UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

SURANNY JIMÉNEZ CHACÓN

Desenvolvimento de tecnologia de fermentação para a produção de butanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: integrando imobilização celular e batelada alimentada repetida

CAMPINAS
2020

UNICAMP

SURANNY JIMÉNEZ CHACÓN

Desenvolvimento de tecnologia de fermentação para a produção de butanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: integrando imobilização celular e batelada alimentada repetida

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA SURANNY JIMÉNEZ CHACÓN, E ORIENTADA PELO PROF. DR. ADRIANO PINTO MARIANO.

CAMPINAS
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

J618d

Jiménez Chacón, Suranny, 1984-
Desenvolvimento de tecnologia de fermentação para a produção de butanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana : integrando imobilização celular e batelada alimentada repetida / Suranny Jiménez Chacón.
– Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Adriano Pinto Mariano.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação. 2. Butanol. 3. Hidrolisado. 4. Imobilização. 5. Bagaço de cana. 6. Melaço. I. Mariano, Adriano Pinto, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of fermentation technology for the production of butanol from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate : integrating cell immobilization and repeated fed-batch
Palavras-chave em inglês: Fermentation. Butanol. Hydrolysate. Immobilization. Sugarcane bagasse. Molasses.
Área de concentração: Engenharia Química
Titulação: Doutora em Engenharia Química
Banca examinadora:
Adriano Pinto Mariano [Orientador]
Carlos Eduardo Vaz Rossell
Ariovaldo José da Silva
Jonas Contiero
Marco Antonio Zachia Ayub
Data de defesa: 29-10-2020
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0003-1260-981X
- Currículo Lattes do autor: lattes.cnpq.br/7325668873134410

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado defendida por Suranny Jiménez Chacón em 29 de outubro de 2020 pela banca examinadora constituída pelos doutores.

Prof. Dr. ADRIANO PINTO MARIANO
Presidente e Orientador - FEQ/UNICAMP
Videoconferência

Prof. Dr. CARLOS EDUARDO VAZ ROSSELL
NIPE/UNICAMP
Videoconferência

Prof. Dr. ARIOVALDO JOSÉ DA SILVA
FEAGRI/ UNICAMP
Videoconferência

Prof. Dr. JONAS CONTIERO
Instituto de Biociências de Rio Claro – UNESP
Videoconferência

Prof. Dr. MARCO ANTONIO ZACHIA AYUB
Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos – DTA
Videoconferência

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

.

Dedico este trabalho aos meus pais Inés e Isnardo e ao meu esposo Ramiro, que com amor infinito e incondicional me ajudaram a completar mais esta etapa de minha vida.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Deus, meu guia e protetor, aquele que colocou pessoas em minha vida para me dar a força e certeza que seria capaz de concluir esta etapa de minha vida.

Agradeço também aos meus pais Inés e Isnardo, por seu amor incondicional e esforço para me proporcionar uma boa educação e formação cheia de valores.

À meu esposo Ramiro, que com seu amor e ajuda incondicional não permitiu que eu desistisse perante os obstáculos que surgiram ao longo do percurso e acreditou mais em mim do que eu mesma.

Ao Prof. Dr. Adriano pela oportunidade brindada para a realização deste doutorado em sua orientação, por sua dedicação, paciência infinita e ajuda incondicional, que permitiram a culminação com êxito deste trabalho.

À minha família e meus amigos que permaneceram na Colômbia, que não posso escrever seus nomes por ter a fortuna de serem muitos, mas que mesmo à distância me transmitiram seu carinho e palavras de apoio em todos os momentos. Agradeço também aos meus amigos do Brasil (Angie, Diana, German, Guto, Ivett, Josi, Laidy, Oscar e Paola), que sempre me ofereceram amizade, ajuda e apoio, tanto no nível pessoal como no nível acadêmico. E aos meus vizinhos Sra. Cleide e Sr. Paulo que foram como meus segundos pais aqui no Brasil, sempre cuidando de mim e oferecendo sua amizade incondicional em todos os momento.

À minha IC Gabriela Matias pela ajuda sempre constante no laboratório; aos meus colegas Carla pelo apoio e ajuda no desenvolvimento desde projeto; à Ana Maria por sua dedicação e paciência ao treinar-me no início do doutorado; ao Eduardo pelo apoio moral em momentos de incerteza; e à todos os colegas da FEQ pelo companheirismo, tantos bons momentos juntos e alegre convivência.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão de bolsa de estudos (#152086/2015-3); à Fundação de Amparo ao Estado de São Paulo - FAPESP (esta tese está vinculada ao Projeto Regular 2018/23983-3 "*Rotas para produção de pneus a partir da cana-de-açúcar: conversão eficiente de açúcares em precursores de 1,3-butadieno e avaliação técnico-econômica ambiental*" e ao Projeto Temático 2015/20630-4 "*Desenvolvimento*

integrado de biorrefinaria e planta de bioetanol de cana-de-açúcar com emissão zero de CO_2: rotas para converter recursos renováveis em bioprodutos e bioeletricidade”); ao Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) (CNPEM, Campinas, SP, Brasil) pelo treinamento no início do doutorado em técnicas de fermentação e fornecimento gratuito do hidrolisado hemicelulósico; e à Instituto de Biofabricação (BIOFABRIS/FEQ/UNICAMP) pela produção e fornecimento gratuito das peças 3D.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell, ao Prof. Dr. Ariovaldo José da Silva ao Prof. Dr. Jonas Contiero e ao Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub que muito me honraram com a sua participação e sugestões na banca examinadora da qualificação e posterior defesa de meu doutorado.

Aos desconhecidos que vi uma ou duas vezes, e que mesmo não me conhecendo me deram uma mão amiga nos momentos mais difíceis de minha estadia no Brasil.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho e finalização deste doutorado com êxito.

La vida de un gran científico en el laboratorio no es idílica, como suele creerse, sino que a menudo es una lucha obstinada contra las cosas, contra el entorno y, sobre todo, contra uno mismo. Un gran descubrimiento no surge del cerebro del científico en su forma definitiva, como Minerva nació totalmente armada del cerebro de Júpiter; es fruto de una gran labor preliminar. Las jornadas fecundas de investigación se alternan con días de incertidumbre en los que nada parece salir bien, en los que hasta la materia parece hostil; entonces es necesario no sucumbir al desaliento. Y sin renunciar jamás a su inquebrantable paciencia, Pierre Curie me decía algunas veces: "¡Pero qué dura es la vida que hemos escogido!"

Marie Curie

Resumo

Este projeto de doutorado propôs desenvolver uma tecnologia experimental de fermentação para a produção de butanol a partir da xilose do hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana-de-açúcar não-destoxificado, integrando a imobilização celular (agentes imobilizadores: bagaço de cana-de-açúcar e suporte de poliamida branca 12 produzido via impressão 3D – peças 3D) com operação em batelada alimentada repetida. Na primeira parte, o problema dos inibidores microbianos foi resolvido parcialmente, a fermentação foi iniciada com melaço diluído e alimentada com hidrolisado após 24 h, assim evitou-se que os inibidores interferissem na fase de adaptação do microrganismo. Neste esquema de batelada alimentada por pulso a *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 foi capaz de co-fermentar xilose, sacarose, glicose e frutose em uma fermentação que continha uma proporção de melaço/hidrolisado de 3:1. O rendimento do butanol foi de 0,31 $g \cdot g^{-1}$ e sua concentração de 10,00 $g \cdot L^{-1}$ após 72 h de fermentação. Na segunda parte, avaliou-se a capacidade da linhagem de fermentar melaço diluído diretamente no hidrolisado no esquema de batelada repetida com imobilização celular. A linhagem não foi capaz de fermentar a mistura de hidrolisado e melaço em batelada simples; deste modo, no esquema de batelada repetida (a quantidade do hidrolisado aumenta no meio de fermentação em três etapas), o experimento iniciou com o agente imobilizador e usando como meio melaço diluído na primeira ou duas primeiras bateladas (etapa 1), com o propósito de fortalecer o início do crescimento do microrganismo e a imobilização celular. A batelada seguinte foi realizada no esquema de batelada alimentada por pulso, na proporção de melaço/hidrolisado de 1:3 (etapa 2, introduzindo assim o microrganismo em contato gradual com os inibidores). As bateladas seguintes foram carregadas com melaço diluído diretamente no hidrolisado e suplementado com nutrientes (etapa 3). Os resultados mostraram que utilizando o bagaço, obteve-se na sexta batelada (etapa 3) uma conversão de xilose de 44,68 % e de sacarose de 71,37 %, com rendimento de 0,19 $g \cdot g^{-1}$ e concentração de butanol de 3,90 $g \cdot L^{-1}$ após 360 h de fermentação. Além disso, usando as peças 3D, na quinta batelada (etapa 3) a conversão de xilose e sacarose foi de 37,38 e 81,39 %, respectivamente, com rendimento de 0,22 $g \cdot g^{-1}$ e concentração de butanol de 4,18 $g \cdot L^{-1}$ após 288 h de fermentação. Portanto, os resultados demonstraram que as peças 3D podem ser usadas como um agente imobilizador celular para clostrídios

solventogênicos. No entanto, foi o bagaço que teve melhor desempenho do que a peça 3D nos experimentos em batelada repetida, pois a conversão de xilose média durante a etapa 3 foi de 36 %, no caso da peça 3D foi somente de 16 %. Assim, para a condição testada com bagaço se alcançou uma quantidade de butanol de segunda geração de 41 % do butanol total produzido durante 360 h, mostrando como resultado que a linhagem foi capaz de suportar o estresse do inibidor (não apenas do ácido acético, mas também dos compostos fenólicos) e a fermentação não cessou quando foi desafiada pelas condições da etapa 3.

Palavras-chave: Fermentação, butanol, hidrolisado hemicelulósico, imobilização celular, bagaço de cana, melaço, batelada repetida.

Abstract

This doctoral project proposed to develop an experimental fermentation technology for the production of butanol from xylose of non-detoxified sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates. The project integrates cell immobilization (with two options of immobilization supports: sugarcane bagasse and white polyamide 12 support produced via 3D printing – 3D pieces) with repeated fed-batch operation. In the first part, the microbial inhibitors problem was partially solved. The fermentation was started with diluted molasses and fed with hydrolysate after 24 h and, in consequence, the inhibitors interference was prevented in the adaptation phase of the microorganism. In this pulse-fed scheme, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 was able to co-ferment xylose, sucrose, glucose and fructose in a fermentation that contained a molasses-to-hydrolysate volume ratio of 3:1. The butanol yield was 0.31 $g \cdot g^{-1}$ and its concentration of 10.00 $g \cdot L^{-1}$ after 72 h of fermentation. In the second part, the capacity of strain to ferment diluted molasses directly in the non-detoxified hemicellulose hydrolysate was evaluated in the repeated batch scheme with cell immobilization. The strain was not able to ferment the mixture of hydrolysate and molasses in simple batch; because of this, the experiment in the repeated batch scheme (the amount of non-detoxified hydrolysate in the fermentation broth increases in three stages) began with the immobilizing agent and using diluted molasses in the first or first two batches (stage 1) to strength the beginning of the microorganism's growth and cell immobilization. The next batch was carried out in the pulse-fed scheme (molasses/hydrolyzate ratio) was 1:3 (stage 2, where the microorganism is introduced gradually to get contact with the inhibitors). The following batches were loaded with molasses diluted directly in the crude hydrolysate and supplemented with nutrients (stage 3). The results showed that using sugarcane bagasse as an immobilizing agent, in the sixth batch (stage 3) the conversion of xylose and sucrose were 44.68 % and 71.37 %, respectively, with a butanol yield of 0.19 $g \cdot g^{-1}$ and concentration of 3.90 $g \cdot L^{-1}$ after 360 h of fermentation. Using the 3D pieces, in the fifth batch (stage 3) the conversion of xylose and sucrose were 37.38 % and 81.39 %, respectively, with a butanol yield of 0.22 $g \cdot g^{-1}$ and concentration of 4.18 $g \cdot L^{-1}$ after 288 h of fermentation. Therefore, the results demonstrated that a 3D piece can be used as a cell immobilizing agent for solventogenic clostridia. However, it was the bagasse that had a better performance than the 3D piece in the repeated batch experiments, since the average

xylose conversion during stage 3 was 36 %, while in the case of the 3D piece, it was only 16 %. Thus, for the condition tested with bagasse, 41 % of the total butanol produced during 360 h corresponded to butanol of second-generation, showing as a result that the culture was able to withstand the inhibitor stress (not just the acid acetic, but also of the phenolic compounds) and fermentation did not cease when challenged by the conditions of stage 3.

Keywords: Fermentation, butanol, hemicellulose hydrolysate, cell immobilization, sugarcane bagasse, molasses, repeated-batch.

Lista de Figuras

Figura 1.1. Estratégia de fermentação proposta de batelada alimentada repetida... 23
Figura 2.1. Estrutura molecular (a) e mapa esquemático (b) de Butanol (Jin et al., 2011). 26
Figura 2.2. Principais enzimas e vias metabólicas envolvidas na fermentação ABE pelo *Clostridium* (Moon *et al*. 2016). 29
Figura 2.3. Pré-tratamentos termoquímicos e de hidrólise para a lignocelulose (Bharathiraja *et al*., 2017). 31
Figura 2.4. Métodos de imobilização celular (Kourkoutas *et al*., 2004). 33
Figura 3.1. Modelo da peça 3D selecionada (a); Peça 3D vista frontal (b), vista superior (c) e em frasco vista superior (d); Corpo de prova vista frontal (e) e vista superior (f). 46
Figura 3.2. (a) Bagaço *in natura*, (b), (c) e (d) vista superior de diferentes tentativas de embrulhar o bagaço *in natura*. 47
Figura 3.3. Vista frontal de diferentes tentativas de embrulhar o bagaço *in natura*. . 48
Figura 3.4. Peças 3D e bagaço *in natura* embrulhado na malha de aço inoxidável em frasco. 49
Figura 3.5. Frascos com peça 3D. 49
Figura 3.6. Frascos com e sem imobilização celular. 50
Figura 3.7. Esquema batelada alimenta repetida. 53
Figura 4.1. Concentração de açúcares e butanol durante a fermentação do melaço (60 $g \cdot L^{-1}$). 61
Figura 4.2. Concentração de açúcares, butanol e ácido acético durante a fermentação em batelada alimentada por pulso. 64
Figura 4.3. Tanques de fermentação em uma planta de butanol em função da produtividade do butanol. A planta opera 200 dias por ano durante a safra. ... 67
Figura 4.4. Bagaço *in natura* e Peça 3D. 68
Figura 4.5. Concentração de açúcares, butanol e ácido acético durante a fermentação com imobilização celular. 71
Figura 4.6. Bagaço *in natura* e peça 3D após 72 h de fermentação. 72

Figura 4.7. (a) Corpo de prova e (b) Corpo de prova após 72 h de fermentação. 73
Figura 4.8. Concentração de açúcares, butanol e ácido acético durante a fermentação em batelada alimentada repetida..... 82
Figura A.1. Curvas de crescimento. 101
Figura B.1. Frascos sem imobilização e com peças 3D. 105
Figura B.2. Frascos sem imobilização e com bagaço *in natura*. 106

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Soluções propostas nesta tese de doutorado 21
Tabela 2.1. Estudos experimentais com imobilização celular 37
Tabela 3.1. Experimentos para avaliar a fermentabilidade dos açúcares 42
Tabela 3.2. Bateladas alimentadas por pulso 44
Tabela 3.3. Condições experimentais 54
Tabela 4.1. Caracterização do melaço e hidrolisado hemicelulósico 57
Tabela 4.2. Desempenho do *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 considerando diferentes fontes de carbono. 60
Tabela 4.3. Desempenho das fermentações em batelada alimentada por pulso. 63
Tabela 4.4. Desempenho da imobilização celular considerando diferentes agentes imobilizadores. 70
Tabela 4.5. Desempenho das fermentações em bateladas repetidas com imobilização celular: Bagaço – 1. 76
Tabela 4.6. Desempenho das fermentações em bateladas repetidas com imobilização celular: Bagaço – 2. 77
Tabela 4.7. Desempenho das fermentações em bateladas repetidas com imobilização celular: Bagaço – 3. 78
Tabela 4.8. Desempenho das fermentações em bateladas repetidas com imobilização celular: Peça 3D – 1 79
Tabela 4.9. Desempenho das fermentações em bateladas repetidas com imobilização celular: Peça 3D – 2 80
Tabela A.1. Desempenho do *C. saccharoperbutylacetonicum* DSMZ 2152 (ATCC 27022) considerando diferentes fontes de carbono 102
Tabela A.2. Desempenho do *C. acetobutylicum* DSMZ 792 (ATCC 824) considerando diferentes fontes de carbono. 103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA **18**

1.1. Objetivos *23*

1.1.1. Objetivo geral *23*

1.1.2. Objetivos específicos *23*

1.2. Produção Bibliográfica *24*

2. REVISÃO DA LITERATURA **26**

2.1. Vantagens do butanol *26*

2.2. Fermentação ABE *27*

2.2.1. Fermentação em batelada *27*

2.2.2. Linhagens *28*

2.2.3. Fonte de carbono *30*

2.3. Imobilização celular *32*

2.3.1. Métodos de imobilização *32*

2.3.2. Biofilmes *34*

2.3.3. Agentes imobilizadores *34*

2.3.4. Imobilização celular aplicada em fermentação ABE *35*

3. MATERIAIS E MÉTODOS **40**

3.1. Batelada alimentada por pulso *40*

3.1.1. Matéria-prima *40*

3.1.2. Microrganismo e preparo do inóculo *40*

3.1.3. Preparo de meios para as fermentações *41*

3.1.4. Avaliação da fermentabilidade dos açúcares *42*

3.1.5. Fermentações em batelada alimentada por pulso *43*

3.2. Batelada alimentada repetida com imobilização celular *44*

3.2.1. Agentes imobilizadores *44*

3.2.2. Fermentações com imobilização celular *51*

3.2.3. Fermentações em batelada alimentada repetida *52*

3.3. Métodos analíticos *54*

3.4. Cálculos de conversão, produtividade e rendimento *55*

3.5. Cálculo de tanques de fermentação e custo de compra *56*
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES **57**
4.1. Batelada alimentada por pulso *57*
4.1.1. Melaço e hidrolisado hemicelulósico *57*
4.1.2. Avaliação da fermentabilidade dos açúcares *58*
4.1.3. Fermentações em batelada alimentada por pulso *62*
4.2. Batelada alimentada repetida com imobilização celular *67*
4.2.1. Bagaço de cana e Peça 3D *67*
4.2.2. Fermentações com imobilização celular *69*
4.2.3. Fermentações em batelada alimentada repetida *75*
5. Considerações Finais **86**
5.1. Conclusões *87*
5.2. Sugestões para trabalhos futuros *88*
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **92**
APÊNDICE A – Experimentos complementares **101**
APÊNDICE B – Fermentações com imobilização celular **105**
APÊNDICE C – Permissão para usar o conteúdo do artigo 1 **107**
APÊNDICE D – Permissão para usar o conteúdo do artigo 2 **108**

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Aproximadamente 3 milhões de toneladas de butanol são produzidas por ano para gerar estabilizantes químicos, solventes de tintas, plásticos e polímeros (Mariano *et al*., 2015). Além disso, o butanol pode ser misturado com diesel ou gasolina em proporções elevadas e por ter uma densidade energética maior que a do etanol, é considerado um potencial substituto para este (Qureshi e Ezeji, 2008). Atualmente o butanol é majoritariamente produzido pela via petroquímica (processo oxo a partir do propileno), e a produção por fermentação é limitada, encontrando-se apenas na China, sendo o milho a fonte de açúcares. A baixa competitividade econômica da rota fermentativa está associada aos elevados preços de matérias-primas e deficiências características desta rota, como baixo rendimento e produtividade e ineficiência energética.

Como acontece com o etanol e outros produtos de origem verde, a matéria-prima tem o principal peso na viabilidade econômica destes produtos. Em particular no Brasil, tem-se dado grande ênfase na utilização do bagaço de cana-de-açúcar como estratégia para ampliar a produção de etanol e diminuir custos. Contudo, os açúcares obtidos a partir da hidrólise da fração de hemicelulose do bagaço, que possuem cinco carbonos (p.ex., xilose), não são metabolizados naturalmente por vários microrganismos, incluindo as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* atualmente usadas em usinas de etanol. Sendo assim, uma oportunidade de promover a produção de butanol consiste em associá-lo ao etanol de segunda geração por meio do bagaço de cana-de-açúcar (Mariano *et al*., 2013) e assim melhorar o aproveitamento dos açúcares pela fermentação ABE (acetona/butanol/etanol) por bactérias da classe *Clostridia*. Com isso, a obtenção de butanol utilizaria matéria-prima disponível e, consequentemente, de baixo custo e permitiria uma solução ao uso do hidrolisado hemicelulósico (açúcares C5, principalmente xilose), que não são utilizados no processo do etanol de segunda geração.

A produção de butanol utilizando hidrolisado hemicelulósico apresenta alguns desafios. Por exemplo, a baixa fermentabilidade dos hidrolisados é um problema à viabilidade econômica das biorrefinarias de cana-de-açúcar de segunda geração (Vasconcelos *et al*., 2020). Outro problema são os inibidores de crescimento celular, tais como o ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos,

subprodutos da etapa de pré-tratamento de biomassa do hidrolisado hemicelulósico. O desafio, em relação aos inibidores, é porque eles afetam o desempenho dos microrganismos fermentadores de xilose, como é o caso das bactérias da classe *Clostridia* produtoras de butanol (Baral e Shah, 2014; Su *et al*., 2015; Amiri e Karimi, 2018). Além disso, tal desafio se intensifica devido à corrente de hidrolisado hemicelulósico ser muito diluída (20 – 30 $g \cdot L^{-1}$ xilose), pois aumentam o gasto energético da planta se for concentrada até atingir os níveis de açúcares desejados nos processos fermentativos (40 – 60 $g \cdot L^{-1}$) e em consequência a concentração dos inibidores também aumentaria. Com isso, uma alternativa consiste na utilização do melaço (um subproduto da indústria açucareira) para o aumento da concentração aos níveis desejados da fermentação, principalmente por ser rentável, prontamente disponível e rico em sacarose e nutrientes (Chang *et al*., 2014; Kong *et al*., 2015).

Clostridium saccharoperbutylacetonicum é uma linhagem robusta do tipo selvagem que foi capaz de produzir butanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar sem destoxificação, no entanto, o hidrolisado foi produzido usando uma técnica mais suave de pré-tratamento hidrotérmico seguido de hidrólise diluída por ácido sulfúrico e enriquecido com xilose para alcançar os níveis de açúcares da fermentação (Zetty-Arenas *et al*., 2019). Esta linhagem foi usada também comercialmente em plantas alimentadas com melaço na África do Sul e EUA (Poehlein *et al*., 2017) e tem altos rendimentos de butanol a partir de xilose em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (Magalhães *et al*., 2018; Grassi *et al*., 2018).

A solução ao problema dos inibidores do hidrolisado hemicelulósico, para permitir a produção fermentativa de butanol, tem sido amplamente estudada incluindo técnicas como a adsorção usando resinas de intercâmbio iônico (Ezeji *et al*., 2007) e carvão ativado (Zhang *et al*., 2018; Pratto *et al*., 2020), destoxificação por *overliming* com $Ca(OH)_2$ (Qureshi *et al*., 2008 e 2010; Liu *et al*., 2010; Ranjan e Moholkar, 2013; Plaza *et al*., 2017), nanofiltração (Sun e Liu, 2012), pervaporação (Cai *et al*., 2013), tratamento microbiano (Agu *et al*., 2016) e engenharia genética e metabólica para maior tolerância aos inibidores (Liu *et al*., 2018). No entanto, as técnicas de destoxificação podem resultar em perda de açúcares, geração de resíduos sólidos, como gesso, e sobrecarregar as águas residuais com material inorgânico (Humbird *et al*., 2011). No caso dos microrganismos modificados geneticamente, por serem mais tolerantes aos inibidores, podem não ter o desempenho esperado em escala

industrial. Estes aspectos negativos podem restringir ainda mais as margens de lucro de produtos como o butanol.

Recentemente, Qureshi *et al*., 2018 apresentaram um estudo em que o hidrolisado bruto (não-destoxificado) foi alimentado ao meio livre de inibidores, como hidrolisado celulósico, após ter iniciado a fermentação. No estudo, o biorreator foi alimentado com hidrolisado celulósico de bagaço de sorgo (suplementado com nutrientes de grau reagente) e o hidrolisado hemicelulósico (com níveis tóxicos de ácido acético) foi adicionado após 24 h do início do processo. Desta forma, pela diluição dos compostos tóxicos, foi possível a conversão do hidrolisado em butanol. Outro estudo mostra como o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana foi adicionado após 8 h à um meio mineral suplementado com glicose, peptona e extrato de levedura (Gomes *et al*., 2019). No entanto, a suplementação de nutrientes, mesmo considerando os nutrientes de nível industrial, aumenta o custo de produção e a emissão de carbono. Além disso, o hidrolisado celulósico do bagaço de cana-de-açúcar pode não estar disponível para produção de butanol.

