clostridium acetobutylicum* foram ativadas com um choque térmico a 80 °C por 2 minutos em frascos com 100 mL de Meio Reforçado para *Clostridium* (MRC), previamente aquecido. Após o choque térmico, os frascos foram resfriados em banho de gelo e incubados anaerobicamente a 37 °C por cerca de 20 horas até a densidade óptica atingir entre 2,0 e 2,5. O MRC contém glicose, extrato de carne, peptona, extrato de levedura, amido, NaCl, acetato de sódio, L-cisteína, e o pH é ajustado para $6,8 \pm 0,2$ [4].

Após a ativação dos esporos, iniciou-se o encapsulamento com um gel de 5% (m/v) de PVA e 2% (m/v) de alginato misturado com a cultura bacteriana. Essa mistura foi gotejada em uma solução reticulante contendo 0,5% (m/v) de L-cisteína, 5% (m/v) de ácido bórico e 2% (m/v) de cloreto de cálcio. As esferas formadas, chamadas de Beads, foram mantidas na solução reticulante por 24 horas para completar a polimerização. Todo o processo ocorreu em condições anaeróbicas, com soluções purgadas com nitrogênio e gotejamento realizado em uma câmara vedada com fluxo constante de nitrogênio.

Na figura 1 é apresentada as Beads após reticulação.

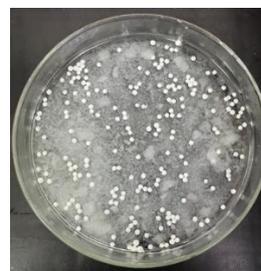


Figura 1 – Beads na solução reticulante

Após o processo de reticulação, os *Beads* foram lavados com água destilada e utilizados para ensaios de fermentação.

Quatro fermentações foram realizadas: 1) meio de cultura com células livres; 2) meio de cultura com 1 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico e células livres; 3) meio de

cultura com células imobilizadas; 4) meio de cultura com 1 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico e células imobilizadas. O objetivo é verificar se a imobilização das células protege contra inibidores de fermentação presentes em hidrolisados de biomassa lignocelulósica com pré-tratamento químico.

O monitoramento da fermentação foi realizado através de coleta das amostras a cada 24 h, analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência quantificando os compostos produzidos ao decorrer da fermentação.

A figura 2 apresenta os frascos de fermentação contendo o meio de cultura e as células imobilizadas.



Figura 2 – Frasco contendo meio de fermentação e as células imobilizadas

3. Resultados

Nas figuras 3 e 4 são apresentadas as cinéticas de fermentação das células livres na ausência ou presença de inibidor, respectivamente.

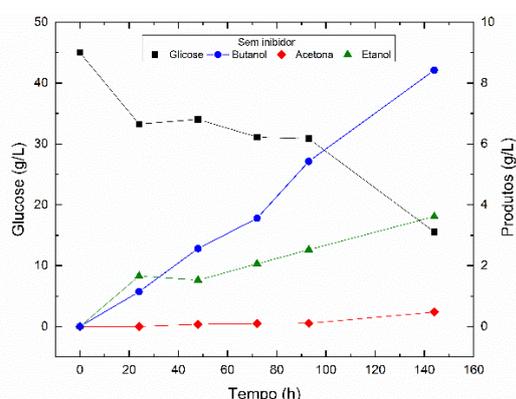


Figura 3– Cinética de fermentação com células livres sem inibidor

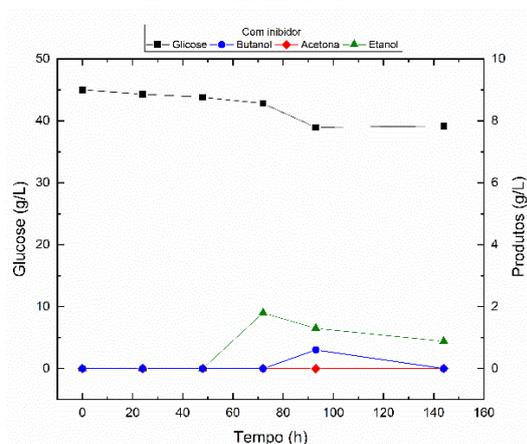


Figura 4– Cinética de fermentação com células livres com inibidor

A Figura 3 mostra que, na fermentação com células livres e sem a presença de inibidor, o processo ocorreu conforme esperado, com consumo constante de glicose e produção de metabólitos — acetona, butanol e etanol. O butanol foi o principal produto, alcançando uma concentração de aproximadamente 8,5 g/L. No entanto, na fermentação com a presença de 1 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico (Figura 4), a fermentação foi inibida, atingindo o objetivo do experimento.

Os resultados dos ensaios com células imobilizadas (com e sem inibidor) ainda estão em fase de análise e serão apresentados no pôster do SicFEI.

4. Conclusões

O maior desafio até agora foi identificar uma composição de suporte que seja adequado ao processo de imobilização, combinando maleabilidade com resistência mecânica. Ao implementar a técnica com os esporos da bactéria, as características do suporte podem sofrer pequenas alterações devido ao cuidado necessário para manter um ambiente estéril e anaeróbico. O próximo passo é garantir que as análises no cromatógrafo de alta eficiência quantifiquem exclusivamente os produtos da atividade metabólica das bactérias imobilizadas.

Com um encapsulamento eficiente, será possível avaliar o impacto dessa técnica na melhoria do rendimento na produção de ABE, especialmente em meios que contêm inibidores.

5. Referências

- [1] BANKAR, S. B. et al. Biobutanol: The outlook of an academic and industrialist. *RSC Advances Royal Society of Chemistry*, 21 dez. 2013.
- [2] KOLESINSKA, B. et al. Butanol Synthesis Routes for Biofuel Production: Trends and Perspectives. *Materials*, v. 12, p. 350–372, 2019.
- [3] SUZANA, C. UDIA S. M. et al. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, v. 12, n. 28, p. 4412–4418, 31 jul. 2013.
- [4] TSAI, T. Y. et al. Biobutanol production from lignocellulosic biomass using immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Energy*, v. 277, 1 nov. 2020.

Agradecimentos

À instituição FEI pelo apoio essencial ao projeto, fornecendo os equipamentos necessários e incentivando o desenvolvimento de projetos inovadores, contribuindo significativamente para a realização deste trabalho.

¹ Aluno de IC do Centro Universitário FEI. Projeto com vigência de 10/2023 a 09/2024.