Outra abordagem aplicada para a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos não-destoxificados foi o uso de biorreatores com imobilização celular. Esta abordagem foi utilizada por Li *et al*. (2019) para melhorar a produção de butanol a partir de hidrolisados não-destoxificados de diferentes tipos de biomassas, incluindo o bagaço de cana-de-açúcar. A biomassa foi pré-tratada com ácido diluído e o hidrolisado hemicelulósico tóxico resultante foi usado como a fase aquosa para a hidrólise enzimática da celulose. Os hidrolisados resultantes contendo glicose, xilose e compostos inibidores foram suplementados com licor de maceração de milho e fermentados por *Clostridium tyrobutyricum* Δack-adhE2 (uma linhagem modificada metabolicamente com tolerância melhorada ao butanol) em um biorreator de leito fibroso operado em modo de batelada repetida.

Outros trabalhos mostram que tanto o bagaço de cana (Kong *et al*., 2015) como o de sorgo (Cai *et al*., 2015) quando adicionados ao caldo fermentativo trazem ganhos importantes à fermentação ABE. Em particular na imobilização do tipo passiva, as bactérias se aderem à superfície de um sólido submergido no caldo fermentativo (Chang *et al*., 2014; Kong *et al*., 2015) que além de poder aumentar a produtividade também poderá gerar um biofilme mais robusto aos inibidores, assim como foi observado em fermentações etanólicas com *Zymomonas Mobilis* (Todhanakasem *et*

al., 2014). Esta técnica é relativamente simples e abre a possibilidade do uso de imobilizadores de baixo custo como o bagaço de cana-de-açúcar.

Assim, com o objetivo de solucionar os problemas de custo da matéria-prima e inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico, o principal objetivo desta tese de doutorado foi desenvolver uma tecnologia experimental de fermentação de butanol, a partir do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com imobilização celular (utilizando como suporte bagaço de cana ou poliamida branca 12 - PA 2200 produzido via impressão 3D) integrando um sistema de batelada alimentada repetida. A Tabela 1.1 apresenta os problemas encontrados no processo de fermentação de butanol que são abordados neste projeto e as respectivas soluções propostas.

Tabela 1.1. Soluções propostas nesta tese de doutorado

Problema	Solução proposta	Benefícios
Custo da matéria-prima O custo de produção de butanol por fermentação não é competitivo.	Usar subprodutos de biomassas lignocelulósicas (bagaço de cana-de-açúcar): • Hidrolisado hemicelulósico • Melaço	• Matéria-prima de baixo custo. • Nenhuma competição por matéria-prima com a produção de etanol.
Inibidores do hidrolisado hemicelulósico Os inibidores presentes afetam as bactérias da classe *Clostridia* e interferem na fermentação do butanol.	Alimentar o hidrolisado hemicelulósico no tempo de crescimento exponencial celular (batelada alimentada por pulso).	• Sem a necessidade da etapa custosa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico. • Operação simples.
Volume do hidrolisado hemicelulósico Diluição excessiva do hidrolisado hemicelulósico não-destoxificado.	Aumentar a quantidade do hidrolisado hemicelulósico no meio de fermentação em três etapas no esquema de batelada repetida com imobilização celular em: • Bagaço de cana-de-açúcar Poliamida branca 12 produzido via impressão 3D	• Alta concentração celular. • Maior produtividade. • Agente imobilizador celular de baixo custo. • Possibilidade de ser reutilizado. • Evitar aumentos nos resíduos finais do processo.

Em resumo, a alternativa proposta de batelada alimentada repetida foi dividida em duas partes:

- Na primeira parte avaliou-se a hipótese da capacidade do *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 de converter xilose em butanol, realizando experimentos em batelada alimentada por pulso, considerando diferentes proporções volumétricas de melaço diluído e hidrolisado hemicelulósico bruto.

- Na segunda parte avaliou-se a hipótese da capacidade do *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 de fermentar melaço diluído diretamente no hidrolisado hemicelulósico bruto em um sistema de batelada alimentada repetida com imobilização celular.

A Figura 1.1 mostra o sistema de batelada alimentada repetida com imobilização celular. Na primeira etapa, a fermentação com o agente de imobilização celular foi iniciada com melaço diluído somente em água (40 $g \cdot L^{-1}$), proporcionando assim condições favoráveis ao crescimento e imobilização passiva do microrganismo. Finalizada a primeira batelada foi trocado o meio, sempre mantendo o agente imobilizador entre as trocas. Para a segunda etapa o meio foi trocado por melaço novamente, mas o hidrolisado hemicelulósico em sua totalidade foi alimentado após 24 h [proporção volumétrica de melaço/hidrolisado de 1:3 (M:H) em esquema de batelada alimentada por pulso], no tempo de crescimento exponencial celular, ponto no qual o microrganismo já superou a fase de adaptação e gerou um biofilme mais robusto aos inibidores, evitando que interfiram no início da fermentação e sem a necessidade de etapas custosas de destoxificação. Esta etapa serve como uma etapa de transição para as condições mais desafiadoras da próxima etapa. Na terceira etapa, as bateladas foram carregadas com melaço diluído diretamente no hidrolisado e assim o desafio de fermentar o hidrolisado hemicelulósico foi resolvido, pois no esquema de batelada repetida se evitou a etapa de adaptação do microrganismo (onde o *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 não é capaz de fermentar o hidrolisado) e o melaço permitiu alcançar a concentração desejada para a fermentação sem evaporação do hidrolisado.

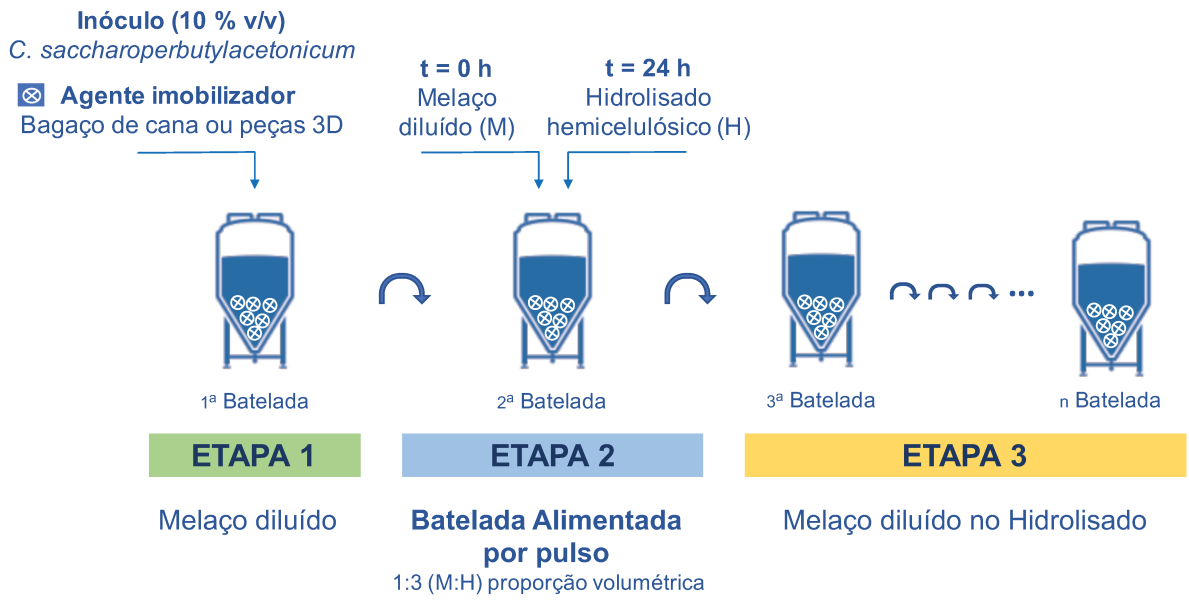


Figura 1.1. Estratégia de fermentação proposta de batelada alimentada repetida.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Desenvolver uma tecnologia de fermentação para a produção de butanol a partir da conversão da xilose do hidrolisado hemicelulósico não-destoxificado de bagaço de cana-de-açúcar, integrando imobilização celular e batelada alimentada repetida.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a capacidade do *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 de converter xilose em butanol a partir de hidrolisado hemicelulósico não-destoxificado de bagaço de cana-de-açúcar.

- Realizar experimentos em diferentes meios (glicose, xilose, melaço e hidrolisado hemicelulósico) em batelada simples para avaliar a fermentabilidade da linhagem.
- Testar diferentes proporções volumétricas entre melaço diluído e

hidrolisado hemicelulósico com operação em batelada alimentada por pulso.

2. Avaliar a capacidade do *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 de fermentar melaço diluído diretamente no hidrolisado hemicelulósico não-destoxificado de bagaço de cana-de-açúcar integrando imobilização celular com operação em batelada alimentada repetida.

- Usar como agentes imobilizadores das células do *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 bagaço de cana-de-açúcar ou suporte de poliamida branca 12 produzido via impressão 3D (peça 3D) com operação em batelada alimentada por pulso (sem repetição).
- Estudar diferentes condições experimentais para a fermentação em batelada alimentada repetida com imobilização celular.

1.2. Produção Bibliográfica

Artigos gerados:

Jiménez-Chacón, S.; Matias, G.; Vieira, C.F.S.; Ezeji, T.C.; Maciel Filho, R.; Mariano, A.P. Enabling butanol production from crude sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by batch-feeding it into molasses fermentation. Artigo publicado na revista: Industrial Crops and Products (referente ao objetivo específico 1).

Jiménez-Chacón, S.; Matias, G.; Ezeji, T.C.; Maciel Filho, R.; Mariano, A.P. Three-stage repeated-batch immobilized cell fermentation for production of butanol from non-detoxified sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates. Artigo publicado na revista: Bioresource Technology (referente ao objetivo específico 2).

Trabalho apresentado em congresso:

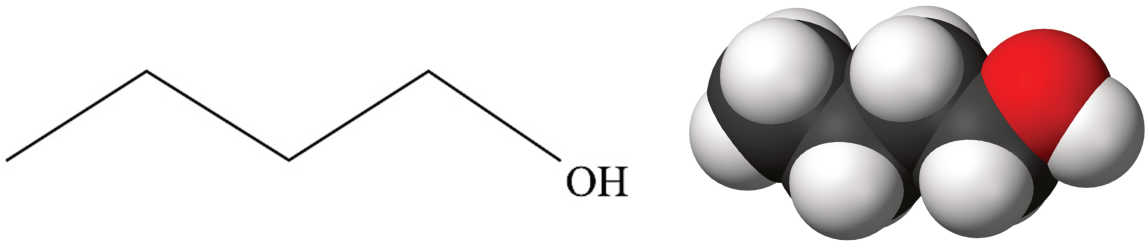
Jiménez-Chacón, S.; Freitas, S.S.; Maciel Filho, R.; Mariano, A.P. Sugarcane

bagasse as carrier for cell immobilization in butanol production from hemicellulose hydrolysate mixed with molasses. 10th World Congresses of Chemical Engineering, 2017.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Vantagens do butanol

O butanol é um álcool de quatro átomos de carbono, que é usado principalmente como matéria-prima na indústria química. Nos últimos anos, o butanol tem sido estudado por seu potencial como biocombustível, pois verificou-se que o petro-butanol (obtido através de combustíveis fósseis) possui propriedades químicas semelhantes ao bio-butanol (gerado pela fermentação de biomassas, o que tornou o processo de produção mais rentável). O biobutanol frequentemente possui em sua configuração o grupo –OH, no carbono terminal de sua cadeia linear, e também é conhecido como n-butanol ou 1-butanol, veja a Figura 2.1 (Jin *et al.*, 2011). Neste trabalho será utilizado simplesmente o nome butanol quando se referir ao biobutanol.



a **b**

Figura 2.1. Estrutura molecular (a) e mapa esquemático (b) de Butanol (Jin et al., 2011).

Entre as vantagens do butanol pode-se encontrar: menor volatilidade, maior poder calorífico e viscosidade, menos problemas de ignição e maior segurança na etapa de distribuição em comparação com o etanol e o metanol. Por exemplo, seu poder calorífico (33,1 $MJ \cdot kg^{-1}$) é maior que o etanol (26,8 $MJ \cdot kg^{-1}$); consequentemente, seu consumo seria menor; sua viscosidade (2,63 $mm^2 \cdot s^{-1}$ à 40 ºC) está na mesma faixa que a viscosidade do diesel (1,9 – 4,1 $mm^2 \cdot s^{-1}$ a 40 ºC). Esta semelhança pode evitar problemas de lubrificação deficiente no uso de motores a diesel (Jin *et al.*, 2011; Kujawska *et al.*, 2015).

Atualmente, a mistura de gasolina e butanol é possível em diferentes

proporções, igual à mistura com diesel, devido à sua miscibilidade total (Mariano *et al*., 2009). Quando uma molécula de álcool apresenta maior quantidade de carbonos será mais fácil misturá-lo com outros combustíveis. Além disso, o teor de oxigênio do butanol tem como consequência uma redução nas emissões de fuligem em comparação ao biodiesel. Outra vantagem do butanol acontece na sua combustão, pois menor temperatura de combustão resulta em maior calor de evaporação, que causa uma redução dos óxidos de nitrogênio.

2.2. Fermentação ABE

Descrita por Louis Pasteur em 1861, a fermentação é um processo bioquímico que ocorre na ausência de oxigênio, onde a matéria-prima (fonte de carbono) é transformada em um novo produto pela ajuda de um microrganismo. Já em 1912, Chaim Weizmann descobriu o *Clostridium acetobutylicum*, microrganismo capaz de produzir acetona, butanol e etanol pela fermentação de açúcares, assim foi conhecido como o pai da fermentação ABE (acetona, butanol e etanol) desde então. Rapidamente foi construída em 1918 a primeira planta comercial de fermentação ABE, utilizando o processo Weizmann, pois durante a Primeira Guerra Mundial existiu uma alta demanda por produção de acetona (necessária como solvente para a produção de explosivos), assim sendo capaz de produzir 3.000 ton de acetona e 6.000 ton de butanol nos dois anos seguintes (Moon *et al*. 2016).

No entanto, a fermentação ABE foi suspensa em 1960 devido ao alto custo dos substratos (Dürre, 1998; Mariano *et al*., 2009). Recentemente, novas tecnologias foram desenvolvidas com o objetivo de produzir butanol por fermentação tentando superar os problemas associados ao processo como baixo rendimento e produtividade, ineficiência energética, alto custo de operação e deficiências características desta rota de produção.

2.2.1. Fermentação em batelada

A produção convencional do butanol tem sido feita em reatores descontínuos. A fermentação por batelada é a tecnologia mais simples e apresenta uma baixa probabilidade de contaminação. O processo raramente excede 0,5 – 0,6 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$

(fermentação lenta), a proporção de acetona, butanol e etanol é 3, 6 e 1, respectivamente, e a recuperação dos produtos é por destilação (Mariano *et al*., 2015). A baixa produtividade do processo é causada pela toxicidade do butanol ao microrganismo, necessitando de grandes reatores, tornando-o economicamente inviável. As fontes de carbono, como melaço e amido, são as mais usadas nesta tecnologia, pois podem atingir rendimentos de 30 a 32 % e concentração de butanol de aproximadamente 10 a 15 $g \cdot L^{-1}$ (Raganati *et al*., 2016).

2.2.2. Linhagens

Alguns microrganismos produtores de etanol não são capazes de metabolizar açúcares com cinco carbonos (pentoses) derivadas da hemicelulose tão efetivamente quanto as hexoses, fato que não acontece com as linhagens do gênero *Clostridium* produtoras de butanol que conseguem fermentar estes açúcares (Amiri e Karimi, 2018). Nesta perspectiva encontrar um microrganismo mais tolerante à toxicidade do butanol mas também à toxidade dos inibidores que se encontram na matéria-prima tem sido o objetivo de vários estudos sobre linhagens utilizadas na fermentação, além de melhorar a produção de butanol e fazer um uso completo dos açúcares desta matéria-prima. Normalmente, as *Clostridium* produzem acetona e butanol quando são envolvidas no processo de fermentação, seguidos por etanol, em menor quantidade (Conceição *et al*., 2019). Por meio de duas etapas são gerados os solventes (acetona, butanol e etanol). Na primeira etapa, conhecida como fase acidogênica, os açúcares são consumidos para produzir ácidos orgânicos, ácido butírico e ácido acético, além do etanol, dióxido de carbono e hidrogênio. Na segunda etapa as *Clostridium* mudam seu metabolismo, fase solventogênica, e os ácidos previamente gerados diminuem o pH do meio de fermentação e assim estes são convertidos nos solventes (Wang *et al*., 2018). Na Figura 2.2 estão apresentadas as principais enzimas e vias metabólicas envolvidas na fermentação ABE pelo *Clostridium*, em caixas de cor preta estão os principais produtos da fase solventogênica e em caixas de cor cinza os principais produtos da fase acidogênica (Moon *et al*. 2016).

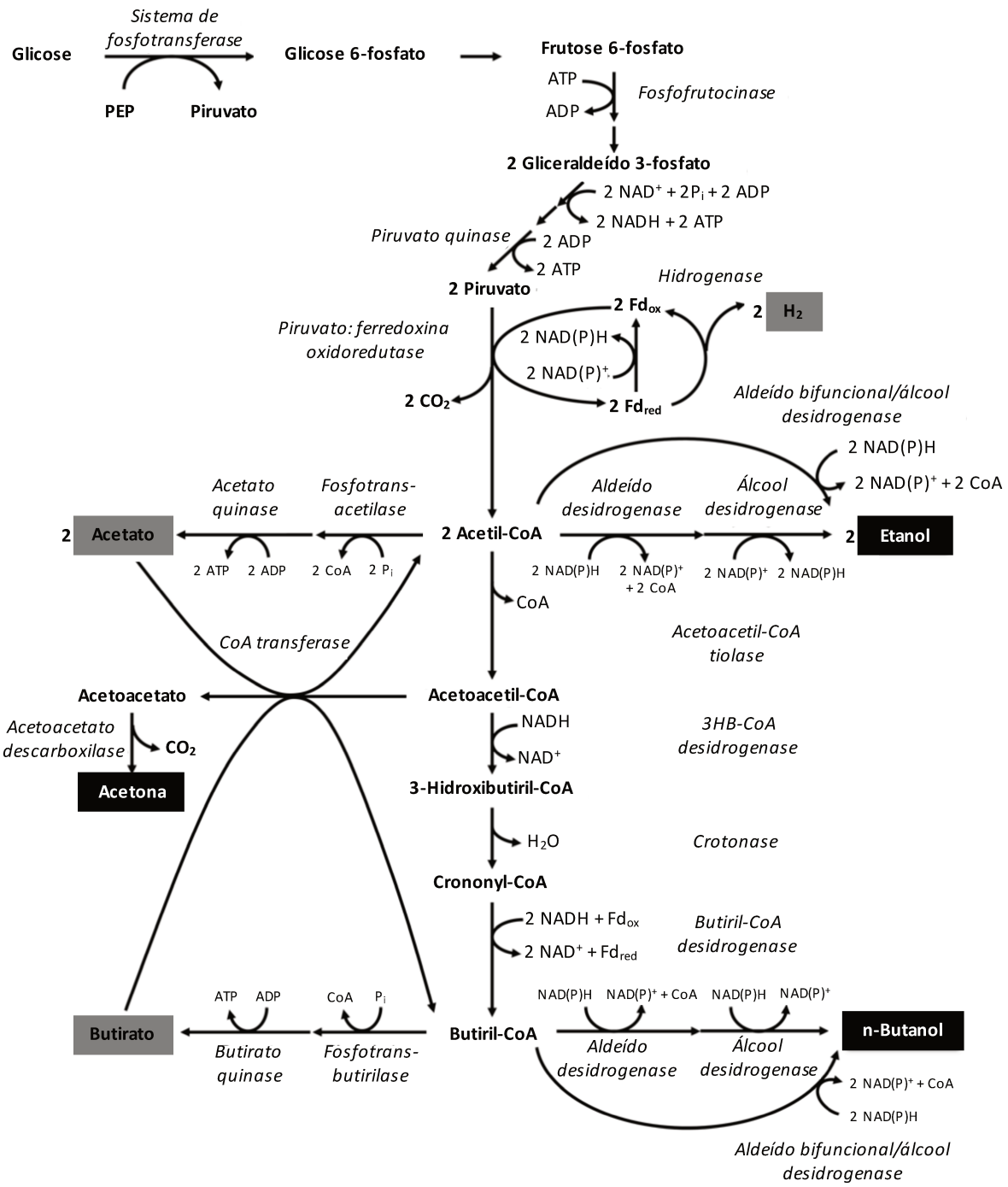


Figura 2.2. Principais enzimas e vias metabólicas envolvidas na fermentação ABE pelo *Clostridium* (Moon *et al*. 2016).

Entre as linhagens das espécies *C. acetobutylicum, C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* e *C. saccharoperbutylacetonicum* usadas em fermentações ABE, a *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (DSM 14923 ou ATCC 27021) se destaca pois produz níveis altos de solventes e apresenta outras importantes características como

maior tolerância a inibidores presentes em hidrolisados e fermenta glicose, sacarose, xilose, frutose, arabinose, celobiose e manose de forma eficiente (Yao *et al*., 2017; Wang *et al*., 2018). Em alguns casos, o microrganismo desdobra as moléculas de sacarose e celobiose em outras duas menores: glicose e frutose, para assim serem fermentadas.

2.2.3. Fonte de carbono

Um dos principais problemas da fermentação ABE é o custo do substrato ou da fonte de carbono (matéria-prima). Este custo representa em grande parte o valor final do butanol (Jin *et al*., 2011). Portanto, para ajudar a viabilidade econômica da fermentação, uma alternativa é usar biomassas lignocelulósicas como fonte de carbono. As biomassas são um recurso natural, renovável e sustentável. Estes são consideravelmente mais abundantes que o açúcar e o amido (Fischer *et al*., 2008). Pesquisas sugerem que a seleção de biomassas lignocelulósicas para a produção de butanol por fermentação é possível e os gases de efeito estufa emitidos pelos biocombustíveis obtidos por estas biomassas são menores do que os gerados por biocombustíveis a partir de milho (Jang *et al*., 2012). Nos países onde a plantação de cultivos energéticos poderia ser problemática, as biomassas lignocelulósicas são uma oportunidade para a geração de biocombustíveis de segunda geração. É o caso de países como Brasil, China, Colômbia, Estados Unidos e Índia que são produtores de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), e onde o bagaço de cana é uma fonte de açúcares para produzir combustíveis de segunda geração e produtos químicos como o butanol (Mariano *et al*., 2013). No planeta, 27 % da produção mundial de cana-de-açúcar corresponde ao Brasil (Balat e Balat, 2009). Neste caso, o uso de biomassa lignocelulósica pode ser uma boa oportunidade para o Brasil.

A lignocelulose é o principal componente da biomassa lignocelulósica e está constituído por lignina (15-20%), celulose (40-50%), hemicelulose (25-30%) e outros componentes. Estas porcentagens são uma aproximação, pois variam de acordo com cada biomassa (Balat *et al*., 2009). No caso do bagaço de cana, corresponde à 15-25% de lignina, 25-45% de celulose e 28-32% de hemicelulose. A lignina é composta por unidades de fenilpropano; a celulose é integrada por unidades D-glucopiranosil e a hemicelulose é uma combinação de resíduos de açúcar (hexose e pentose) que

podem ter grupos acetil (Jönsson *et al*., 2013). No entanto, é necessário submeter a biomassa à um pré-tratamento e hidrólise para separar a hemicelulose e a celulose da lignina, com o objetivo de facilitar a fermentação e separar os principais açúcares (Bharathiraja *et al*., 2017). A Figura 2.3 apresenta os pré-tratamentos termoquímicos e de hidrólise para o uso da lignocelulose e seus possíveis produtos.

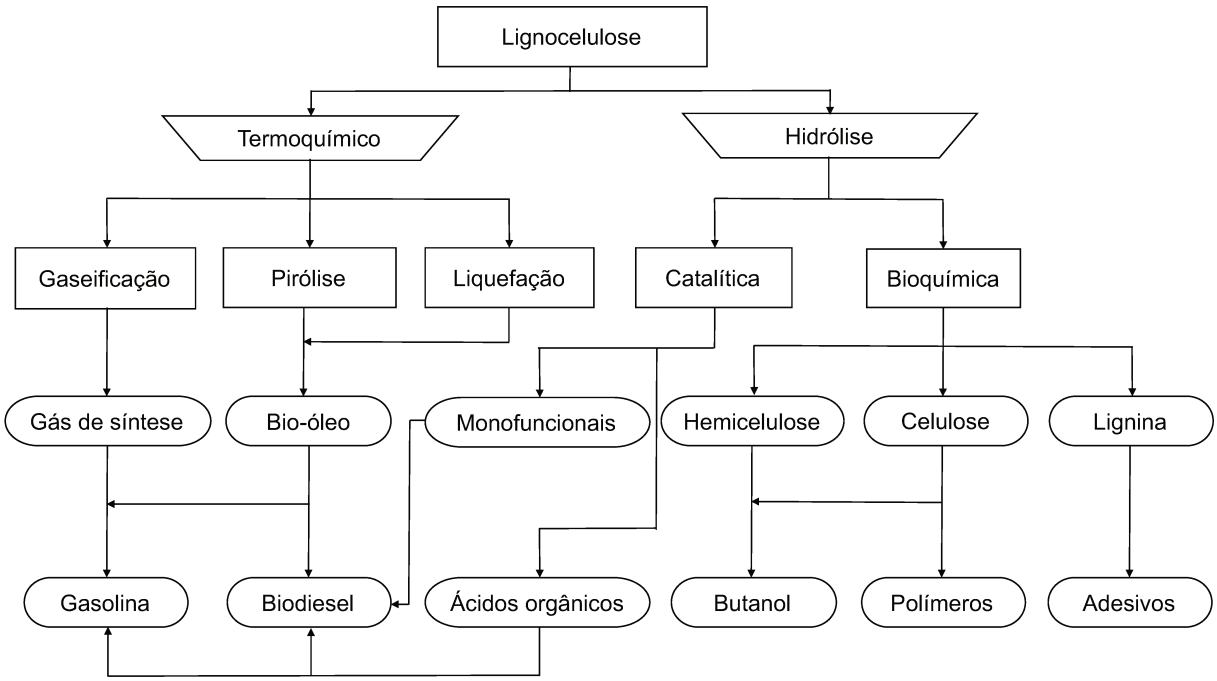


Figura 2.3. Pré-tratamentos termoquímicos e de hidrólise para a lignocelulose (Bharathiraja *et al*., 2017).

Como indicado anteriormente as biomassas lignocelulósicas são uma alternativa para a produção de biocombustíveis. De acordo com o tipo de biomassa, a hidrólise enzimática e as condições do pré-tratamento diversos açúcares simples são gerados em diferentes quantidades (Yao *et al*., 2017). A glicose e xilose são os principais açúcares presentes nos hidrolisados e seu aproveitamento total nas biorrefinarias é fundamental para tornar os biocombustíveis competitivos economicamente (Amiri e Karimi, 2018; Li *et al*., 2019). No entanto, os hidrolisados apresentam compostos que inibem o crescimento e a fermentação celular, gerados na hidrólise enzimática e pré-tratamentos térmicos, físicos ou químicos (Amiri e Karimi, 2018). A solução ao problema dos inibidores, tais como o ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, e compostos fenólicos, tem sido amplamente estudada com técnicas como a adsorção

usando resinas de intercâmbio iônico (Ezeji *et al*., 2007) e carvão ativado (Zhang *et al*., 2018; Pratto *et al*., 2020), destoxificação por *overliming* com $Ca(OH)_2$ (Qureshi *et al*., 2008 e 2010; Liu *et al*., 2010; Ranjan e Moholkar, 2013; Plaza *et al*., 2017), nanofiltração (Sun e Liu, 2012), pervaporação (Cai *et al*., 2013), tratamento microbiano (Agu *et al*., 2016) e engenharia genética e metabólica para maior tolerância aos inibidores (Liu *et al*., 2018).

2.3. Imobilização celular

A imobilização celular foi definida como "o confinamento físico ou a localização de células intactas em uma certa região do espaço com preservação de uma atividade catalítica desejada" (Karel *et al*., 1985) e imita o que ocorre naturalmente com os microrganismos quando crescem em diferentes superfícies ou estruturas naturais (Kourkoutas *et al*., 2004).

2.3.1. Métodos de imobilização

Os métodos de imobilização foram divididos por Kourkoutas *et al*., 2004 em quatro categorias principais (Figura 2.4), baseadas no mecanismo físico aplicado:

- Imobilização na superfície de um sólido (absorção passiva): a imobilização celular é realizada por absorção física de forma natural por meio das forças eletrostáticas ou por ligações covalentes entre a membrana celular e a superfície sólida (portador ou suporte).
- Aprisionamento dentro de uma matriz porosa: os métodos de aprisionamento colocam as células em uma rede primária para impedir sua difusão no meio circundante.
- Floculação celular (agregação): a agregação é um grupo de células microbianas aglutinadas que compõem uma unidade maior, mas não em forma de cadeia (Jin e Speers, 1998). Agentes de floculação artificial ou reticuladores são usados para melhorar a agregação em culturas de células que não floculam naturalmente.
- Contenção mecânica atrás de uma barreira: a contenção é alcançada por

meio de filtros de membrana microporosa, microcápsulas ou por imobilização celular na superfície de dois líquidos imiscíveis.

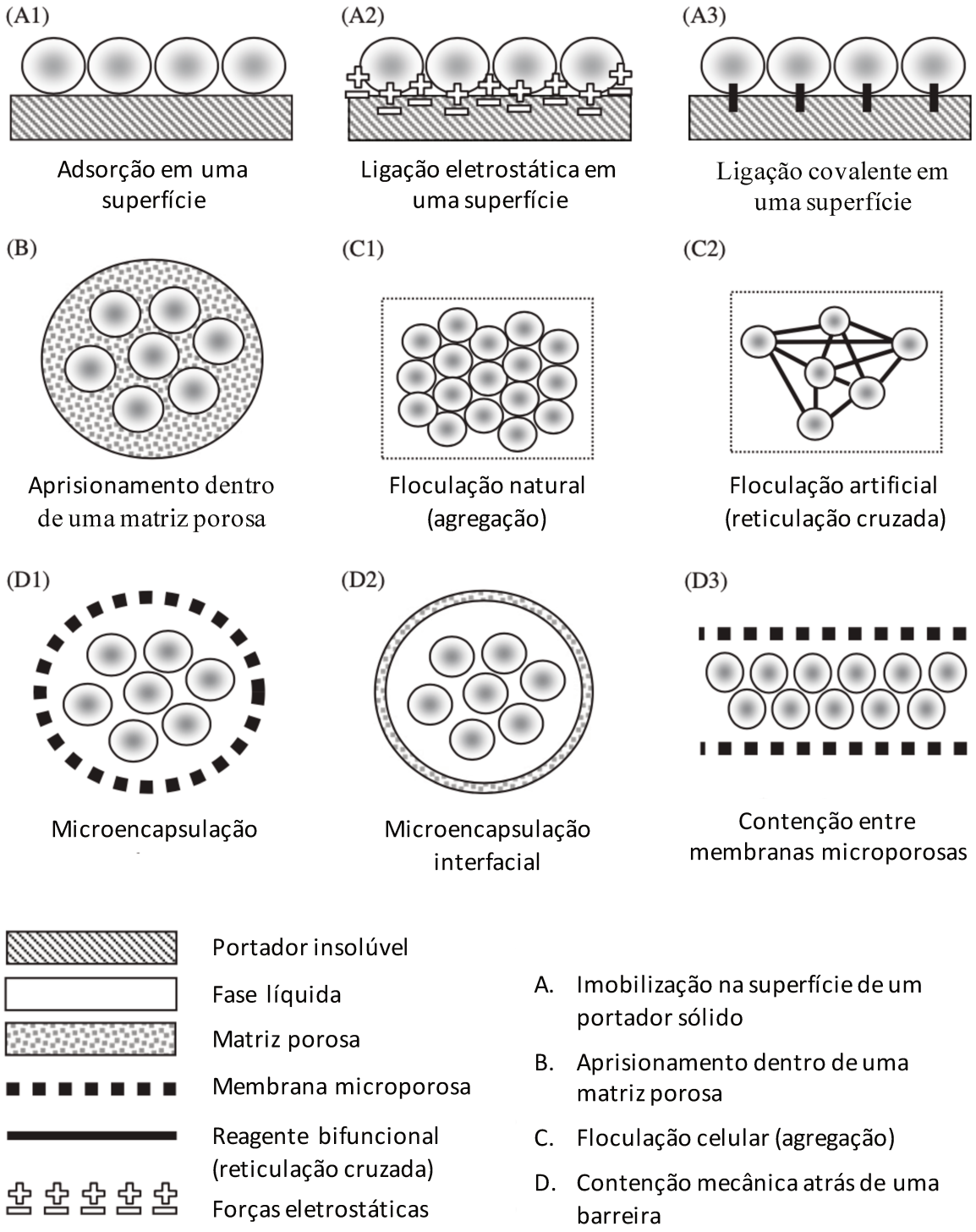


Figura 2.4. Métodos de imobilização celular (Kourkoutas *et al.*, 2004).

2.3.2. Biofilmes

A imobilização celular por absorção passiva tem sido amplamente estudada na literatura, onde de forma natural as células se absorvem ou aderem ao suporte, pois consiste-se em um processo simples e econômico para a produção de butanol, etanol, ácido acético, ácido lático, além de ser usado em outras aplicações como no tratamento de águas residuais em reatores de biofilme (Qureshi *et al*., 2005). As células formam camadas no suporte, de maneira que a massa celular ao longo do tempo forma flocos ou agregados; este processo varia de 2 - 3 dias até semanas, dependendo do microrganismo, reator ou suporte. Estas camadas espessas de células são chamadas de "biofilmes".

O biofilme é uma estrutura tridimensional heterogênea e complexa, revestida com uma substância polimérica extracelular (EPS, sua sigla em inglês) similar à uma barreira protetora, quando é exposto à um ambiente hostil, as células localizadas em regiões distintas do biofilme apresentam diferentes níveis de desempenho, por exemplo, células com níveis de tolerância mais altos capazes de sobreviver em sistemas de crescimento contínuo (Zhuang *et al*., 2016).

2.3.3. Agentes imobilizadores

Materiais lignocelulósicos (conhecidos também como materiais orgânicos) como fibras de coco, resíduos de sabugo de milho, caule de milho, cavacos de madeira, palha, serragem e casca de arroz têm sido utilizados como suporte para imobilização celular (Yu *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2009; Liu *et al*., 2019). Uma vantagem importante que promove o uso de materiais lignocelulósicos como imobilizadores celulares é a possibilidade de serem reutilizados em diferentes processos de produção, evitando assim aumentos nos resíduos finais do processo (Zhang *et al*., 2009). Yu *et al*., (2007) utilizaram bagaço de sorgo para imobilizar *Saccharomyces cerevisiae* e mostraram como vantagem que a transmissão de produtos e substratos entre transportadores e meios pode ser melhorada. Segundo os autores, tal vantagem pode ajudar a resolver o problema de transferência de massa, comum em sistemas onde são utilizados palha e alginato de cálcio.

Com o propósito de evitar os problemas por inibição dos solventes e aprimorar

a produtividade da fermentação ABE estudos com imobilização celular têm sido realizados para melhorar a robustez das bactérias da classe *Clostridia* (Chang *et al*., 2014). O estudo de diferentes materiais lignocelulósicos mostra como os microrganismos da classe *Clostridia* preferiam os materiais lignocelulosicos à outros agentes imobilizadores, adicionalmente o uso destes materiais é mais rentável economicamente ao processo (Cai *et al*., 2016). Além disso, a imobilização pode ser do tipo passiva, as células se aderem à superfície do sólido submergido no caldo fermentativo (Chang *et al*., 2014; Kong *et al*., 2015). Esta técnica é relativamente simples e abre a possibilidade do uso de imobilizadores de baixo custo como o bagaço de cana. Pesquisas mostram que tanto o bagaço de cana (Kong *et al*., 2015; Liu *et al*., 2019) como o de sorgo (Cai *et al*., 2015) quando adicionados ao caldo fermentativo trazem ganhos importantes de produtividade à fermentação ABE.

O uso destes materiais lignocelulósicos como suportes para imobilização celular é uma opção estável, econômica e com boas propriedades superficiais (área superficial e estrutura dos poros), no entanto são biodegradáveis (Zajkoska *et al*., 2013). Uma solução para este problema são os materiais poliméricos (orgânicos e inorgânicos) e cerâmicos como montmorillonita, paligorsquite, vidro ou porcelana porosa, cerâmica de tijolo, nylon poroso, carvão, nanotubos de carbono, polímeros sintéticos como polietileno clorado de carvão ativado, poliuretano, álcool polivinílico e poliacrilamida que também têm sido usados como veículos de imobilização em diferentes trabalhos (Kourkoutas *et al*., 2004; Yen *et al*., 2011; Zajkoska *et al*., 2013; Liu *et al*., 2019).

2.3.4. Imobilização celular aplicada em fermentação ABE

A aplicação de tecnologias de imobilização celular em processos fermentativos traz como vantagens o aumento da densidade celular gerando maior produtividade e melhores rendimentos, diminui os custos operacionais, os tempos de fermentação e os riscos de contaminação (Zhuang *et al*., 2017). Além disso, as tecnologias com imobilização são melhores quando comparadas aos processos de células livres, pois abrem a possibilidade de realizar um processo contínuo (Chen *et al*., 2013). Neste aspecto evita-se a etapa de inoculação e por conseguinte a fase de adaptação do microrganismo, tornando a operação mais eficiente (Jiang *et al*., 2009; Dolejs *et al*.,

2014).

Em contraste, a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos sem destoxificação para produzir butanol foi possibilitada por soluções que eram baseadas no uso de biorreatores com imobilização celular ou na alteração da forma como a fermentação de células livres era operada de batelada para batelada alimentada por pulso. A primeira abordagem foi utilizada para melhorar a produção de butanol a partir de hidrolisados não-destoxificados de diferentes tipos de biomassas, incluindo o bagaço de cana-de-açúcar (Li *et al*., 2019). A biomassa foi pré-tratada com ácido diluído e o hidrolisado hemicelulósico tóxico resultante foi usado como a fase aquosa para a hidrólise enzimática da celulose. Os hidrolisados resultantes contendo glicose, xilose e compostos inibidores foram suplementados com licor de maceração de milho e fermentados por *Clostridium tyrobutyricum* Δack-adhE2 (uma linhagem modificada metabolicamente, mais tolerante ao butanol) em um biorreator de leito fibroso operado em modo de batelada repetida. Embora a xilose tenha sido utilizada em uma extensão muito menor do que a glicose, os autores Li *et al*., 2019 concluíram que a produção de butanol melhorou em comparação com o cultivo de células livres porque as células imobilizadas foram mais tolerantes aos inibidores de butanol e hidrolisado. Usando a segunda abordagem, o cultivo de células livres de *Clostridium beijerinckii* P260 foi conduzido por 24 h em um hidrolisado celulósico de bagaço de sorgo atóxico e, em seguida, um hidrolisado de hemicelulósico sem destoxificação (contendo níveis tóxicos de ácido acético) foi alimentado para a fermentação. A estratégia de batelada alimentada por pulso permitiu que a cultura utilizasse ambos hidrolisados para produzir butanol (Qureshi *et al*., 2018).

A Tabela 2.1 apresenta alguns trabalhos de imobilização celular aplicada em processos de fermentação ABE.

Tabela 2.1. Estudos experimentais com imobilização celular

Referência	Condições experimentais	Principais conclusões
Yu *et al.*, (2007)	• Tipo de fermentação: Batelada • Produto: Etanol • Fonte de carbono: Glicose e sacarose • Suporte: Bagaço de sorgo doce • Microrganismo: *Saccharomyces cerevisiae* 3013	• A microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou a adsorção de células de *S. cerevisiae* ao bagaço de sorgo doce. • Na fermentação o etanol alcançou uma produtividade de 16,68 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$.
Yen *et al.*, (2011)	• Tipo de fermentação: Contínua • Produto: ABE • Fonte de carbono: Glicose • Suporte: Tijolos • Microrganismo: *Clostridium acetobutylicum* BCRC 10639	• A concentração de ABE foi de 14,3 $g \cdot L^{-1}$ com um rendimento de 0,24 $g \cdot g^{-1}$ de solventes finais. • O processo de fermentação durou mais de 500 h, tempo no qual o microrganismo imobilizado produziu todos os solventes. • Os tijolos e o método de imobilização (adsorção passiva) apresentaram baixos custos ao processo, além de não mostrar limitações na transferência de nutrientes.
Survase *et al.*, (2012)	• Tipo de fermentação: Contínua • Produto: ABE • Fonte de carbono: Glicose e mistura de açucares: glicose, manose, galactose, arabinose e xilose (comparável a um hidrolisado hemicelulósico) • Suporte: Polpa de madeira • Microrganismo: *Clostridium acetobutylicum* DSM 792	• A produtividade ABE com glicose alcançou 13,66 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, enquanto para a mistura de açucares foi de 12,14 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$. • A imobilização celular por adsorção permite um contato direto entre as células imobilizadas e os nutrientes, evitando problemas de difusão, além de melhorar a eficiência do processo.
Chen *et al.*, (2013)	• Tipo de fermentação: Batelada repetida • Produto: ABE • Fonte de carbono: Glicose e xilose • Suporte: Toalhas de algodão pré-tratadas • Microrganismo: *Clostridium acetobutylicum* CGMCC 5234	• Os experimentos com imobilização celular mostraram maior consumo de açúcares e melhor tolerância à toxicidade do butanol do que os experimentos com células livres. • Se alcançou, com uma carga de xilose inicial de 60 $g \cdot L^{-1}$, uma concentração de butanol

Tabela 2.1 (cont.). Estudos experimentais com imobilização celular.

Referência	Condições experimentais	Principais conclusões
		de 9,09 $g \cdot L^{-1}$ e um rendimento de 0,241 $g \cdot g^{-1}$ em média para 8 bateladas (551 h) com imobilização celular. • Os experimentos com glicose mostraram melhores resultados na produção de butanol do que nos com xilose, com cargas de açúcares maiores a 60 $g \cdot L^{-1}$, mas quando a concentração foi menor essas vantagens foram perdidas.
Chang *et al*., (2014)	• Tipo de fermentação: Batelada • Produto: ABE • Fonte de carbono: Glicose • Suporte: Bagaço de sorgo doce • Microrganismo: *Clostridium acetobutylicum* ABE 1201	• Assim como no trabalho de Yu *et al*. (2007) se revelou a adsorção de células pela MEV. • A produtividade ABE foi de 0,37 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$. • O rendimento ABE foi de 0,41 $g \cdot g^{-1}$, 68 % melhor em relação às células livres (24 %).
Cai *et al*., (2015)	• Tipo de fermentação: Batelada alimentada • Produto: ABE • Fonte de carbono: Glicose • Suporte: Bagaço de sorgo doce • Microrganismo: *Clostridium acetobutylicum* ABE 1201	• A concentração de ABE foi de 180 $g \cdot L^{-1}$ e sua produtividade de 1,15 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ no condensado, aplicando recuperação contínua de produto *in-situ* (*gas stripping*). • O estudo demonstra melhorias na produtividade do butanol resultado da imobilização celular em combinação com a recuperação do produto *in-situ*.
Sita *et al*., (2016)	• Tipo de fermentação: Batelada • Produto: Etanol • Fonte de carbono: Glicose • Suporte: Bagaço de cana • Microrganismo: *Saccharomyces cerevisiae* 3013	• A imobilização celular com bagaço de cana foi possível. As células se colocaram nos poros do bagaço e formaram colônias de forma que a superfície foi coberta por *S. cerevisiae*. Além disso, se evidenciou produção de etanol. • O rendimento médio do etanol em 24 h de fermentação com

Tabela 2.1 (cont.). Estudos experimentais com imobilização celular.

Referência	Condições experimentais	Principais conclusões
		células imobilizadas foi de 0,4 $g \cdot g^{-1}$, três vezes maior do que no sistema de células livres (0,1 $g \cdot g^{-1}$), para uma carga inicial de glicose de 63 $g \cdot L^{-1}$.
Zhuang *et al.*, (2017)	• Tipo de fermentação: Batelada repetida/alimentada • Produto: ABE • Fonte de carbono: Glicose • Suporte: Linho, fibra de bambu, algodão e seda • Microrganismo: *Clostridium acetobutylicum* CGMCC 5234	• O linho apresentou a melhor conversão de glicose em butanol e produziu maiores concentrações médias de butanol (9,97 $g \cdot L^{-1}$ em comparação com 8,45 $g \cdot L^{-1}$ para fibra de bambu, 8,49 $g \cdot L^{-1}$ para algodão e 5,38 $g \cdot L^{-1}$ para seda) e produtividades (0,209 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ em comparação com 0,177 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ para fibra de bambu, 0,178 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ para algodão e 0,114 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ para seda). • O linho foi considerado como o melhor suporte após cinco bateladas alimentadas, cada uma de 36 h (linho e algodão) e 48 h (fibra de bambu e seda).
Li *et al.*, (2019)	• Tipo de fermentação: Batelada repetida • Produto: Butanol • Fonte de carbono: Glicose e xilose (hidrolisado hemicelulósico de fibra de milho, pedúnculo de algodão, bagaço de cana e casca de soja). Os hidrolisados foram evaporação para aumentar sua concentração (3x) • Suporte: Biorreator de leito fibroso • Microrganismo: *Clostridium tyrobutyricum* CtΔack-adhE2	• A fermentação foi estável para operação uma longa (9 ciclos) sem degeneração perceptível, demonstrando seu potencial para aplicação industrial. • A concentração de butanol foi de ~15 $g \cdot L^{-1}$ com um rendimento de ~0,3 $g \cdot g^{-1}$ de solventes e produtividade de ~0,3 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ correspondente aos hidrolisados de pedúnculo de algodão, bagaço de cana e casca de soja. • O hidrolisado de fibra de milho tem maior conteúdo de inibidores, assim seus resultados foram menores do que outros hidrolisados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No APÊNDICE A – EXPERIMENTOS COMPLEMENTARES estão descritos alguns dos experimentos planejados e realizados que precederam os descritos a seguir.

3.1. Batelada alimentada por pulso

3.1.1. Matéria-prima

O melaço e o bagaço de cana foram adquiridos da Usina Ester localizada em Cosmópolis, SP, Brasil. O melaço continha 629,2 $g \cdot L^{-1}$ de açúcares redutores totais - ART ($g \cdot L^{-1}$, 449,9 sacarose, 86,9 glicose e 68,7 frutose).

O hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (licor C5) foi produzido na planta piloto no Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) (CNPEM, Campinas, SP, Brasil). Para tal, o bagaço de cana-de-açúcar (20 kg seco) foi submetido à pré-tratamento ácido com 200 L de H_2SO_4 diluído (0,5 % v/v) a 145 °C por 12 min em um reator Hastelloy C-276 de 350 L (POPE Scientific Inc., Saukville, EUA). O hidrolisado continha 29,8 $g \cdot L^{-1}$ de açúcares ($g \cdot L^{-1}$, 23,3 xilose e 6,5 glicose) e seu pH foi ajustado de 1,5 a 6,5 usando pellets de NaOH antes da fermentação.

3.1.2. Microrganismo e preparo do inóculo

Foi usada a linhagem *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 (N1-4), para a produção de butanol, adquirida da “German Collection of Microorganism and Cell Culture” (DSMZ). Soluções estoques da cultura foram mantidas como suspensões celulares em solução de glicerol (40 % v/v) armazenadas em criotubos de 2 mL mantidos à -80 °C.

O pré-inóculo e o inóculo foram preparados em meio TGY (Triptona – Glicose – Extrato de Levedura), contendo ($g \cdot L^{-1}$): triptona 30, glicose 20, extrato de levedura 10 e L-cisteína 1.

Para preparar o pre-inóculo, a suspensão de células foi inoculada (400 μL) em 10 mL de meio TGY (pré-esterilizado e anóxico) e incubado em câmara de anaerobiose (Coy Laboratory Products Inc.) por 20 h a 30 °C. As células foram transferidas para 90 mL de meio TGY e cultivadas nas mesmas condições por 6 h (inóculo da fermentação), durante as quais a densidade óptica das células a 600 nm atingiu 1,3 – 1,5 (espectrofotômetro Agilent Cary 60 UV-Vis, G6860A).

As matérias-primas e meios utilizados neste trabalho foram esterilizados em autoclave a uma temperatura de 121 °C (103 kPa) e por um período de 15 min para posteriormente começar as fermentações. No caso dos meios de suplementação nutricional (meio P2) a esterilização foi feita por filtração (filtro de 0,22 μm).

3.1.3. Preparo de meios para as fermentações

As fermentações foram realizadas em triplicata em frascos *Schott* de 250 mL (volume de trabalho de 100 – 200 mL) a 30 °C incubados por 72 h em câmara de anaerobiose. O meio de fermentação foi esterilizado em autoclave seguido de resfriamento e inoculação (10 % v/v).

O melaço foi usado sem nenhum tratamento prévio e foi diluído diretamente em água ou hidrolisado hemicelulósico, dependendo das condições exigidas no experimento.

Nas fermentações em que houve suplementação nutricional (meio P2), foram adicionados ao meio 1 $g \cdot L^{-1}$ de extrato de levedura e as três soluções seguintes na proporção 1 % (v/v):

- Solução tampão ($g \cdot L^{-1}$, 50 KH_2PO_4, 50 K_2HPO_4, e 220 CH_3COONH_4).
- Solução de minerais ($g \cdot L^{-1}$, 20 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 $MnSO_4 \cdot H_2O$ e 1 NaCl).
- Solução de vitaminas ($g \cdot L^{-1}$, 0,1 tiamina, 0,1 ácido p-aminobenzoico e 0,01 biotina).

3.1.4. Avaliação da fermentabilidade dos açúcares

Os testes apresentados na Tabela 3.1 foram projetados para avaliar a fermentabilidade dos açúcares pela linhagem *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923.

Tabela 3.1. Experimentos para avaliar a fermentabilidade dos açúcares

Fermentação	Fonte de carbono	Concentração ($g \cdot L^{-1}$)	Suplementação nutricional (meio P2)
G-P2	Glicose	60	Adição de nutrientes
X-P2	Xilose	60	Adição de nutrientes
M-40	Melaço	40	-
M-40-P2	Melaço	40	Adição de nutrientes
M-60	Melaço	60	-
M-60-P2	Melaço	60	Adição de nutrientes
M+C5-40	Melaço + Hidrolisado hemicelulósico	40	Adição de nutrientes
M+C5-O-40	Melaço + Hidrolisado hemicelulósico destoxificado por *overliming*	40	Adição de nutrientes
C5-P2	Hidrolisado hemicelulósico	20	Adição de nutrientes
C5-O-P2	Hidrolisado hemicelulósico destoxificado por *overliming*	20	Adição de nutrientes

Os experimentos foram realizados com um volume de trabalho de 150 mL e em câmara de anaerobiose. Usou-se meios com glicose, xilose, melaço puro e melaço com adição dos nutrientes do meio P2. As fermentações de melaço diluído possuíam uma quantidade inicial de açúcares de 40 e 60 $g \cdot L^{-1}$ com ou sem adição de suplementação nutricional (meio P2). Por fim, analisou-se a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico sem utilizar o procedimento de concentração por evaporação, de modo que foi inoculado na sua forma bruta, em alguns experimentos foi ajustado seu pH para 6,5 com pellets de NaOH e em outros foi destoxificado por

overliming com $Ca(OH)_2$ (Quereshi *et al.*, 2010) e posteriormente suplementado com nutrientes (meio P2).

3.1.5. Fermentações em batelada alimentada por pulso

Os experimentos em batelada alimentada por pulso com diferentes proporções volumétricas foram realizados também em câmara anaeróbia, no entanto conduzidos com um volume total de 200 mL (cada proporção selecionada foi ajustada a esse volume final, ver Tabela 3.2). Os dois componentes do meio de fermentação, melaço diluído e hidrolisado hemicelulósico, foram esterilizados em autoclave e foi mantido o mesmo volume do inóculo (10 % v/v).

A fermentação foi iniciada com o inóculo e o melaço diluído (45 $g \cdot L^{-1}$ e com o volume de melaço indicado na Tabela 3.2). No tempo de crescimento exponencial celular (24 h) foi alimentado apenas uma vez o volume do hidrolisado hemicelulósico bruto (indicado na Tabela 3.2), correspondente à proporção volumétrica selecionada, completando assim o volume da fermentação. Desta forma, buscou-se evitar a interferência dos inibidores do hidrolisado hemicelulósico na fase de adaptação do processo fermentativo (início da fermentação).

ATabela 3.2 mostra diferentes proporções volumétricas com sua respectiva carga de xilose. Ao aumentar o volume do hidrolisado hemicelulósico o meio de fermentação se torna mais diluído, gerando mais vinhaça. No entanto, o aumento na concentração de xilose garante mais produção de butanol de segunda geração. Das proporções volumétricas de melaço diluído e hidrolisado hemicelulósico indicadas na tabela foram avaliadas quatro, testando desta forma diferentes cargas de xilose e inibidores.

Tabela 3.2. Bateladas alimentadas por pulso

Proporção Volumétrica Selecionada	V_M (L)	V_H (L)	V_F (L)	C_X (%)	[ART] ($g \cdot L^{-1}$)	[AA] ($g \cdot L^{-1}$)
3:1*	0,150	0,050	0,200	11	38,8	0,9
-	0,150	0,075	0,225	16	36,8	1,2
1.5:1	0,150	0,100	0,250	19	35,2	1,5
-	0,150	0,150	0,300	27	32,9	1,9
0.75:1	0,150	0,200	0,350	32	31,2	2,1
-	0,150	0,250	0,400	38	29,9	2,3
-	0,150	0,300	0,450	43	28,9	2,5
-	0,150	0,350	0,500	47	28,1	2,6
-	0,150	0,400	0,550	50	27,5	2,7
1:3	0,150	0,450	0,600	52	26,9	2,8

V_M: Volume de melaço; V_H: Volume do hidrolisado hemicelulósico; V_F: Volume final; C_X: Carga de xilose; [ART]: Concentração inicial de açúcares redutores totais; [AA]: Concentração inicial de ácido acético.

*Proporção volumétrica testada também com adição de nutrientes.

3.2. Batelada alimentada repetida com imobilização celular

Nos experimentos em batelada alimentada repetida com imobilização celular foram aplicadas as metodologias descritas nos itens: 3.1.1 Matéria-prima, 3.1.2 Microrganismo e preparo do inóculo e 3.1.3 Preparo de meios para as fermentações.

3.2.1. Agentes imobilizadores

Nas fermentações com imobilização celular foram utilizados dois tipos de suportes ou agentes imobilizadores: bagaço de cana-de-açúcar ou poliamida branca 12 - PA 2200 produzido via impressão 3D (peça 3D).

- **Bagaço de cana-de-açúcar (*in natura*)**: O bagaço de cana-de-açúcar foi seco ao ar livre até atingir um teor de umidade menor de 10 %, o tamanho de partícula foi definido entre duas peneiras e não houve separação de terra e areia, pois não foi lavado e foi usado em sua forma integral. Os

valores de voláteis e cinzas do bagaço de cana-de-açúcar foram 90,03 e 2,93 % (base seca), respectivamente, de usinas do estado de SP, Brasil (Bizzo *et al*., 2014).

- **Peça 3D**: Para a imobilização celular, com peças 3D, foram utilizadas estruturas poliméricas de geometria cilíndrica obtidas via impressão 3D de prototipagem rápida, sinterização à laser (modelo EOS FORMIGA P110), daí o nome peça 3D. Foi selecionado um modelo previamente projetado no Instituto de Biofabricação (BIOFABRIS/FEQ/UNICAMP), ver Figura 3.1.a. Desta forma foi aproveitado um material já existente e avaliada sua aplicação como agente imobilizador. Se os resultados obtidos superarem os encontrados com a imobilização em bagaço de cana, se abrirá a oportunidade de usar este material para construir diversos enchimentos via impressão 3D para imobilização celular em diferentes tipos de reatores.
  O material utilizado para a construção das peças foi um pó branco PA 2200 à base de poliamida 12 (nylon), conhecida como poliamida branca, especial para impressão 3D. As peças produzidas com este material se caracterizam pela rigidez, força, boa resistência química e são biocompatíveis e certificadas para contato com alimentos (material inerte e com temperatura de fusão de 176 ºC – 20 $ºC \cdot min^{-1}$, permitindo que seja autoclavado).
  As dimensões escolhidas para as peças foram: 25 mm de diâmetro e 30 mm de altura (Figura 3.1.b. e Figura 3.1.c.), tendo em consideração os frascos nos quais as fermentações aconteceriam de forma que ficassem juntas no fundo destes (Figura 3.1.d.). Cada peça tinha uma massa em torno de 6,5 g. Para a realização das fotos em MEV foi criado um corpo de prova de dimensões de 8 mm de diâmetro e 5 mm de altura (Figura 3.1.e. e Figura 3.1.f.).

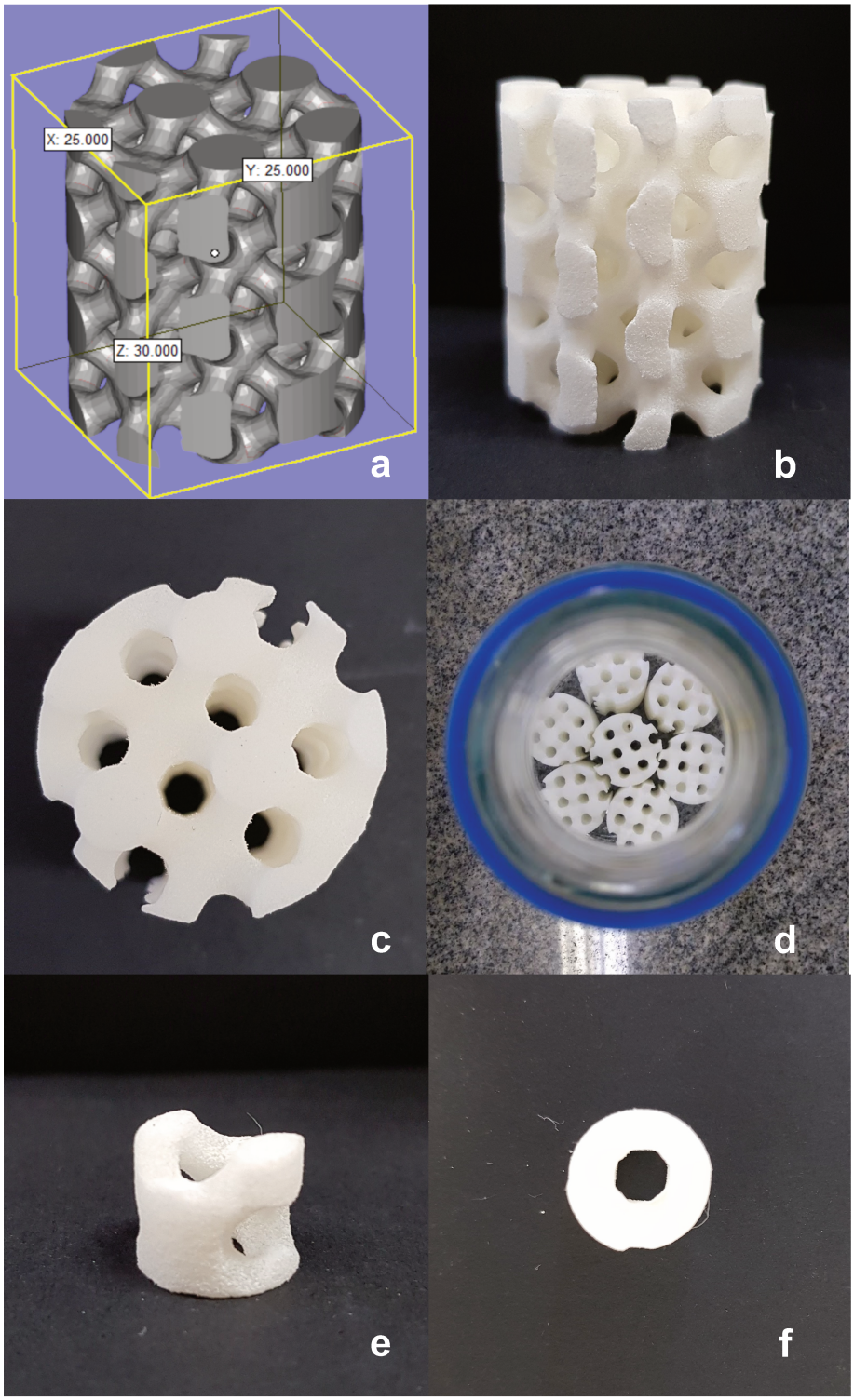


Figura 3.1. Modelo da peça 3D selecionada (a); Peça 3D vista frontal (b), vista superior (c) e em frasco vista superior (d); Corpo de prova vista frontal (e) e vista superior (f).

A imobilização celular foi feita com o bagaço *in natura* envolvido por uma malha de aço inoxidável e flexível (5 cm × 5 cm, malha 14, diâmetro de arame 0,30 mm) de modo que ficasse presa ao fundo do frasco *Schott* e, assim, não subisse perdendo contato com o meio como na Figura 3.2.b e no primeiro frasco da Figura 3.3.

a

b

c

d

Figura 3.2. (a) Bagaço *in natura*, (b), (c) e (d) vista superior de diferentes tentativas de embrulhar o bagaço *in natura*.

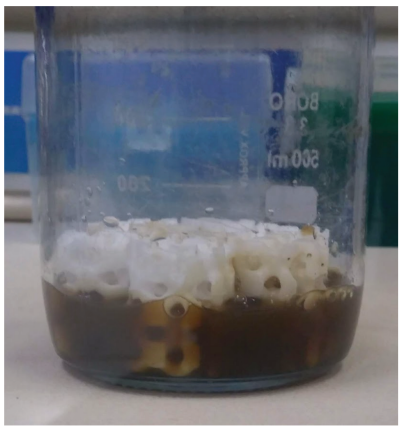
Na vista superior dos frascos da Figura 3.2 se evidenciam diferentes tentativas de embrulhar o bagaço *in natura* (também observar a vista frontal, Figura 3.3).

Figura 3.3. Vista frontal de diferentes tentativas de embrulhar o bagaço *in natura*.

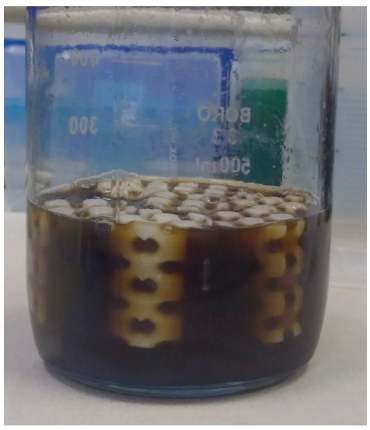
A Figura 3.4 mostra finalmente como foi envolvido o bagaço *in natura* na malha para ficar imerso no meio, do mesmo modo as peças 3D, desta forma aumentando a superfície de contato suscetível à imobilização celular que foi realizada por absorção passiva (item 2.3.1). Assim os frascos foram esterilizados em autoclave.

No momento em que o hidrolisado hemicelulósico foi adicionado, no entanto, as peças 3D não permaneceram completamente presas ao fundo do frasco, causando o aumento do volume que as cobria e flutuaram quando a espuma de fermentação foi gerada (Figura 3.5). Desta forma, pequenas fatias de tubo de silicone foram colocadas entre as peças 3D para empurrá-las contra a parede do frasco, evitar a flutuação e assim ajustá-las ao fundo (como na Figura 3.6).

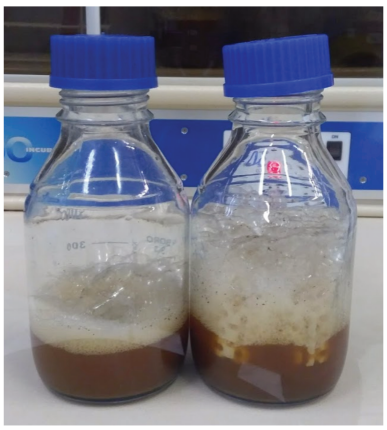
Figura 3.4. Peças 3D e bagaço *in natura* embrulhado na malha de aço inoxidável em frasco.



a. t = 0 h (somente melaço)



b. t = 24 h (após alimentação do hidrolisado)



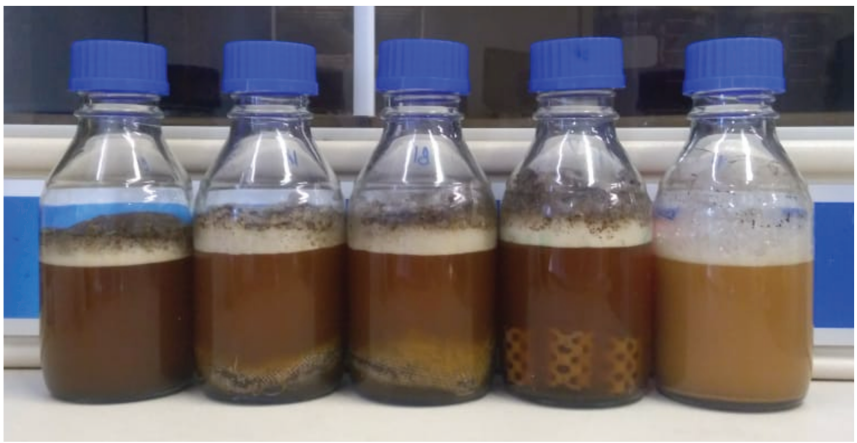
c. t = 72 h de fermentação

Figura 3.5. Frascos com peça 3D.

a. t = 24 h (antes de alimentar o hidrolisado hemicelulósico)

b. t = 24 h (após alimentação do hidrolisado hemicelulósico)

c. t = 72 h de fermentação



Controle, sem imobilização celular	Bagaço 1:60 (m/v)	Bagaço 1:75 (m/v)	Peças 3D	Controle, sem imobilização (melaço 40 g·L^{-1})

Figura 3.6. Frascos com e sem imobilização celular.

Na Figura 3.6 estão os frascos de controle sem imobilização (esquema de batelada alimentada por pulso, primeiro, e meio somente melaço 40 $g \cdot L^{-1}$, último), com bagaço *in natura* (m/v) 1:60 e 1:75, e com peças 3D. As Figura 3.6.a. e Figura 3.6.b. mostram os frascos após 24 h de ter iniciado a fermentação, na primeira sem alimentação (apenas melaço) e na segunda já alimentado o hidrolisado hemicelulósico. Na Figura 3.6.c. podem se observar os frascos ao finalizar a fermentação (72 h).

Outras fotografias das diferentes réplicas com imobilização celular em bagaço *in natura* e peças 3D estão no APÊNDICE B – FERMENTAÇÕES COM IMOBILIZAÇÃO CELULAR.

3.2.2. Fermentações com imobilização celular

Os experimentos com imobilização celular foram desenvolvidos no esquema de batelada alimentada por pulso (batelada simples e sem repetição, como descrito no item 3.1.5) adicionando separadamente os agentes de imobilização celular desde o início (bagaço *in natura* ou peças 3D) nos frascos da fermentação, também foram inoculados com *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 (10 % v/v), incubados por 72 h em câmara anaeróbia com um volume de trabalho total de 360 mL (frascos *Schott* de 500 mL) e tiveram suplementação nutricional (meio P2), com o objetivo evitar deficiência de nutrientes e assim otimizar a condição.

A proporção volumétrica 1:3 (melaço/hidrolisado hemicelulósico) avaliada nas fermentações em batelada alimentada por pulso (Tabela 3.2) foi escolhida para realizar os experimentos com imobilização celular com bagaço *in natura* ou peças 3D no meio de cultura. Foi selecionada a condição mais desfavorável, pois tem a maior quantidade de hidrolisado hemicelulósico, assim apresenta um desafio maior em comparação com as demais condições testadas e se espera verificar o impacto da imobilização celular sobre o rendimento, produtividade e concentração do butanol (butanol de segunda geração).

Foram avaliadas duas cargas de bagaço *in natura* (m/v): 1:60 e 1:75; ou seja, 1 g de bagaço por 60 e 75 mL de meio, respectivamente. No caso das peças 3D

somente foi testada uma carga (m/v): 1:8 (1 g por 8 mL de meio), porque apenas foi possível colocar 7 peças dentro de um frasco *Schott* de 500 mL.

3.2.3. Fermentações em batelada alimentada repetida

Os experimentos em batelada alimentada repetida, como nos experimentos com imobilização celular, tiveram suplementação nutricional (meio P2) e foram inoculados com *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 (10 % v/v), incubados em câmara anaeróbia, mas conduzidos com um volume total de 100 mL (frascos *Schott* de 250 mL).

O hidrolisado hemicelulósico não foi destoxificado ou concentrado por evaporação, de modo que foi adicionado na sua forma bruta, somente foi ajustado seu pH para 6,5 com pellets de NaOH. O melaço foi diluído diretamente no hidrolisado sem adição de água (40 $g \cdot L^{-1}$).

As fermentações em batelada alimentada repetida foram divididas em três etapas (Figura 3.7). Na primeira etapa, a batelada foi iniciada com o agente de imobilização celular e com melaço diluído somente em água (suplementado com nutrientes e onde foi realizada a única inoculação do processo), com o propósito de fortalecer o início do crescimento do microrganismo. Finalizada a primeira batelada foi trocado o meio, sempre mantendo o agente imobilizador entre cada troca e sem adição de inóculo, por um novo meio de melaço diluído fresco, assim restaurando o volume de fermentação inicial para a próxima batelada.

Na segunda etapa, a batelada começou com o mesmo melaço diluído (suplementado com nutrientes) e após 24 h de ter iniciada a fermentação o hidrolisado foi alimentado, na proporção de melaço/hidrolisado de 1:3 (M:H), esquema de batelada alimentada por pulso, como descrito no item 3.1.5. Assim esta fase serve como uma transição para as condições mais desafiadoras da próxima etapa, pois introduz o microrganismo em contato gradual com os inibidores presentes no hidrolisado.

Na terceira etapa, as bateladas foram iniciadas com meio contendo melaço diluído diretamente no hidrolisado hemicelulósico (40 $g \cdot L^{-1}$, bruto e suplementado com nutrientes). Entre cada batelada foi trocado o meio sempre mantendo o agente de

imobilização celular (bagaço *in natura* ou peças 3D). Não se realizou nenhum tipo de lavagem (diluição com água e drenagem), preparo (destoxificação ou reativação) ou adição de algum meio de recuperação nas células para a batelada seguinte. No entanto, foi adicionada suplementação nutricional (meio P2, como indicado no item 3.1.3) em cada novo meio que foi trocado ao mudar de batelada.

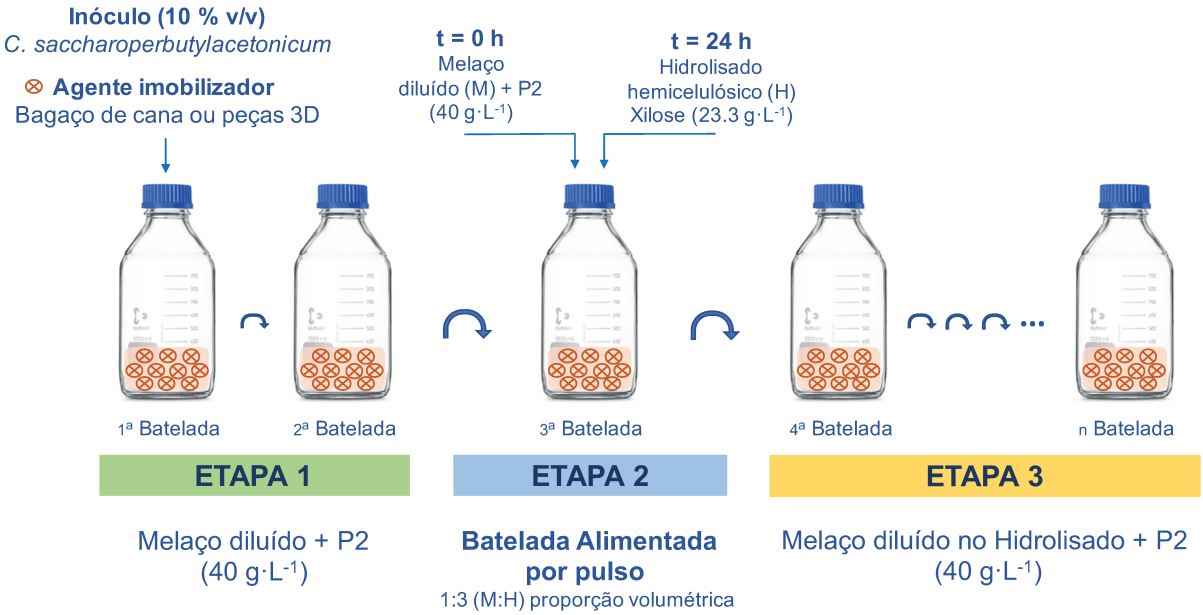


Figura 3.7. Esquema batelada alimenta repetida.

Uma variação da estratégia de fermentação consistiu em ter somente a primeira batelada apenas alimentada com melaço diluído, já a segunda batelada correspondia ao esquema de batelada alimentada por pulso e finalizaram-se as bateladas seguintes com melaço diluído diretamente no hidrolisado hemicelulósico. Além disso, as condições do experimento foram variadas quanto ao número de bateladas e tempo de fermentação. Nos experimentos em batelada alimentada repetida com imobilização celular foram planejadas 5 condições experimentais, ver Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Condições experimentais

Condição	Tempo inicial de fermentação para cada batelada (h)	Agente imobilizador	Batelada alimentada por pulso (Etapa 2)
Bagaço – 1	36	Bagaço *in natura*	3ª
Bagaço – 2	36	Bagaço *in natura*	2ª
Bagaço – 3	48	Bagaço *in natura*	2ª
Peça 3D – 1	36	Peças 3D	3ª
Peça 3D – 2	48	Peças 3D	3ª

A carga de bagaço *in natura* de 1:75 (m/v) (1,3 g em 100 mL de volume médio final) e de peças 3D de 1:4 (m/v) (4 × 6,5 g em 100 mL de volume de meio final) foram escolhidas para realizar as diferentes condições dos experimentos em batelada repetida.

3.3. Métodos analíticos

As amostras retiradas em cada um dos ensaios realizados foram centrifugadas, passadas por um filtro de 0,22 µm e armazenadas no freezer para posteriormente serem quantificados seus compostos.

As concentrações de açúcares (sacarose, glicose, xilose, frutose), etanol, butanol e ácido acético presentes no hidrolisado hemicelulósico, no melaço e nas amostras de fermentação foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O modelo do cromatógrafo é Agilent 1260 Infinity, equipado com detector RID. A separação dos compostos de importância da fermentação foi realizada pela coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H, utilizando uma solução de H_2SO_4 3 mM como eluente com vazão de 0,5 $mL \cdot min^{-1}$ e uma temperatura de 15 °C. Os compostos foram detectados por índice de refração, em comprimento de onda de 205 nm.

Um coquetel com os açúcares e produtos da fermentação de 0,5 a 10 $g \cdot L^{-1}$ foi usado como padrão para identificar as concentrações dos compostos presentes nas amostras quantificadas no HPLC.

Os inibidores do hidrolisado hemicelulósico foram quantificados de duas formas. No caso do ácido acético, hidroximetilfurfural (HMF) e o ácido furfural foi usado o HPLC. O ácido acético seguiu a mesma análise descrita anteriormente (coluna HPX-

87H), já para o HMF e o furfural utiliza-se a coluna Nova-Pak C-18 e o leitor DAD com uma fase móvel composta por uma solução de água/acetonitrila/ácido acético de 88:11:1 (v/v), uma vazão de 0,8 mL·min^{-1}, em comprimento de onda de 280 nm e uma temperatura de 30 °C. Os compostos fenólicos foram quantificados por meio de um ensaio colorimétrico (Ainsworth e Gillespie, 2007).

3.4. Cálculos de conversão, produtividade e rendimento

Os resultados apresentados correspondem ao valor médio ($\overline{x}$) das três réplicas realizadas para cada condição testada. Também foi calculado o desvio padrão das medidas (σ_x) de acordo com as Equações (3.1) e (3.2) (Taylor, 1982).

$$\overline{x} = \frac{\sum_i^k x_i}{N_i} \tag{3.1}$$

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{N_i - 1}\sum(x_i - \bar{x})^2} \tag{3.2}$$

Onde:

x_i corresponde à cada um dos dados obtidos e N_i é igual ao número de réplicas feitas. A diferença entre as médias foi avaliada estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0{,}05$) usando a ferramenta de acesso aberto: Astatsa Online Web Statistical Calculators (Navendu Vasavada, astatsa.com).

A conversão do substrato, a produtividade do butanol e o rendimento de butanol foram calculadas como:

$$Conversão\ (\%) = \frac{Substrato\ inicial\ (g) - Substrato\ residual\ (g)}{Substrato\ inicial\ (g)} * 100\% \tag{3.3}$$

$$Produtividade\ (g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}) = \frac{Butanol\ produzido\ (g)}{Volume\ (L) * Tempo\ de\ fermentação\ (h)} \tag{3.4}$$

$$Rendimento\ (g \cdot g^{-1}) = \frac{Butanol\ produzido\ (g)}{Substrato\ consumido\ (g)} \tag{3.5}$$

3.5. Cálculo de tanques de fermentação e custo de compra

Para realizar o cálculo do número de tanques de fermentação (NTF) considera-se uma planta de butanol que produz 10 kton·ano^{-1} (quantidade de butanol produzido), com fermentadores de 1000 m^3 (volume do fermentador), que opera 350 dias ao ano e aplicamos a Equação 3.6.

$$NTF\ (\#) = \frac{Quantidade\ de\ butanol\ produzido\ (ton{\cdot}h^{-1})}{Volume\ do\ fermentador\ (m^3) * \frac{Produtividade\ (g{\cdot}L^{-1}{\cdot}h^{-1})}{1000}} \tag{3.6}$$

O custo de compra dos tanques de fermentação foi calculado com a Equação 3.7 da anualização do CAPEX (Meza, 2013).

$$A = P * \frac{i\,(1+i)^n}{(1+i)^n - 1} \tag{3.7}$$

Onde:

A corresponde ao valor de cada pagamento, P é igual ao valor presente equivalente à uma série de pagamentos iguais e periódicos, n é o número de pagamentos e i obedece à taxa de juros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Batelada alimentada por pulso

4.1.1. Melaço e hidrolisado hemicelulósico

A caracterização do melaço, hidrolisado hemicelulósico bruto e destoxificado por *overliming* é apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Caracterização do melaço e hidrolisado hemicelulósico

Parâmetro	Melaço	Hidrolisado hemicelulósico Bruto	Hidrolisado hemicelulósico Destoxificado
	Açucares ($g \cdot L^{-1}$)		
Sacarose	449,9	-	-
Glicose	86,9	6,5	5,0
Xilose	-	23,3	21,2
Frutose	68,7	-	-
Total	629,2*	29,8	26,2
	Inibidores ($g \cdot L^{-1}$)		
Hidroximetilfurfural (HMF)	-	0,6	0,3
Furfural	-	0,5	0,2
Ácido Acético	-	3,7	3,3
Compostos Fenólicos	-	1,3	1,0

* Calculado como açúcares redutores totais (ART) em todo o documento

[ART = 1.05 * Sacarose + Glicose + Xilose + Frutose]

Pela Tabela 4.1 se depreende que entre as duas formas do hidrolisado hemicelulósico tem-se que o destoxificado por *overliming* apresentou uma diminuição pequena na concentração dos açúcares e inibidores, devido principalmente ao método utilizado (Mohagheghi *et al*, 2006; Quereshi *et al*., 2010), quando comparado ao hidrolisado hemicelulósico bruto.

As concentrações de celobiose e manose encontradas no hidrolisado bruto foram de 0,3 e 0,6 $g \cdot L^{-1}$, respectivamente, e portanto que foram desconsideradas para as futuras análises.

4.1.2. Avaliação da fermentabilidade dos açúcares

Os resultados dos testes feitos para avaliar a fermentabilidade dos açúcares são apresentados na Tabela 4.2. A maior conversão alcançada foi para o teste com glicose (G-P2), no entanto uma conversão de 75 % foi obtida no experimento com xilose (X-P2), assim confirmando o bom desempenho da linhagem *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 na produção de butanol. Nas fermentações com melaço, concentração de ART de 40 $g \cdot L^{-1}$, os açúcares quase se esgotaram e o rendimento de butanol foi maior em comparação com os rendimentos dos experimentos dos meios sintéticos de glicose e xilose, 0,24 e 0,27 $g \cdot g^{-1}$, respectivamente. Além disso, independentemente da suplementação de nutrientes a conversão de açúcares (~97 %) e o rendimento de butanol (~0,31 $g \cdot g^{-1}$) não variaram nos testes com melaço puro (M-40) e melaço com meio P2 (M-40-P2).

O rendimento de butanol obtido no melaço pode ser atribuído aos três fatores seguintes. Em primeiro lugar, dado que o teor de açúcar do melaço de cana-de-açúcar é predominantemente sacarose, a massa molar mais alta da sacarose em comparação com a glicose pode ter influenciado o aumento do rendimento de butanol na fermentação com melaço. De fato, as espécies solventogênicas de *Clostridium* possuem um sistema de fosfotransferase (PTS) dependente de fosfoenolpiruvato de sacarose (PEP) para transportar e metabolizar a sacarose sem primeiro hidrolisar o dissacarídeo nos dois componentes individuais do açúcar, glicose e frutose (Tangney *et al*., 1998). Em segundo lugar, o rendimento superior de butanol do melaço, quando comparado ao substrato de glicose, também pode ter resultado de uma mudança no metabolismo das células que aumentou o fluxo de carbono para a produção de butanol, enquanto diminuiu o fluxo para a produção de coprodutos (etanol e acetona). Como evidência deste fato, a concentração de etanol foi estatisticamente menor nas fermentações com melaço M-40 (0,77 $g \cdot L^{-1}$) em comparação com a obtida nas fermentações de glicose (1,32 $g \cdot L^{-1}$) e xilose (1,43 $g \cdot L^{-1}$). Como resultado, a proporção butanol/etanol aumentou de 12:1 (G-P2 e X-P2) para 18:1 (M-40). Em relação à acetona, não foi possível sua quantificação devido à fraca separação por HPLC de acetona e ácido butírico, um intermediário da fermentação. No entanto, estimamos

que a concentração de acetona foi menor que 1 $g \cdot L^{-1}$, com base em outros estudos sobre *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 (Zetty-Arenas *et al*., 2019). Dado o rendimento relativamente baixo dos coprodutos, ou seja, abaixo da proporção ABE típica de 3:6:1 (Jones e Woods, 1986), as variações em sua produção podem ter um efeito limitado sobre o rendimento do butanol. Assim, um terceiro fator que pode ter contribuído para melhorar o rendimento de butanol foi o consumo de outras fontes de carbono (por exemplo, ácidos orgânicos e aminoácidos) inerentemente presentes no melaço de cana (Chang *et al*., 2014; Kong *et al*., 2015; Lino *et al*., 2018).

Nas fermentações com melaço, concentração de ART de 60 $g \cdot L^{-1}$, a adição de nutrientes melhorou significativamente a conversão de açúcares, principalmente sacarose 29,59 e 52,62 %, respectivamente (Tabela 4.2). Além disso, pode-se perceber pela Figura 4.1 que a cultura consumiu todos os açúcares ao mesmo tempo, independentemente da suplementação. A suplementação também estimulou a produtividade do butanol, que aumentou 28 %.

Na Figura 4.1 nota-se também que às 24 h é definido o ponto de alimentação para o hidrolisado hemicelulósico pois a fase de adaptação do processo fermentativo terminou (primeiras 12 h) e o microrganismo já se encontrava na etapa de crescimento exponencial celular.

Pode-se observar, da Tabela 4.2, que a produtividade das fermentações contendo 40 $g \cdot L^{-1}$ de ART também aumentou devido à suplementação (M-40-P2 em comparação com M-40). No entanto, resultou de uma diferença na concentração inicial de açúcar em vez de uma variação na conversão de açúcares. Portanto, a condição com a concentração inicial sem suplementação de nutrientes de 40 $g \cdot L^{-1}$ de ART foi escolhida para realizar as fermentações em batelada alimentada por pulso.

Tabela 4.2. Desempenho do *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 considerando diferentes fontes de carbono.

Parâmetro	**G-P2**	**X-P2**	**M-40**	**M-40-P2**	**M-60**	**M-60-P2**
Inicial ART ($g \cdot L^{-1}$)	61,92 ± 0,51	60,59 ± 1,49	39,26 ± 0,98	42,77 ± 0,67	61,94 ± 1,02	62,99 ± 0,76
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-	29,56 ± 0,65	32,14 ± 0,34	44,8 ± 0,63	46,58 ± 0,66
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	61,92 ± 0,51	-	4,83 ± 0,17	5,2 ± 0,17	8,2 ± 0,37	7,97 ± 0,17
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-	3,31 ± 0,14	3,74 ± 0,16	6,58 ± 0,65	5,99 ± 0,16
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	-	60,59 ± 1,49	-	-	-	-
Residual ART ($g \cdot L^{-1}$)	0,33 ± 0,36	15,13 ± 1,44	1,26 ± 0,27	1,41 ± 0,29	36,6 ± 0,58	26,57 ± 0,21
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-	1,10 ± 0,23	1,21 ± 0,25	33,78 ± 0,34	23,75 ± 0,20
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	0,33 ± 0,36	-	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,66 ± 0,00	0,73 ± 0,00
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,69 ± 0,00	0,84 ± 0,00
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	-	15,13 ± 1,44	-	-	-	-
Conversão ART (%) [§]	99,47 ± 0,59 [a]	75,03 ± 2,07 [c]	96,8 ± 0,73 [ab]	96,71 ± 0,72 [ab]	44,31 ± 1,84 [e]	60,82 ± 0,84 [d]
Sacarose (%)	-	-	96,27 ± 0,82	96,22 ± 0,79	29,59 ± 1,80	52,62 ± 1,14
Glicose (%)	99,47 ± 0,59	-	99,31 ± 0,24	98,33 ± 0,49	91,95 ± 0,38	90,84 ± 0,2
Frutose (%)	-	-	98,39 ± 0,68	98,84 ± 0,34	89,51 ± 1,10	85,97 ± 0,38
Xilose (%)	-	75,03 ± 2,07	-	-	-	-
Ácido Acético ($g \cdot L^{-1}$)	0,41 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,75 ± 0,02	0,76 ± 0,05	0,45 ± 0,02	1,29 ± 0,02
Etanol ($g \cdot L^{-1}$)	1,32 ± 0,22	1,43 ± 0,08	0,74 ± 0,05	0,74 ± 0,05	0,69 ± 0,14	0,68 ± 0,05
Butanol ($g \cdot L^{-1}$) [§]	15,09 ± 0,15 [a]	13,56 ± 0,46 [b]	12,55 ± 0,58 [c]	14,46 ± 0,07 [a]	9,82 ± 0,15 [d]	12,95 ± 0,33 [bc]
Rendimento de butanol ($g \cdot g^{-1}$) [§]	0,24 ± 0,01 [c]	0,27 ± 0,01 [b]	0,31 ± 0,01 [a]	0,32 ± 0,01 [a]	0,33 ± 0,03 [a]	0,31 ± 0,01 [a]
Produtividade de butanol ($g \cdot L^{-1} h^{-1}$) [§]	0,21 ± 0,00 [a]	0,19 ± 0,01 [b]	0,17 ± 0,01 [c]	0,20 ± 0,00 [a]	0,14 ± 0,00 [d]	0,18 ± 0,00 [bc]

G: fermentação de glicose; X: fermentação de xilose; M: fermentação de melaço; P2: adição de nutrientes do meio P2.

[§] As médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (teste de Tukey; $p < 0,05$).

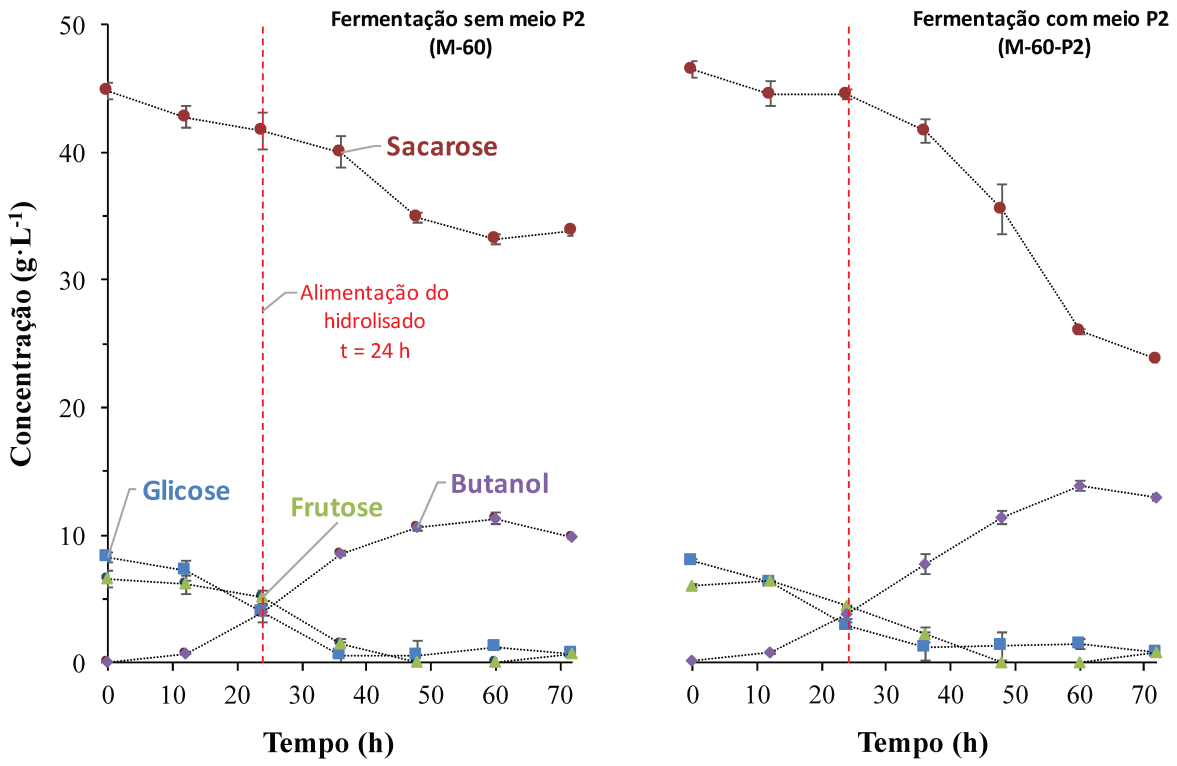


Figura 4.1. Concentração de açúcares e butanol durante a fermentação do melaço (60 g·L^{-1}).

Os experimentos iniciados com hidrolisado hemicelulósico bruto e destoxificado por *overliming* e com melaço diluído no hidrolisado com suplementação de nutrientes (meio P2), planejados na Tabela 3.1, não apresentaram rendimento ou produtividade. O desempenho da linhagem *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 nestes experimentos para produzir butanol foi provavelmente dificultada por potenciais inibidores microbianos encontrados no hidrolisado (Tabela 4.1), embora as concentrações presentes na maioria destes inibidores presumivelmente não estavam em níveis tóxicos. Por exemplo, no caso dos furanos, *C. saccharoperbutylacetonicum* pode até ser estimulado se sua concentração for menor que 2 g·L^{-1} (Yao *et al*., 2017). No trabalho de Zetty-Arenas *et al*., (2019) a mesma linhagem foi capaz de produzir butanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar contendo 3,4 g·L^{-1} de ácido acético, no entanto, o hidrolisado foi produzido usando uma técnica mais suave de pré-tratamento (pré-tratamento hidrotérmico seguido de hidrólise diluída por ácido sulfúrico). Consequentemente, a lignina foi provavelmente degradada em menor grau, e a concentração resultante de fenólicos (g·L^{-1}, 0,06

siringaldeído, 0,18 ácido p-cumarico) foi menor aos considerados tóxico para *C. saccharoperbutylacetonicum* (Yao *et al*., 2017) e obtidos no hidrolisado usado para os experimentos do estudo atual ($g \cdot L^{-1}$, 0,8 siringaldeído, 0,4 ácido p-cumárico). Provavelmente neste estudo os compostos fenólicos produzidos durante o pré-tratamento com ácido diluído afetaram o desempenho da linhagem evitando a produção de butanol.

4.1.3. Fermentações em batelada alimentada por pulso

Os resultados das fermentações em batelada alimentada por pulso são apresentados na Tabela 4.3, onde é possível destacar como em todas as proporções volumétricas testadas se obteve produção de butanol, mostrando como a batelada alimentada por pulso permite que a fermentação pelo *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 aconteça mesmo em presença dos inibidores do hidrolisado hemicelulósico em seu estado bruto. Este aspecto é importante, pois o microrganismo consegue suportar a concentração de inibidores na etapa de crescimento exponencial e fermentar xilose, situação que não acontece na etapa de adaptação (início da fermentação). Além disso, se observa da primeira até a última proporção volumétrica de melaço/hidrolisado (3:1, 3:1+P2, 1.5:1, 0.75:1, 1:3) uma diminuição da conversão total de açúcares, rendimento, produtividade e concentração do butanol no mesmo tempo. Expondo que a maior quantidade de hidrolisado hemicelulósico resulta em uma maior restrição no processo para alcançar os valores obtidos na fermentação de melaço sem suplementação, M-40 (Tabela 4.2).

Na fermentação contendo a menor quantidade de hidrolisado (proporção melaço/hidrolisado 3:1), a maior parte da xilose e os demais açúcares (ART) foram consumidos, conversão de 89,63 % e 83,85 %, respectivamente. O rendimento do butanol alcançou 0,31 $g \cdot g^{-1}$, valor tão alto quanto o observado na fermentação de melaço (M-40, Tabela 4.2). Além disso, a fermentação com a mesma proporção volumétrica com adição de nutrientes (3:1+P2) mostrou que todos os açúcares podem quase ser esgotados em 72 h.

Tabela 4.3. Desempenho das fermentações em batelada alimentada por pulso.

Parâmetro	**3:1**	**3:1+P2**	**1.5:1**	**0.75:1**	**1:3**
Inicial ART ($g \cdot L^{-1}$)	44,7 ± 0,78	43,66 ± 1,06	47,64 ± 0,85	46,81 ± 0,29	46,54 ± 0,44
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	34,37 ± 0,84	33,1 ± 0,97	32,04 ± 0,65	31,56 ± 0,16	31,37 ± 0,27
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	5,31 ± 0,06	5,10 ± 0,22	8,45 ± 0,12	8,29 ± 0,14	8,30 ± 0,09
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	3,21 ± 0,18	3,72 ± 0,25	5,46 ± 0,11	5,30 ± 0,06	5,21 ± 0,06
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	3,76 ± 0,07	2,75 ± 0,05	9,24 ± 0,11	15,41 ± 0,24	18,51 ± 0,09
Carga de xilose (%)	9,90 ± 0,06	7,65 ± 0,03	21,77 ± 0,57	39,51 ± 0,44	49,88 ± 0,22
Residual ART ($g \cdot L^{-1}$)	6,24 ± 0,57	0,78 ± 0,02	15,39 ± 1,79	14,62 ± 0,12	19,47 ± 0,15
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	5,14 ± 0,45	0,53 ± 0,02	10,96 ± 1,29	5,63 ± 0,17	5,32 ± 0,05
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	0,36 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,82 ± 0,07	0,57 ± 0,05	0,52 ± 0,06
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,4 ± 0,07	0,11 ± 0,01	3,04 ± 0,39	8,13 ± 0,14	13,35 ± 0,16
Carga de xilose (%)	6,36 ± 0,57	14,5 ± 0,73	19,73 ± 0,38	55,57 ± 1,09	68,55 ± 0,28
Conversão ART (%) [§]	83,85 ± 1,40 [b]	97,86 ± 0,02 [a]	64,34 ± 3,83 [c]	63,14 ± 0,55 [c]	48,40 ± 0,36 [d]
Sacarose (%)	80,33 ± 1,52	97,95 ± 0,02	49,80 ± 5,37	59,44 ± 1,42	49,66 ± 0,31
Glicose (%)	91,3 ± 0,52	97,63 ± 0,32	88,92 ± 0,70	91,91 ± 0,60	91,97 ± 0,82
Frutose (%)	97,68 ± 0,59	99,03 ± 0,32	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
Xilose (%)	89,63 ± 1,80	95,94 ± 0,21	67,68 ± 4,35	48,15 ± 0,58	29,09 ± 0,59
Ácido Acético ($g \cdot L^{-1}$)	0,56 ± 0,03	0,81 ± 0,03	0,81 ± 0,06	1,23 ± 0,03	1,51 ± 0,01
Etanol ($g \cdot L^{-1}$)	0,75 ± 0,12	1,17 ± 0,18	1,13 ± 0,33	1,62 ± 0,29	1,32 ± 0,23
Butanol ($g \cdot L^{-1}$) [§]	10,06 ± 0,48 [b]	10,88 ± 0,19 [a]	7,00 ± 0,14 [c]	5,21 ± 0,05 [d]	3,21 ± 0,06 [e]
Rendimento de butanol ($g \cdot g^{-1}$) [§]	0,31 ± 0,02 [ab]	0,30 ± 0,01 [ab]	0,25 ± 0,01 [b]	0,21 ± 0,01 [c]	0,18 ± 0,00 [c]
Produtividade de butanol ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) [§]	0,14 ± 0,01 [b]	0,15 ± 0,00 [a]	0,10 ± 0,00 [c]	0,07 ± 0,00 [d]	0,04 ± 0,00 [e]

P2: adição de nutrientes do meio P2.

[§] As médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (teste de Tukey; $p < 0,05$).

O *C. saccharoperbutylacetonicum* que já foi usado em plantas comerciais de butanol alimentadas com melaço (Poehlein *et al.*, 2017), confirmou que pode co-fermentar sacarose, glicose, frutose e xilose (Figura 4.2, estão consideradas as diferentes proporções volumétricas de melaço/hidrolisado. A seta vermelha indica a hora em que o hidrolisado foi alimentado na fermentação).

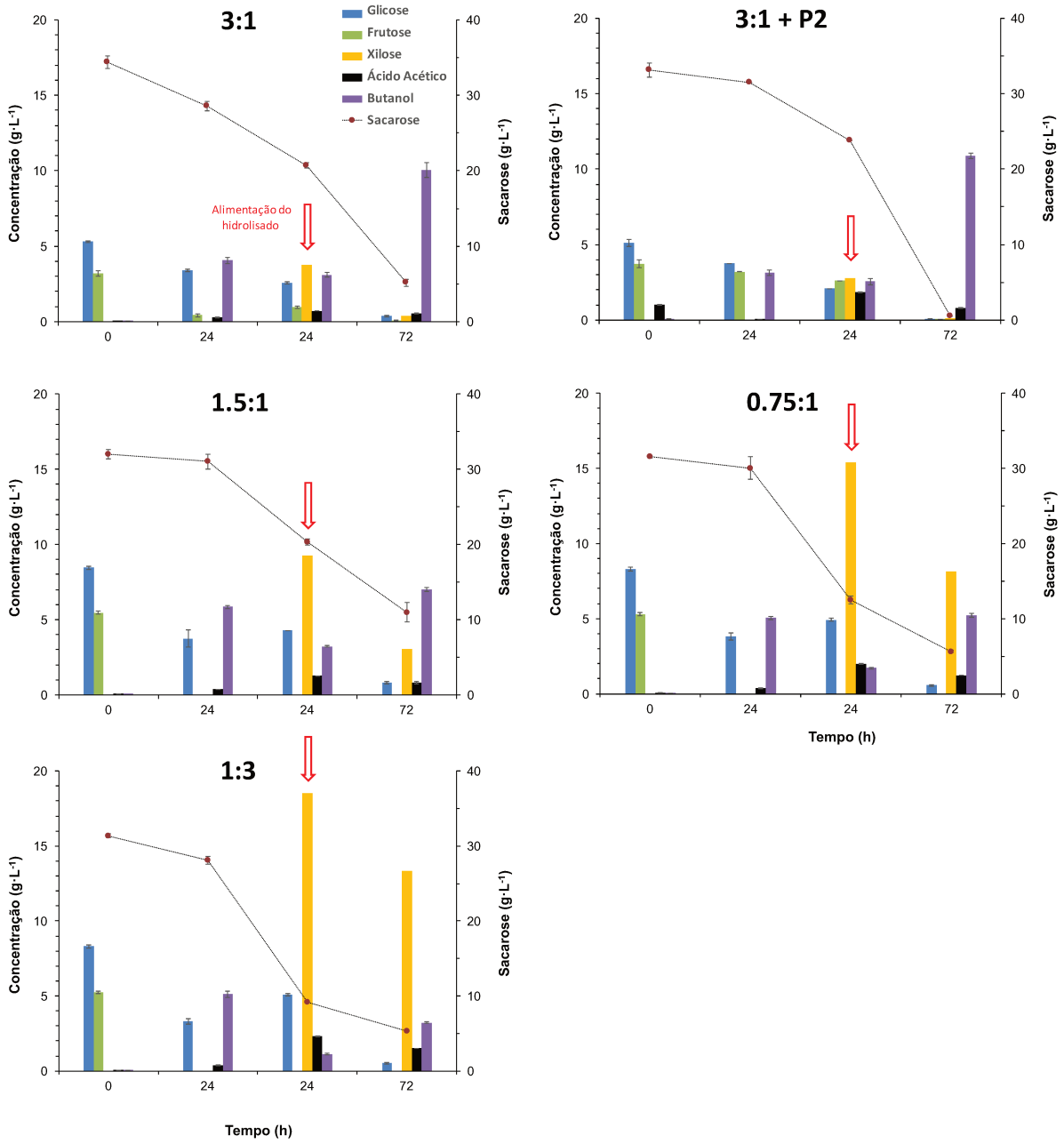


Figura 4.2. Concentração de açúcares, butanol e ácido acético durante a fermentação em batelada alimentada por pulso.

No entanto, a conversão de sacarose e xilose foi baixa em 30 % na fermentação que continha a maior quantidade de hidrolisado (1:3). Esta situação se evidencia também nas proporções volumétricas 1.5:1 e 0.75:1, onde a conversão de sacarose e xilose se reduziu. Poderia se supor que ao aumentar o volume do hidrolisado, e em consequência a quantidade de inibidores, estes estariam reprimindo a atividade enzimática das células, mas para a glicose e a frutose não se apresenta esta diminuição e são esgotadas mais facilmente nas diferentes condições testadas. Por causa desta restrição, a xilose foi responsável por não mais do que o 10 % dos açúcares alimentados para a fermentação, e o produto da fermentação, portanto, continha mais butanol de primeira geração do que de segunda geração.

Para contornar esta limitação e dar continuidade aos ensaios em batelada alimentada repetida e avaliar o impacto da imobilização celular foi selecionada a condição experimental com a proporção volumétrica de 1:3 (melaço/hidrolisado), contendo a maior quantidade de hidrolisado (a xilose foi responsável por aproximadamente 50% dos açúcares). Pois ao ser a condição mais difícil e apresentar a menor conversão de sacarose e xilose, 49,66 e 39,09 %, respectivamente, espera-se uma melhora na conversão destes açúcares que exigem mais para ser metabolizados igual ao rendimento, produtividade e concentração do butanol melhorem com a estratégia de imobilização celular em batelada repetida.

A perda na produção de butanol, pelo aumento da quantidade de hidrolisado, foi atenuada pelo fato de *C. saccharoperbutylacetonicum* ser capaz de consumir parte do ácido acético derivado do hidrolisado hemicelulósico alimentado à fermentação (o ácido acético é um intermediário metabólico na produção de acetona) (Figura 4.2). Por outro lado, estima-se que as perdas no desempenho da fermentação tornam o processo economicamente inviável. Por exemplo, as perdas no rendimento de butanol e na conversão das açúcares afetam o custo da matéria-prima, que é o principal componente de custo dos combustíveis e produtos químicos. Além disso, a diluição da corrente do produto (concentração de butanol diminuiu de 10,0 (3:1) para 3,2 (1:3) $g \cdot L^{-1}$) aumentaria significativamente os custos operacionais da separação e descarte de águas residuais no processo (Mariano e Maciel Filho, 2012).

Além disso, a perda observada na produtividade do butanol aumentaria o custo de investimento da fermentação. Por exemplo, para uma planta que produz

10 kton·ano^{-1} de butanol, estima-se o número de tanques de fermentação exigidos pela planta em função da produtividade do butanol (Figura 4.3). O número de tanques de fermentação varia significativamente, dependendo da proporção melaço/hidrolisado, variando de 15 (3:1) a 52 (1: 3) tanques. Consequentemente, o respectivo custo de compra dos tanques varia de 6 a 22 MMUSD (milhões de dólares). No entanto, o número mínimo de tanques exigidos pela planta de butanol ainda é muito alto. Para fins de comparação, a produção de 250 kton·ano^{-1} de etanol em uma usina de cana-de-açúcar exigiria 12 tanques, assumindo que a produtividade do etanol é de 4,5 g·L^{-1}·h^{-1} (J. Finguerut, Instituto de Tecnologia de Cana-de-Açúcar, comunicação pessoal). No entanto, a operação que considera a menor quantidade de hidrolisado no meio pode ter uma vantagem econômica significativa, já que 16 MMUSD representaria 188 USD·ton^{-1} de butanol em termos de custo de produção (custo de compra anual em 20 anos, considerando uma taxa de desconto do 10 %). Assim, devido aos fatores econômicos e técnicos, o volume de hidrolisado hemicelulósico fornecido à fermentação não deve exceder a proporção melaço/hidrolisado de 3:1.

No entanto, a proporção recomendada pode limitar a capacidade da planta de butanol. Na fermentação que contém a razão melaço/hidrolisado de 3:1, a xilose representa apenas 10 % da quantidade total de açúcares (Tabela 4.3). Se este valor for colocado no contexto de uma usina de cana-de-açúcar que converte 500 ton de cana-de-açúcar por hora em etanol e açúcar de mesa (cada processo consome a metade da entrada de cana-de-açúcar), a quantidade de açúcar do melaço disponível na usina não corresponderia à quantidade requerida pela planta de butanol. Neste sentido, a produção de melaço é de 10 ton·h^{-1} (ART) e menor em comparação à xilose (11 ton·h^{-1}), se 75 % do bagaço for usado para produzir açúcares lignocelulósicos (Mariano *et al*., 2013). Assim, a quantidade de bagaço usada para produzir açúcares teria que ser ajustada em conformidade (para 8 % da quantidade total neste caso) ou, provavelmente, melaço adicional teria que ser comprado de outras usinas.

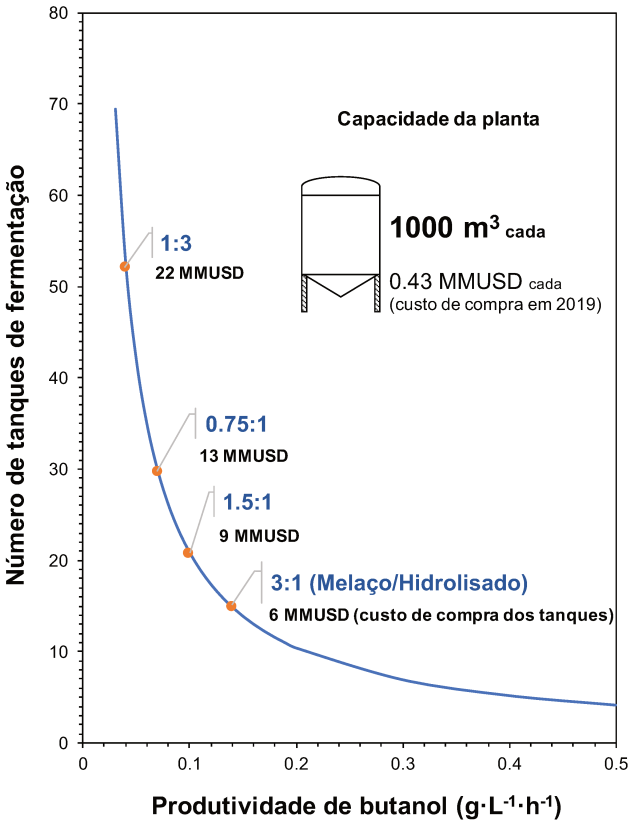


Figura 4.3. Tanques de fermentação em uma planta de butanol em função da produtividade do butanol. A planta opera 200 dias por ano durante a safra.

Na Figura 4.3 o custo de compra dos tanques de fermentação foi calculado com base na cotação disponível em Humbird *et al*. (2011), que foi ajustado considerando um fator de escala igual a 0,6 e o CEPCI (Chemical Engineering Plant Cost Index).

4.2. Batelada alimentada repetida com imobilização celular

4.2.1. Bagaço de cana e Peça 3D

São descritos na continuação os resultados obtidos das análises realizadas aos suportes usados para a imobilização celular: bagaço *in natura* e suporte de poliamida branca 12 produzido via impressão 3D (peça 3D).

- **Tamanho de partícula**: O tamanho de partícula do bagaço *in natura* usado para os testes de imobilização celular esteve na faixa de 9,52 – 16 mm.

- **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**: A Figura 4.4 mostra a estrutura morfológica do bagaço *in natura* e da peça 3D ampliadas 100X, 1000X e 3000X.

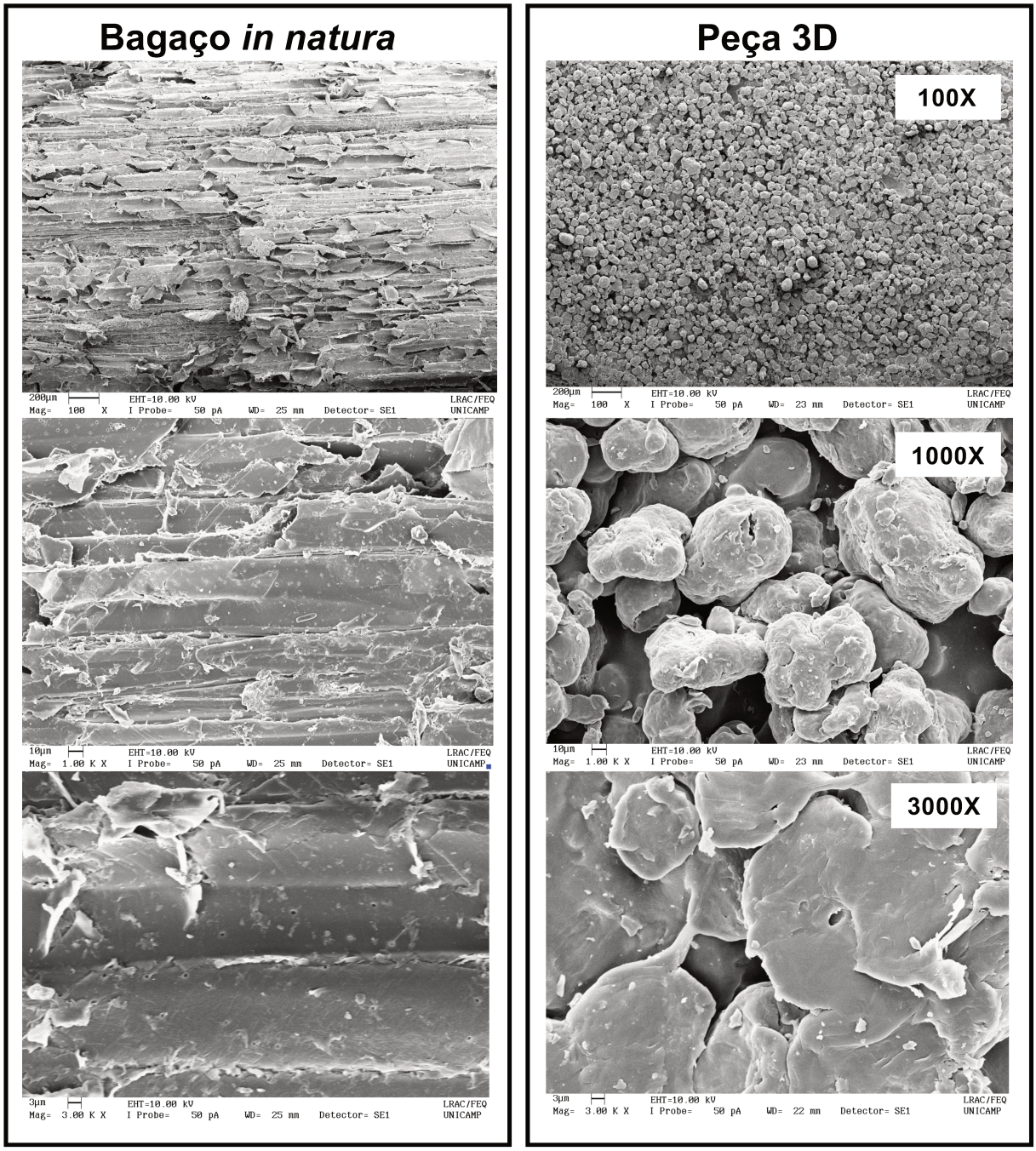


Figura 4.4. Bagaço *in natura* e Peça 3D.

4.2.2. Fermentações com imobilização celular

A imobilização celular foi feita em bateladas simples (esquema de batelada alimentada por pulso, sem repetição) com o bagaço *in natura* ou peças 3D em frascos *Schott*, como mostrado na Figura 3.6, as duas cargas avaliadas de bagaço *in natura* (m/v): 1:60 e 1:75 e a carga de peças 3D (m/v): 1:4 obtiveram evidências da fermentação comprovada pela espuma sobrenadante ao meio após 72 h e pelos resultados apresentados na Tabela 4.4.

Antes da alimentação do hidrolisado hemicelulósico não-destoxificado às 24 h, a formação de espuma foi mais intensa nas fermentações com imobilização celular (Figura 3.6), supostamente sugerindo que a cultura era mais vigorosa do que no controle (células livres). No entanto, o aumento na formação de espuma foi provavelmente um resultado das interações físicas entre o caldo, os gases e os agentes de imobilização celular do que de uma taxa de fermentação aumentada. Isso foi confirmado pelo fato de que a imobilização celular teve pouco ou nenhum efeito na utilização de açúcar e na produção de butanol durante as primeiras 24 h (Figura 4.5). Em contrapartida, na alimentação do hidrolisado, a utilização da xilose foi potencializada nas fermentações contendo os agentes de imobilização (bagaço *in natura* e peças 3D). Enquanto a conversão da xilose foi de 2,57 % (e a conversão de açúcares foi de 35,79 %) no experimento controle sem imobilização celular, nas fermentações com imobilização celular a conversão de xilose variou entre 15,86 e 32,79 % (a conversão de açúcares foi de 54,99 - 62,04 %) (Tabela 4.4). Consequentemente, a produção de butanol praticamente dobrou de 1,38 (células livres) para 2,53 - 2,88 $g \cdot L^{-1}$ (células imobilizadas), e o rendimento do butanol aumentou em até 50% (de 0,10 para 0,15) (a concentração do etanol ficou abaixo de 1 $g \cdot L^{-1}$).

Tabela 4.4. Desempenho da imobilização celular considerando diferentes agentes imobilizadores.

Parâmetro	**Controle (Células livres)**	**Peça 3D (m/v): 1:8**	**Bagaço *in natura* (m/v): 1:60**	**Bagaço *in natura* (m/v): 1:75**
Inicial ART ($g \cdot L^{-1}$)	59,68 ± 1,20	60,18 ± 0,83	59,70 ± 1,11	58,96 ± 0,14
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	41,13 ± 0,73	41,40 ± 0,39	40,97 ± 0,85	40,3 ± 0,18
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	9,19 ± 0,19	9,27 ± 0,23	9,27 ± 0,12	9,19 ± 0,02
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	7,19 ± 0,27	7,33 ± 0,25	7,30 ± 0,19	7,36 ± 0,05
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	15,12 ± 0,43	14,51 ± 0,29	17,77 ± 0,42	15,28 ± 0,57
Carga de xilose (%)	39,54 ± 0,98	40,30 ± 0,21	44,12 ± 0,75	44,66 ± 1,24
Residual ART ($g \cdot L^{-1}$)	24,77 ± 0,84	16,36 ± 0,62	15,43 ± 0,43	14,67 ± 0,4
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	8,55 ± 0,25	3,58 ± 0,52	2,79 ± 0,15	2,25 ± 0,26
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	0,91 ± 0,23	0,27 ± 0,23	0,44 ± 0,05	0,37 ± 0,08
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	14,86 ± 0,46	12,32 ± 0,76	12,05 ± 0,26	11,93 ± 0,14
Carga de xilose (%)	60,00 ± 0,97	75,34 ± 2,74	78,11 ± 0,88	81,34 ± 1,49
Conversão ART (%) [§]	35,79 ± 1,90 [c]	54,99 ± 2,38 [b]	62,04 ± 1,92 [a]	57,51 ± 1,46 [ab]
Sacarose (%)	31,07 ± 2,25	68,54 ± 4,93	76,32 ± 2,77	77,01 ± 2,69
Glicose (%)	83,70 ± 4,14	95,01 ± 4,38	92,56 ± 0,91	93,06 ± 1,46
Frutose (%)	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
Xilose (%)	2,57 ± 0,97	15,86 ± 6,13	32,79 ± 1,59	22,62 ± 2,93
Ácido Acético ($g \cdot L^{-1}$)	2,19 ± 0,05	1,50 ± 0,15	1,28 ± 0,04	1,25 ± 0,02
Etanol ($g \cdot L^{-1}$)	0,31 ± 0,07	0,46 ± 0,12	0,42 ± 0,00	0,29 ± 0,05
Butanol ($g \cdot L^{-1}$) [§]	1,38 ± 0,08 [c]	2,53 ± 0,10 [b]	2,76 ± 0,06 [a]	2,88 ± 0,05 [a]
Rendimento de butanol ($g \cdot g^{-1}$) [§]	0,10 ± 0,01 [c]	0,13 ± 0,01 [b]	0,11 ± 0,00 [bc]	0,15 ± 0,00 [a]
Produtividade de butanol ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) [§]	0,02 ± 0,00 [c]	0,04 ± 0,00 [b]	0,04 ± 0,00 [a]	0,04 ± 0,00 [a]

[§] As médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (teste de Tukey; $p < 0,05$).

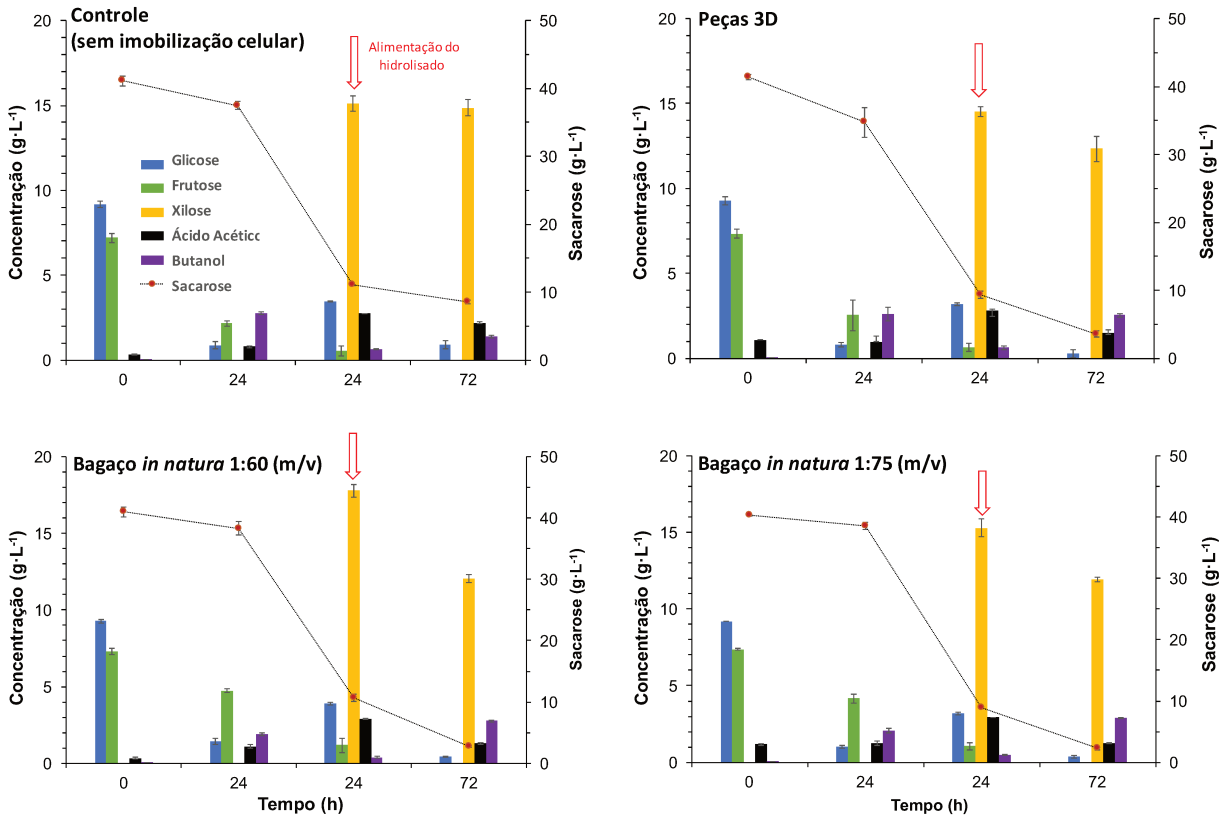


Figura 4.5. Concentração de açúcares, butanol e ácido acético durante a fermentação com imobilização celular.

Uma possível razão para a melhor utilização da xilose é o fato de que as camadas externas dos biofilmes podem servir como uma barreira de difusão que protege as camadas celulares internas dos inibidores microbianos presentes no hidrolisado hemicelulósico (Todhanakasem, 2017). Este fenômeno foi relatado em estudos anteriores onde hidrolisados hemicelulósicos foram usados como matérias-primas para a produção de etanol por culturas imobilizadas passivamente de *Zymomonas mobilis* (Todhanakasem *et al.*, 2014), *Saccharomyces cerevisiae* (Narayanan *et al.*, 2016) e *Scheffersomyces stipites* (Bader *et al.*, 2020). No presente estudo, imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostram a adesão por parte das células *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 na superfície do bagaço *in natura* e da peça 3D; além disso, um biofilme é mais perceptível na superfície da peça 3D (a Figura 4.6 mostra as células *C. saccharoperbutylacetonicum* e a Figura 4.7 mostra a estrutura morfológica do corpo de prova). Curiosamente, a natureza fragmentada das partículas do bagaço *in natura* proporcionou uma área

superficial total (não medida) várias vezes maior que a do suporte 3D (que tem uma estrutura volumosa), provavelmente permitindo assim que mais células aderissem. Esta diferença pode explicar porque todos os parâmetros de desempenho da fermentação com bagaço *in natura* foram superiores em comparação com a peça 3D (Tabela 4.4).

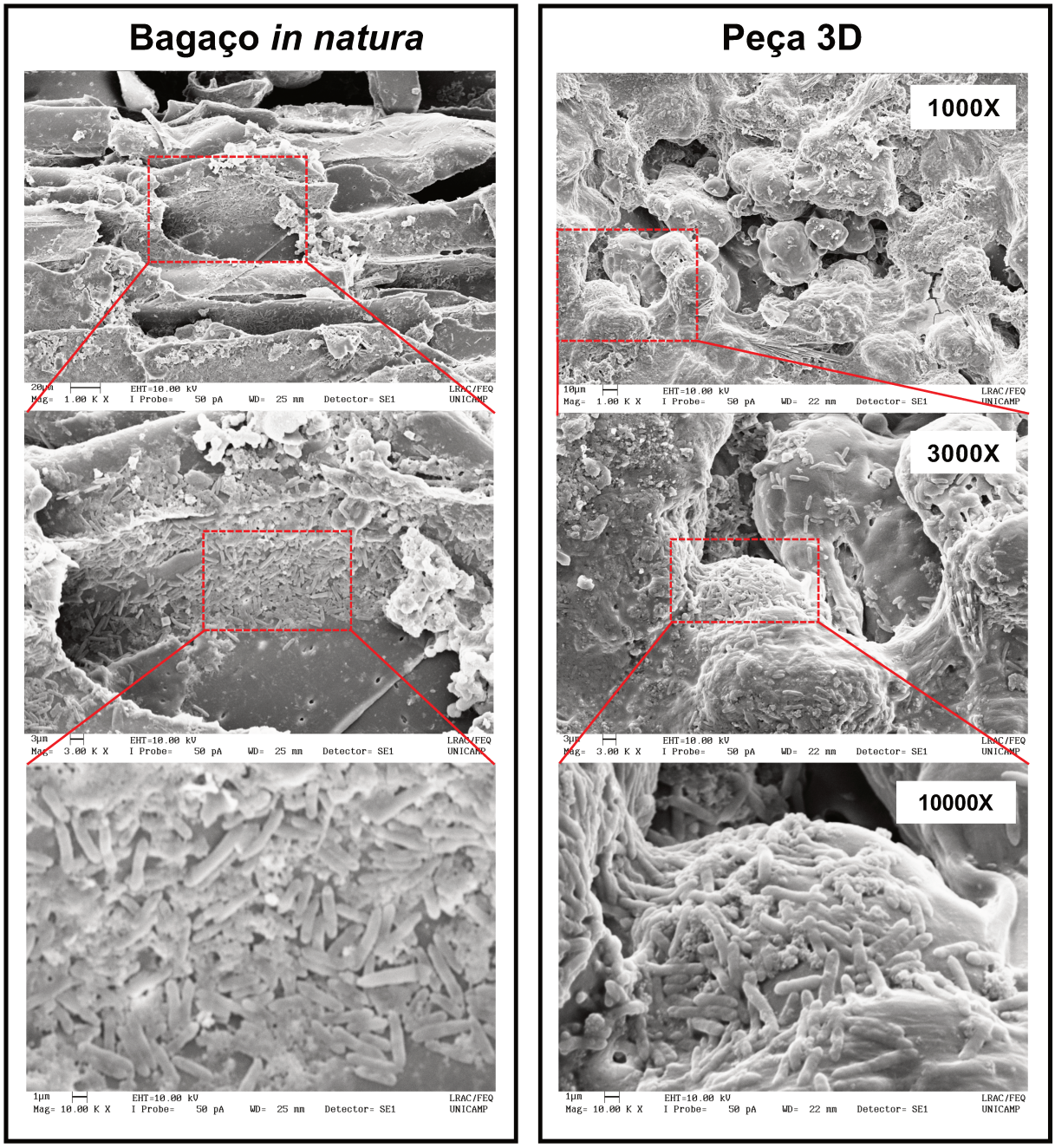


Figura 4.6. Bagaço *in natura* e peça 3D após 72 h de fermentação.

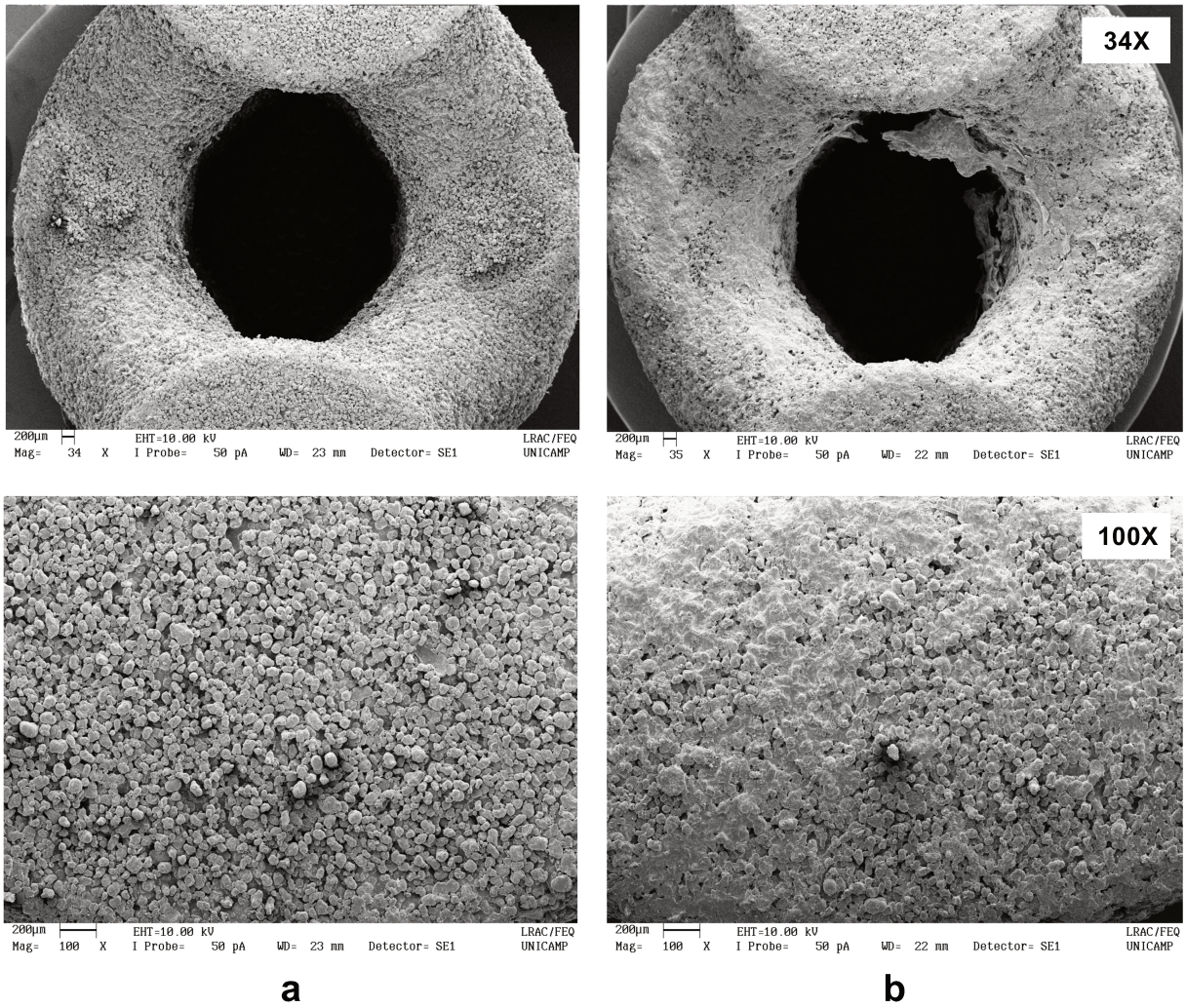


Figura 4.7. (a) Corpo de prova e (b) Corpo de prova após 72 h de fermentação.

Apesar do aumento significativo na conversão da xilose devido à imobilização celular, a quantidade de xilose residual (~ 12 $g \cdot L^{-1}$) não é satisfatória. O principal contribuinte para este resultado indesejado foi certamente a presença de compostos inibidores microbianos derivados do bagaço, mesmo que a fermentação da xilose possa ter sido restringida em certa medida pela repressão catabólica de carbono induzida por glicose (CCR) [CCR foi observada por Li *et al.*, (2019), que também utilizou a imobilização celular como estratégia para aumentar a utilização de hidrolisados não-destoxificados]. De fato, nos experimentos anteriores de batelada alimentada por pulso sem imobilização celular (item 4.1.3), a conversão de xilose foi tão alta quanto 95,94 % (Tabela 4.3) quando os inibidores do hidrolisado foram diluídos na proporção volumétrica de 3:1 (melaço/hidrolisado), enquanto nos

presentes resultados com imobilização celular a proporção foi de 1:3. No entanto, quanto mais o hidrolisado é diluído, menor é a fração de butanol de segunda geração (2G) (ou seja, o butanol produzido a partir de açúcares derivados do bagaço) no butanol total produzido na fermentação. Nos experimentos de batelada alimentada por pulso sem imobilização celular, o butanol 2G representou 10 % da produção total de butanol, em contraste, esta fração foi de 30 % nestes experimentos com imobilização celular. Curiosamente, como a imobilização celular também favoreceu a utilização de açúcares do melaço, a fração de butanol de segunda geração no produto final foi praticamente a mesma nas culturas de células livres e imobilizadas.

No entanto, o aumento na produção de butanol 2G foi acompanhado por dois aspectos negativos: aproveitamento incompleto de açúcares (incluindo sacarose) e perda de produtividade do butanol. Na fermentação contendo bagaço (1:75 m/v), a conversão de açúcares foi de 57,51 % (Tabela 4.4), significativamente menor à alcançada nos experimentos em batelada alimentada por pulso sem imobilização celular (item 4.1.3), que foi de 97,86 % (Tabela 4.3) e que continha menor hidrolisado (proporção volumétrica de 3:1, melaço/hidrolisado). Enquanto a produtividade do butanol no caso da batelada alimentada por pulso sem imobilização celular o resultado foi quase quatro vezes superior à produtividade (0,04 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) obtida na fermentação contendo bagaço (1:75 m/v).

Os resultados apresentados nesta seção também foram importantes para determinar a quantidade de bagaço *in natura* (1:75 m/v) a ser adicionado nos experimentos de fermentação em batelada alimentada repetida apresentados na próxima seção. Uma relação inversa entre a carga de bagaço *in natura* e o rendimento do butanol (Tabela 4.4) também foi observada por Vieira *et al*. (2020) ao cultivar células de *C. beijerinckii* DSM 6423 imobilizadas em bagaço de cana-de-açúcar. Eles relataram que quanto maior a quantidade de bagaço no meio, mais biofilme se formou; consequentemente, menos açúcar foi utilizado para a produção de butanol. Outro aspecto importante é que a quantidade de bagaço *in natura* é uma variável operacional cuja minimização pode facilitar a escalação desta tecnologia de fermentação. Assim, a carga de bagaço *in natura* 1:75 (m/v), junto com as peças 3D foram escolhidas para ser testadas nos experimentos de batelada alimentada repetida.

4.2.3. Fermentações em batelada alimentada repetida

A seguir são apresentados os resultados das condições experimentais testadas para a fase de batelada alimentada repetida (Tabela 3.3). As condições Bagaço – 1 (primeira e segunda batelada com melaço – Tabela 4.5), Bagaço – 2 (primeira batelada com melaço – Tabela 4.6) e Peça 3D – 1 (primeira e segunda batelada com melaço – Tabela 4.8) começaram com um tempo de fermentação de 36 h por batelada e mudaram para 60 h desde a 5ª batelada até o final do experimento. Esta decisão foi tomada devido à baixa produção de butanol, sendo que foi levantada a hipótese de que é preciso de maior tempo para que o microrganismo consuma os açúcares que são incorporados quando foi alimentado o hidrolisado hemicelulósico (etapa 2).

Por exemplo, a condição Bagaço – 1 nas duas primeiras bateladas alimentadas com melaço (etapa 1) obtiveram concentrações de butanol de 7,46 e 5,82 $g \cdot L^{-1}$ (Tabela 4.5), mas na 3ª batelada a concentração caiu para 1,68 $g \cdot L^{-1}$ (etapa 2), igual à conversão dos açucares, pois a troca do meio aconteceu 12 h após de ser realizada a alimentação do hidrolisado hemicelulósico. Na 4ª batelada, alimentada com melaço diluído diretamente no hidrolisado hemicelulósico (etapa 3), não se apresentou nenhuma melhora, mas na 5ª batelada a concentração de butanol aumentou para 3,83 $g \cdot L^{-1}$, valor próximo ao encontrado na 2ª batelada (meio apenas com melaço) e superior ao encontrado nas duas bateladas anteriores.

No entanto, o microrganismo poderia também estar sentindo o impacto do processo em batelada repetida e por isso desde a 2ª batelada se evidencia (sem presença de hidrolisado) a diminuição da conversão e produção de butanol. Quando o hidrolisado é incorporado ao processo esta situação se agrava e se apresenta também uma inibição por substrato, pois a sacarose diminui sua conversão, situação que não acontecia no meio com somente melaço e em batelada simples.

Para a condição Peça 3D – 1 (Tabela 4.8) o comportamento do experimento foi similar ao descrito anteriormente na condição Bagaço – 1, pois a 3ª (etapa 2), 4ª (início da etapa 3) e 5ª bateladas não apresentaram produção de butanol. No entanto, ao aumentar o tempo de fermentação da batelada se apresentou um aumento da concentração de butanol de ~ 2,8 $g \cdot L^{-1}$ entre a 6ª e 7ª bateladas.

Tabela 4.5. Desempenho das fermentações em bateladas repetidas com imobilização celular: Bagaço – 1.

Parâmetro	**1ª Batelada**	**2ª Batelada**	**3ª Batelada**	**4ª Batelada**	**5ª Batelada**	**6ª Batelada**	**7ª Batelada**	**8ª Batelada**
Inicial ART ($g \cdot L^{-1}$)	33,58 ± 0,18	32,13 ± 1,34	32,50 ± 2,74	36,82 ± 4,73	31,92 ± 0,55	32,17 ± 0,81	33,15 ± 0,68	32,17 ± 2,03
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	18,39 ± 0,09	17,76 ± 0,80	18,44 ± 1,75	8,33 ± 1,45	7,37 ± 0,12	7,26 ± 0,25	7,55 ± 0,14	7,52 ± 0,59
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	8,66 ± 0,01	7,42 ± 0,30	7,00 ± 0,55	6,56 ± 0,86	5,58 ± 0,18	5,65 ± 0,19	5,76 ± 0,25	4,81 ± 0,84
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	5,56 ± 0,08	6,02 ± 0,25	6,09 ± 0,40	2,71 ± 0,33	2,59 ± 0,07	2,54 ± 0,08	2,55 ± 0,14	2,46 ± 0,32
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,45 ± 0,75	18,79 ± 2,02	16,00 ± 0,18	16,34 ± 0,35	16,89 ± 0,20	16,97 ± 0,49
Carga de xilose (%)	-	-	48,72 ± 2,05	51,03 ± 1,08	50,11 ± 0,32	50,78 ± 0,48	50,96 ± 0,48	52,75 ± 2,37
Residual ART ($g \cdot L^{-1}$)	1,45 ± 0,42	10,73 ± 1,88	15,49 ± 0,82	26,27 ± 1,11	15,94 ± 3,14	28,44 ± 1,82	29,93 ± 2,11	29,41 ± 1,02
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	0,84 ± 0,33	8,55 ± 0,83	1,91 ± 0,28	6,05 ± 0,35	2,04 ± 1,23	7,23 ± 0,41	7,65 ± 0,72	4,57 ± 0,36
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	0,29 ± 0,05	0,52 ± 0,16	1,56 ± 0,09	2,17 ± 0,58	0,67 ± 0,08	3,07 ± 1,57	3,37 ± 0,96	4,39 ± 0,32
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	0,27 ± 0,02	1,20 ± 0,89	1,13 ± 0,22	1,99 ± 0,4	1,31 ± 0,06	2,30 ± 0,59	2,08 ± 0,35	3,14 ± 0,52
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10,78 ± 0,37	15,75 ± 0,25	11,82 ± 1,82	15,46 ± 0,51	16,43 ± 0,49	17,07 ± 0,55
Carga de xilose (%)	-	-	69,61 ± 1,32	59,96 ± 2,39	74,12 ± 2,93	54,36 ± 5,22	54,89 ± 3,5	58,03 ± 0,29
Conversão ART(%)	95,68 ± 1,29	66,62 ± 7,31	41,56 ± 2,03	28,64 ± 10,68	50,06 ± 9,27	11,61 ± 5,2	9,72 ± 4,78	8,56 ± 3,39
Sacarose (%)	95,42 ± 1,84	51,84 ± 6,98	63,38 ± 7,56	27,36 ± 11,41	72,27 ± 16,35	3,44 ± 3,56	2,56 ± 4,43	39,23 ± 8,65
Glicose (%)	96,66 ± 0,59	92,97 ± 2,36	70,22 ± 2,32	66,97 ± 12,09	87,98 ± 1,41	45,69 ± 25,7	41,49 ± 14,18	8,04 ± 8,86
Frutose (%)	95,06 ± 0,49	80,04 ± 15,58	60,27 ± 8,35	26,59 ± 22,35	49,57 ± 3,77	13,47 ± 15,92	18,45 ± 9,48	0,00 ± 0,00
Xilose (%)	-	-	16,51 ± 2,16	16,16 ± 8,02	26,14 ± 10,89	5,38 ± 3,11	2,83 ± 2,67	0,11 ± 0,20
Ácido Acético ($g \cdot L^{-1}$)	0,52 ± 0,09	0,36 ± 0,04	1,65 ± 0,12	3,96 ± 0,24	4,18 ± 0,51	4,85 ± 0,52	4,85 ± 0,67	4,62 ± 0,05
BE ($g \cdot L^{-1}$)	8,26 ± 0,39	6,64 ± 1,16	2,89 ± 0,36	1,55 ± 0,94	4,08 ± 0,78	2,34 ± 1,35	1,96 ± 0,79	1,11 ± 0,15
Etanol ($g \cdot L^{-1}$)	0,80 ± 0,09	0,82 ± 0,24	1,21 ± 0,10	0,58 ± 0,21	0,25 ± 0,01	1,65 ± 1,27	1,44 ± 0,71	0,87 ± 0,20
Butanol ($g \cdot L^{-1}$)	7,46 ± 0,32	5,82 ± 0,62	1,68 ± 0,16	0,97 ± 0,27	3,83 ± 0,77	0,7 ± 0,15	0,52 ± 0,30	0,23 ± 0,16
Rendimento de butanol ($g \cdot g^{-1}$)	0,23 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,09 ± 0,10	0,24 ± 0,01	0,19 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,08 ± 0,09
Produtividade de butanol ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Etapa da Fermentação	1 (36 h)	1 (36 h)	2 (36 h)	3 (36 h)	3 (60 h)	3 (60 h)	3 (60 h)	3 (60 h)

Tabela 4.6. Desempenho das fermentações em bateladas repetidas com imobilização celular: Bagaço – 2.

Parâmetro	**1ª Batelada**	**2ª Batelada**	**3ª Batelada**	**4ª Batelada**	**5ª Batelada**	**6ª Batelada**	**7ª Batelada**	**8ª Batelada**
Inicial ART ($g \cdot L^{-1}$)	33,95 ± 0,72	30,25 ± 0,38	35,50 ± 0,57	35,79 ± 0,28	31,12 ± 0,39	33,74 ± 0,76	32,74 ± 0,26	31,65 ± 3,85
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	18,34 ± 0,31	16,82 ± 0,11	7,90 ± 0,08	8,33 ± 0,02	6,98 ± 0,15	7,79 ± 0,19	7,19 ± 0,15	7,78 ± 1,23
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	8,90 ± 0,26	6,87 ± 0,18	6,44 ± 0,08	6,24 ± 0,11	5,42 ± 0,08	6,00 ± 0,14	6,05 ± 0,22	3,78 ± 1,73
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	5,75 ± 0,16	5,67 ± 0,08	2,94 ± 0,02	2,64 ± 0,07	2,52 ± 0,03	2,71 ± 0,08	2,56 ± 0,03	2,23 ± 0,66
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	12,43 ± 0,13	17,80 ± 0,39	18,13 ± 0,19	15,84 ± 0,16	16,83 ± 0,36	16,56 ± 0,17	17,45 ± 0,37
Carga de xilose (%)	-	49,29 ± 0,21	50,14 ± 0,29	50,66 ± 0,20	50,89 ± 0,21	49,89 ± 0,15	50,57 ± 0,12	55,13 ± 5,35
Residual ART ($g \cdot L^{-1}$)	1,34 ± 0,27	17,56 ± 0,20	29,34 ± 2,07	22,94 ± 1,45	13,16 ± 0,44	25,96 ± 3,69	22,01 ± 5,28	28,6 ± 2,89
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	0,66 ± 0,28	1,95 ± 0,13	6,88 ± 0,56	3,19 ± 1,69	1,30 ± 0,05	3,88 ± 1,05	2,69 ± 1,03	7,19 ± 1,41
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	0,34 ± 0,03	2,50 ± 0,13	3,11 ± 0,83	1,19 ± 0,59	0,58 ± 0,03	5,09 ± 2,78	2,15 ± 1,38	3,40 ± 1,32
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	0,31 ± 0,02	1,12 ± 0,05	2,65 ± 0,14	1,79 ± 0,12	1,45 ± 0,03	2,43 ± 0,35	1,58 ± 0,21	1,99 ± 0,53
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	11,88 ± 0,10	16,33 ± 0,55	16,59 ± 0,11	9,76 ± 0,39	14,36 ± 1,42	15,45 ± 2,68	15,65 ± 0,40
Carga de xilose (%)	-	67,64 ± 0,73	55,68 ± 2,10	72,35 ± 4,22	74,17 ± 0,65	55,32 ± 3,02	70,21 ± 5,09	54,71 ± 4,52
Conversão ART(%)	96,05 ± 0,76	32,83 ± 0,98	17,36 ± 6,49	35,91 ± 3,77	57,71 ± 0,92	23,06 ± 9,68	32,77 ± 15,62	9,64 ± 7,50
Sacarose (%)	96,42 ± 1,49	59,79 ± 1,94	12,93 ± 7,51	61,68 ± 20,20	81,37 ± 0,76	50,25 ± 14,60	62,63 ± 14,91	10,62 ± 9,38
Glicose (%)	96,16 ± 0,45	53,63 ± 2,77	51,75 ± 13,11	80,97 ± 9,54	89,24 ± 0,44	27,50 ± 24,63	64,43 ± 21,90	8,80 ± 7,65
Frutose (%)	94,62 ± 0,17	59,12 ± 1,09	9,86 ± 4,39	32,14 ± 6,07	42,51 ± 0,73	10,31 ± 14,05	38,49 ± 7,47	11,39 ± 10,39
Xilose (%)	-	7,81 ± 1,46	8,23 ± 4,57	8,47 ± 1,47	38,36 ± 1,94	14,69 ± 6,74	8,99 ± 12,62	10,33 ± 3,35
Ácido Acético ($g \cdot L^{-1}$)	0,45 ± 0,12	1,65 ± 0,02	3,76 ± 0,16	3,96 ± 0,08	3,01 ± 0,05	3,73 ± 0,42	3,85 ± 0,70	4,74 ± 0,56
BE ($g \cdot L^{-1}$)	8,78 ± 0,24	1,54 ± 0,11	1,34 ± 0,34	4,27 ± 0,66	4,25 ± 0,26	2,08 ± 0,74	2,30 ± 0,77	1,37 ± 0,40
Etanol ($g \cdot L^{-1}$)	0,55 ± 0,06	0,40 ± 0,05	0,32 ± 0,21	0,35 ± 0,11	0,24 ± 0,00	0,68 ± 0,42	0,78 ± 0,48	0,70 ± 0,20
Butanol ($g \cdot L^{-1}$)	8,23 ± 0,26	1,14 ± 0,04	1,02 ± 0,2	3,92 ± 0,81	4,01 ± 0,29	1,4 ± 0,73	1,52 ± 1,32	0,68 ± 0,24
Rendimento de butanol ($g \cdot g^{-1}$)	0,25 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,07	0,31 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,14 ± 0,07	0,11 ± 0,11
Produtividade de butanol ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,23 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,00
Etapa da Fermentação	1 (36 h)	2 (36 h)	3 (36 h)	3 (36 h)	3 (60 h)	3 (60 h)	3 (60 h)	3 (60 h)

Tabela 4.7. Desempenho das fermentações em bateladas repetidas com imobilização celular: Bagaço – 3.

Parâmetro	**1ª Batelada**	**2ª Batelada**	**3ª Batelada**	**4ª Batelada**	**5ª Batelada**	**6ª Batelada**	**7ª Batelada**
Inicial ART ($g \cdot L^{-1}$)	34,32 ± 2,07	29,75 ± 1,10	35,56 ± 0,30	33,40 ± 0,78	33,38 ± 0,19	34,00 ± 0,46	34,70 ± 0,63
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	18,64 ± 1,17	16,32 ± 0,57	7,93 ± 0,16	7,55 ± 0,20	7,27 ± 0,30	7,70 ± 0,12	7,87 ± 0,06
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	8,78 ± 0,67	6,90 ± 0,25	6,42 ± 0,14	5,80 ± 0,21	6,17 ± 0,35	5,97 ± 0,11	6,03 ± 0,21
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	5,91 ± 0,26	5,67 ± 0,24	2,95 ± 0,06	2,72 ± 0,13	2,72 ± 0,10	2,68 ± 0,02	3,81 ± 0,08
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	12,78 ± 0,16	17,85 ± 0,07	16,94 ± 0,25	16,84 ± 0,09	17,24 ± 0,24	16,56 ± 0,63
Carga de xilose (%)	-	49,85 ± 0,61	50,20 ± 0,41	50,71 ± 0,49	50,44 ± 0,38	50,70 ± 0,07	47,74 ± 1,09
Residual ART ($g \cdot L^{-1}$)	1,40 ± 0,07	14,58 ± 0,04	21,95 ± 1,71	13,39 ± 0,33	25,30 ± 1,93	13,95 ± 0,79	32,04 ± 0,57
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	0,69 ± 0,02	2,08 ± 0,10	4,82 ± 0,79	1,49 ± 0,07	6,01 ± 0,60	2,21 ± 0,34	7,38 ± 0,31
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	0,34 ± 0,02	0,52 ± 0,08	0,82 ± 0,12	0,71 ± 0,17	1,96 ± 0,62	0,66 ± 0,06	5,66 ± 0,30
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	0,32 ± 0,03	1,17 ± 0,09	2,62 ± 0,78	1,51 ± 0,09	2,68 ± 0,24	1,43 ± 0,03	2,79 ± 0,08
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	10,71 ± 0,11	13,43 ± 0,17	9,60 ± 0,01	14,33 ± 0,46	9,53 ± 0,42	15,83 ± 0,12
Carga de xilose (%)	-	73,43 ± 0,55	61,20 ± 4,73	71,73 ± 1,68	56,65 ± 2,65	68,37 ± 1,23	49,40 ± 1,09
Conversão ART(%)	95,93 ± 0,35	45,15 ± 1,45	38,28 ± 5,13	59,91 ± 1,69	24,22 ± 6,02	58,98 ± 1,81	7,65 ± 0,47
Sacarose (%)	96,28 ± 0,23	57,50 ± 5,29	39,19 ± 9,78	80,32 ± 1,46	17,37 ± 11,31	71,37 ± 3,93	6,27 ± 4,60
Glicose (%)	96,09 ± 0,47	90,39 ± 1,36	87,23 ± 2,02	87,76 ± 3,00	68,16 ± 8,78	88,93 ± 0,95	6,18 ± 3,78
Frutose (%)	94,53 ± 0,73	58,3 ± 2,73	17,68 ± 17,24	44,42 ± 6,17	1,61 ± 9,02	46,73 ± 0,90	26,91 ± 3,62
Xilose (%)	-	19,20 ± 1,64	24,75 ± 0,82	43,30 ± 0,81	14,89 ± 3,07	44,68 ± 1,91	4,44 ± 4,04
Ácido Acético ($g \cdot L^{-1}$)	0,38 ± 0,01	1,59 ± 0,06	3,36 ± 0,08	3,22 ± 0,02	3,77 ± 0,15	3,34 ± 0,09	4,72 ± 0,07
ABE ($g \cdot L^{-1}$)	8,92 ± 0,39	3,79 ± 0,20	4,39 ± 0,36	5,22 ± 0,19	3,90 ± 0,51	4,52 ± 0,14	1,58 ± 0,87
Etanol ($g \cdot L^{-1}$)	0,91 ± 0,16	1,45 ± 0,15	1,27 ± 0,44	0,62 ± 0,12	1,19 ± 0,19	0,62 ± 0,13	1,04 ± 0,91
Butanol ($g \cdot L^{-1}$)	8,01 ± 0,04	2,35 ± 0,02	3,12 ± 0,35	4,60 ± 0,12	2,71 ± 0,33	3,90 ± 0,10	0,54 ± 0,13
Rendimento de butanol ($g \cdot g^{-1}$)	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,33 ± 0,10	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,05
Produtividade de butanol ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,17 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Etapa da Fermentação	1 (48 h)	2 (48 h)	3 (48 h)	3 (72 h)	3 (72 h)	3 (72 h)	3 (90 h)

Tabela 4.8. Desempenho das fermentações em bateladas repetidas com imobilização celular: Peça 3D – 1.

Parâmetro	**1ª Batelada**	**2ª Batelada**	**3ª Batelada**	**4ª Batelada**	**5ª Batelada**	**6ª Batelada**	**7ª Batelada**	**8ª Batelada**
Inicial ART ($g \cdot L^{-1}$)	33,55 ± 0,91	32,3 ± 1,71	34,47 ± 2,89	35,79 ± 0,98	32,68 ± 0,45	35,31 ± 0,99	32,50 ± 0,46	33,06 ± 0,32
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	18,18 ± 0,56	18,08 ± 0,81	19,83 ± 1,35	8,29 ± 0,21	7,44 ± 0,09	8,26 ± 0,24	7,35 ± 0,11	7,27 ± 0,09
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	8,75 ± 0,22	7,28 ± 0,46	7,25 ± 0,91	6,25 ± 0,20	5,86 ± 0,09	6,25 ± 0,25	5,52 ± 0,05	5,84 ± 0,05
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	5,66 ± 0,17	5,99 ± 0,39	6,35 ± 0,59	2,66 ± 0,11	2,71 ± 0,18	2,76 ± 0,11	2,46 ± 0,09	2,70 ± 0,04
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,50 ± 0,30	18,15 ± 0,50	16,28 ± 0,11	17,61 ± 0,40	16,79 ± 0,24	16,86 ± 0,21
Carga de xilose (%)	-	-	45,78 ± 1,12	50,72 ± 0,09	49,81 ± 0,36	49,88 ± 0,33	51,66 ± 0,08	51,00 ± 0,15
Residual ART ($g \cdot L^{-1}$)	1,45 ± 0,10	8,44 ± 2,09	15,96 ± 1,11	34,13 ± 0,38	29,66 ± 0,49	23,20 ± 2,77	17,62 ± 1,65	21,76 ± 2,85
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	0,73 ± 0,02	6,81 ± 1,49	3,02 ± 0,15	7,80 ± 0,07	7,23 ± 0,26	4,96 ± 1,04	2,15 ± 1,17	4,51 ± 1,52
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	0,35 ± 0,04	0,48 ± 0,07	1,55 ± 0,03	5,81 ± 0,16	3,87 ± 1,36	1,14 ± 0,60	0,68 ± 0,14	0,88 ± 0,05
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	0,33 ± 0,04	0,79 ± 0,58	1,14 ± 0,50	2,61 ± 0,14	2,44 ± 0,46	1,57 ± 0,43	1,15 ± 0,03	1,74 ± 0,32
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10,10 ± 0,66	17,50 ± 0,06	15,74 ± 0,33	15,26 ± 0,65	13,53 ± 0,54	14,40 ± 0,89
Carga de xilose (%)	-	-	63,30 ± 0,36	51,28 ± 0,46	53,08 ± 1,98	65,78 ± 4,82	76,79 ± 5,32	66,17 ± 5,03
Conversão ART(%)	95,68 ± 0,31	73,88 ± 5,03	38,69 ± 2,55	4,64 ± 1,63	9,25 ± 2,45	34,29 ± 6,86	45,79 ± 5,85	34,18 ± 8,63
Sacarose (%)	95,98 ± 0,08	62,36 ± 6,65	48,64 ± 3,52	6,00 ± 2,5	2,99 ± 3,17	39,86 ± 11,85	70,77 ± 16,41	38,02 ± 20,57
Glicose (%)	96,01 ± 0,52	93,35 ± 1,01	69,56 ± 1,75	6,92 ± 0,75	34,08 ± 24,26	81,70 ± 8,83	87,73 ± 2,71	84,95 ± 0,83
Frutose (%)	94,15 ± 0,84	86,79 ± 8,60	60,17 ± 17,42	2,69 ± 2,95	9,87 ± 12,91	43,15 ± 13,87	53,14 ± 2,31	35,69 ± 12,61
Xilose (%)	-	-	15,23 ± 4,73	3,59 ± 2,48	3,29 ± 1,76	13,34 ± 3,33	19,42 ± 4,27	14,61 ± 5,33
Ácido Acético ($g \cdot L^{-1}$)	0,43 ± 0,02	0,29 ± 0,08	1,75 ± 0,06	4,31 ± 0,13	4,04 ± 0,2	3,52 ± 0,21	3,4 ± 0,26	3,46 ± 0,07
BE ($g \cdot L^{-1}$)	9,05 ± 0,24	7,01 ± 0,86	2,55 ± 0,17	0,92 ± 0,03	1,28 ± 0,30	2,80 ± 0,73	3,59 ± 0,79	2,45 ± 0,67
Etanol ($g \cdot L^{-1}$)	0,88 ± 0,21	0,89 ± 0,13	1,21 ± 0,13	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,74 ± 0,41	0,70 ± 0,04	0,19 ± 0,10
Butanol ($g \cdot L^{-1}$)	8,17 ± 0,21	6,12 ± 0,81	1,34 ± 0,04	0,66 ± 0,03	1,02 ± 0,30	2,07 ± 0,56	2,89 ± 0,76	2,26 ± 0,70
Rendimento de butanol ($g \cdot g^{-1}$)	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,39 ± 0,14	0,34 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,04	0,20 ± 0,02
Produtividade de butanol ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,23 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Etapa da Fermentação	1 (36 h)	1 (36 h)	2 (36 h)	3 (36 h)	3 (60 h)	3 (60 h)	3 (60 h)	3 (60 h)

Tabela 4.9. Desempenho das fermentações em bateladas repetidas com imobilização celular: Peça 3D – 2.

Parâmetro	**1ª Batelada**	**2ª Batelada**	**3ª Batelada**	**4ª Batelada**	**5ª Batelada**	**6ª Batelada**	**7ª Batelada**
Inicial ART ($g \cdot L^{-1}$)	36,77 ± 1,01	32,19 ± 0,89	29,50 ± 0,44	34,59 ± 0,24	33,36 ± 0,25	33,17 ± 0,21	34,95 ± 2,40
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	20,25 ± 0,53	17,57 ± 0,40	16,51 ± 0,24	7,67 ± 0,11	7,48 ± 0,10	7,36 ± 0,04	8,21 ± 0,77
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	9,44 ± 0,33	7,53 ± 0,21	6,59 ± 0,21	6,05 ± 0,12	5,77 ± 0,12	5,85 ± 0,04	5,97 ± 0,32
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	6,01 ± 0,23	6,17 ± 0,26	5,53 ± 0,07	2,47 ± 0,14	2,63 ± 0,08	2,65 ± 0,02	3,33 ± 0,66
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,74 ± 0,12	17,99 ± 0,18	17,08 ± 0,14	16,93 ± 0,20	17,02 ± 0,62
Carga de xilose (%)	-	-	50,06 ± 0,18	52,02 ± 0,60	51,20 ± 0,13	51,05 ± 0,30	48,68 ± 1,67
Residual ART ($g \cdot L^{-1}$)	1,45 ± 0,42	1,69 ± 0,28	14,95 ± 0,54	23,73 ± 4,98	14,18 ± 1,23	23,50 ± 0,98	28,27 ± 7,07
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	0,84 ± 0,33	0,98 ± 0,25	2,10 ± 0,32	3,58 ± 2,94	1,39 ± 0,08	6,13 ± 0,43	6,14 ± 2,14
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	0,29 ± 0,05	0,33 ± 0,00	0,51 ± 0,03	0,92 ± 0,35	0,64 ± 0,01	1,04 ± 0,42	4,07 ± 2,66
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	0,27 ± 0,02	0,32 ± 0,01	1,35 ± 0,23	1,49 ± 0,13	1,38 ± 0,07	1,48 ± 0,02	2,29 ± 0,58
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10,88 ± 0,42	17,56 ± 1,43	10,69 ± 1,22	14,53 ± 0,19	15,44 ± 1,58
Carga de xilose (%)	-	-	72,79 ± 2,7	73,98 ± 8,7	75,4 ± 2,2	61,83 ± 2,05	54,63 ± 9,95
Conversão ART(%)	96,05 ± 1,17	94,76 ± 0,75	43,33 ± 2,43	31,37 ± 14,35	57,48 ± 3,98	29,15 ± 3,38	19,14 ± 15,33
Sacarose (%)	95,84 ± 1,61	94,40 ± 1,35	57,77 ± 6,15	53,40 ± 37,78	81,39 ± 0,86	16,71 ± 6,11	25,18 ± 20,32
Glicose (%)	96,93 ± 0,57	95,56 ± 0,13	90,29 ± 0,67	84,74 ± 6,09	88,89 ± 0,41	82,17 ± 7,01	31,71 ± 42,33
Frutose (%)	95,43 ± 0,52	94,88 ± 0,09	50,20 ± 9,41	39,77 ± 8,05	47,45 ± 1,55	44,04 ± 0,9	31,35 ± 4,52
Xilose (%)	-	-	17,59 ± 3,26	4,29 ± 3,74	37,38 ± 7,50	14,18 ± 1,89	9,26 ± 6,12
Ácido Acético ($g \cdot L^{-1}$)	0,52 ± 0,09	0,32 ± 0,36	1,60 ± 0,11	3,73 ± 0,24	3,04 ± 0,13	3,97 ± 0,04	4,50 ± 0,65
ABE ($g \cdot L^{-1}$)	8,64 ± 0,43	9,13 ± 0,21	4,00 ± 0,69	5,35 ± 0,62	5,06 ± 0,58	2,33 ± 0,86	2,48 ± 1,85
Etanol ($g \cdot L^{-1}$)	0,83 ± 0,09	1,45 ± 0,29	1,72 ± 0,53	1,45 ± 1,01	0,87 ± 0,31	0,97 ± 0,70	1,23 ± 0,52
Butanol ($g \cdot L^{-1}$)	7,81 ± 0,32	7,68 ± 0,50	2,28 ± 0,11	3,90 ± 1,24	4,18 ± 0,33	1,36 ± 0,55	1,26 ± 1,51
Rendimento de butanol ($g \cdot g^{-1}$)	0,22 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,36 ± 0,11	0,22 ± 0,02	0,14 ± 0,05	0,19 ± 0,09
Produtividade de butanol ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,02
Etapa da Fermentação	1 (36 h)	1 (36 h)	2 (36 h)	3 (36 h)	3 (60 h)	3 (60 h)	3 (60 h)

Na condição Bagaço – 2, somente a 1ª (etapa 1, batelada apenas com melaço), 4ª e 5ª bateladas (etapa 3, melaço diluído diretamente no hidrolisado hemicelulósico) apresentaram produção de butanol (Tabela 4.6), nas bateladas seguintes a produção foi de ~ 1,0 $g \cdot L^{-1}$.

As condições Bagaço – 2 e Peça 3D – 1 foram repetidas mudando apenas o tempo de fermentação de 36 h para 48 h por batelada. A condição Peça 3D – 2 similar à Peça 3D – 1, primeira e segunda batelada com melaço (etapa 1), apresenta maior conversão de açúcares ART na 1ª e 2ª batelada com melaço 96,05 e 94,76 % (Tabela 4.9), respectivamente, em comparação com a condição Peça 3D – 1, onde a conversão caiu de 95,68 (1ª batelada) para 73,88 % (2ª batelada). Este fato poderia supor que o microrganismo começa a sentir o impacto das bateladas repetidas, mas ao aumentar o tempo (condição Peça 3D – 2) na 2ª batelada (48 h) o microrganismo conseguiu fermentar mais açúcares. Contudo, na 3ª batelada a concentração de butanol caiu para 2,28 $g \cdot L^{-1}$ (etapa 2), como na condição Peça 3D – 1 (1,34 $g \cdot L^{-1}$), neste caso a troca do meio aconteceu 24 h após ter realizado a alimentação do hidrolisado hemicelulósico, então desde a 4ª batelada (início da etapa 3, alimentada com melaço diluído diretamente no hidrolisado hemicelulósico) o tempo de fermentação passou de 48 h para 72 h, e se evidenciou produção de butanol na 4ª e 5ª bateladas.

As condições Peça 3D – 2, primeira e segunda batelada com melaço (Tabela 4.9) e Bagaço – 3, primeira batelada com melaço (Tabela 4.7), mostraram aumento da conversão de açúcares e rendimento de butanol quando o tempo da batelada aumentou para 72 h na 4ª batelada (etapa 3). No entanto, ao notar que na 6ª batelada (360 h de fermentação) da condição Peça 3D – 2 a conversão de ART diminuiu para 29,15 % (na 5ª batelada estava em 57,48 %) e, para a mesma batelada, na condição Bagaço – 3 a conversão estava em 58,98 % então foi novamente decidido aumentar o tempo de fermentação para 90 h, na 7ª batelada, esperando alcançar maior produção e conversão de açucares. Desafortunadamente não aconteceu nenhuma produção de butanol nesta batelada e foi suspensa a fermentação.

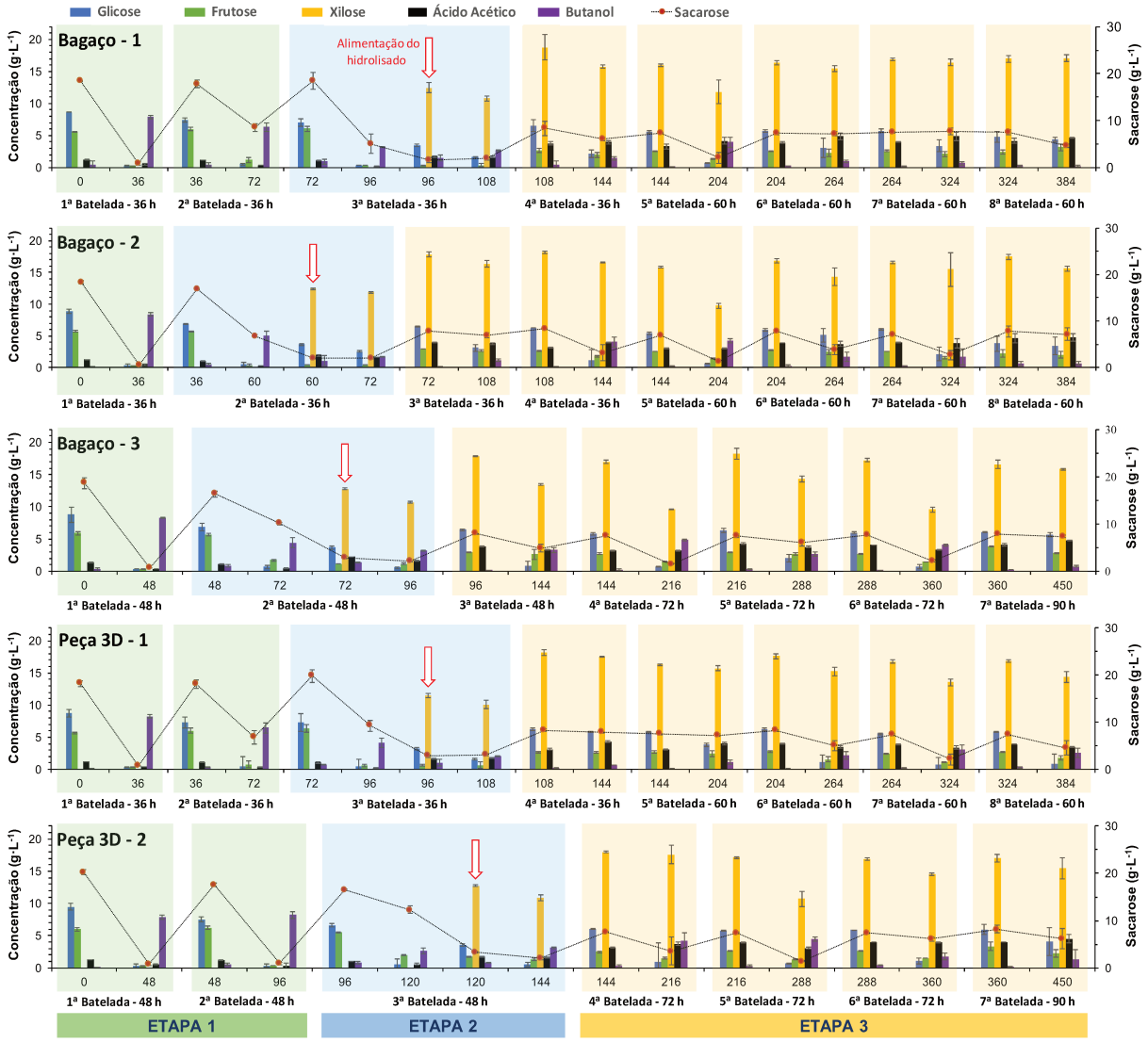


Figura 4.8. Concentração de açúcares, butanol e ácido acético durante a fermentação em batelada alimentada repetida.

Realizando uma análise para todas as condições testadas por etapas percebe-se como na etapa 1 (fermentação do melaço), os açúcares (30 - 40 $g \cdot L^{-1}$ ART) estavam praticamente esgotados (conversão de ART > 95 %) independentemente do tipo de agente imobilizador celular, especialmente quando o tempo da batelada era de 48 h. Quanto aos demais parâmetros de desempenho, na etapa 1 das condições Bagaço – 3 e Peça 3D – 2, a produção de butanol variou entre 7,68 e 8,01 $g \cdot L^{-1}$ tanto na 1ª quanto na 2ª batelada (Figura 4.8) (concentração do etanol permaneceu abaixo de 1 $g \cdot L^{-1}$). Além disso, nestas bateladas de 48 h o rendimento do butanol (0,22 - 0,25 $g \cdot g^{-1}$) e a produtividade (0,16 - 0,17 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) (Tabela 4.7 e Tabela 4.9) foram

semelhantes aos valores obtidos nos experimentos de desempenho do *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 com melaço sem imobilização celular de 72 h (M-40, item 4.1.2). Portanto, estes resultados sugerem que a etapa 1 cumpriu seu objetivo de proporcionar condições favoráveis para o crescimento e imobilização celular.

Na etapa 2 (fermentação em batelada alimentada por pulso), que foi concebida para ser uma etapa de transição para as condições de fermentação mais desafiadoras da etapa 3, a concentração final de butanol (1,14 - 2,35 $g \cdot L^{-1}$; Figura 4.8) em todas as condições foi semelhante aos valores obtidos na fermentação em batelada alimentada por pulso simples com imobilização celular de 72 h (Tabela 4.4). Mas a concentração de açúcares iniciais na etapa 2 (30 - 35 $g \cdot L^{-1}$) foi aproximadamente metade daquela na fermentação em batelada simples; consequentemente, o rendimento do butanol (0,20 - 0,27 $g \cdot g^{-1}$) na etapa 2 foi significativamente maior em comparação com a fermentação em batelada simples (~ 0,04 $g \cdot g^{-1}$; Tabela 4.4). Considerando que a fermentação foi inoculada com células apenas na 1ª batelada da etapa 1, os resultados da etapa 2 também confirmam que a etapa 1 cumpriu o seu objetivo. No entanto, a etapa 2 teve os mesmos problemas observados na fermentação em batelada alimentada por pulso simples: alta concentração de xilose residual (~ 11 $g \cdot L^{-1}$) e baixa produtividade de butanol (0,03 - 0,05 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$). Mesmo assim, a baixa produtividade do butanol não foi inesperada, uma vez que valores abaixo de 0,10 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ são frequentemente relatados em estudos sobre o uso de hidrolisados hemicelulósicos não-destoxificados para a produção de butanol por clostrídios solventogênicos (Wang e Chen, 2011; Lu *et al*., 2013; Kuittinen *et al*., 2018; Zetty-Arenas *et al*., 2019; Narayanasamy *et al*., 2020).

Na etapa 3, cada batelada foi iniciada com melaço diluído diretamente no hidrolisado hemicelulósico não-destoxificado (30 – 35 $g \cdot L^{-1}$). Consequentemente, como o hidrolisado não foi diluído, as células imobilizadas foram expostas à uma concentração maior de compostos inibidores microbianos derivados do bagaço. Tais condições, nos experimentos realizados no item 4.1.2, mostraram que o *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 não foi capaz de crescer e produzir butanol usando a mistura de hidrolisado e melaço em batelada simples sem imobilização celular. Neste esquema de batelada alimentada repetida com imobilização celular, as

células foram expostas às concentrações graduais crescentes de compostos inibidores. Por exemplo, a concentração inicial de ácido acético nas etapas 1 e 2 variou entre 0,13 - 2,48 $g \cdot L^{-1}$, e aumentou para 4 – 6 $g \cdot L^{-1}$ na etapa 3 (Figura 4.8). Como resultado, a cultura foi capaz de suportar o estresse do inibidor (não apenas do ácido acético, mas também principalmente dos compostos fenólicos) e a fermentação não cessou quando foi desafiada pelas condições da etapa 3. Notavelmente, a conversão de xilose média durante a etapa 3 na condição Bagaço – 3 (excluindo a última batelada, que falhou) foi de 36 % (Tabela 4.7) e superior ao (22,62 %; bagaço *in natura* 1:75 m/v) obtido no experimento de batelada alimentada por pulso simples com imobilização celular (Tabela 4.4). E embora a etapa 1 da condição Bagaço – 3 tenha apenas uma batelada com melaço, a conversão média da xilose na etapa 3 foi estatisticamente maior que os valores obtidos nas demais condições. Tal fato pode ser explicado pelo tempo estendido da batelada utilizado na condição Bagaço – 3, que foi o maior tempo de batelada em todas as etapas.

Embora os mesmos tempos de batelada estendidos tenham sido considerados na condição Peça 3D – 2 (uma condição com a vantagem de ter duas bateladas na etapa 1), em sua etapa 3 a conversão média de xilose (16 %) foi significativamente menor do que na condição Bagaço – 3. Assim, conforme observado nos experimentos de batelada alimentada por pulso simples com imobilização celular (item 4.2.2), o bagaço *in natura* teve melhor desempenho do que a peça 3D nos experimentos em batelada repetida. No entanto, apesar do desempenho inferior da peça 3D, os presentes estudos demonstraram que uma estrutura de poliamida impressa em 3D pode ser usada como um agente imobilizador celular para clostrídios solventogênicos (deve-se notar que a poliamida é um material amplamente utilizado na fabricação de aditivos).

Outros indicadores de desempenho que precisam ser destacados na condição Bagaço – 3 são o rendimento do butanol e a quantidade de butanol de 2G no produto final. Ao longo das três etapas (360 h; excluindo a última batelada, que falhou), o rendimento médio do butanol foi de 0,26 $g \cdot g^{-1}$ e estatisticamente maior do que o rendimento do butanol (0,15 $g \cdot g^{-1}$) obtido na fermentação de batelada alimentada por pulso simples usando o bagaço *in natura* como agente imobilizador (1:75 m/v) (item 4.2.2). Além disso, o rendimento do butanol foi estável (estatisticamente o mesmo)

durante as quatro bateladas da etapa 3 (Tabela 4.7). Em contraste, em estudos anteriores, o rendimento do butanol diminuiu durante os cultivos de batelada repetida de *C. beijerinckii* DSM 6423 (Vieira *et al*., 2020) e *C. acetobutylicum* CICC 8012 (Liu *et al*., 2019) imobilizado passivamente em bagaço de cana-de-açúcar e de *C . tyrobutyricum* CtΔack-adhE2 imobilizado em uma matriz fibrosa (Li *et al*., 2019). A quantidade de butanol de 2G (41 %) no butanol total produzido durante 360 h também aumentou em comparação com a fração (30 %) obtida na fermentação batelada alimentada por pulso simples com imobilização celular. Este aumento pode ser explicado pelo fato de que a conversão de xilose foi tão alta quanto ~ 45 % na 4ª e 6ª bateladas, e a utilização média de xilose em 360 h foi de 32 %. No entanto, apesar dos bons resultados, a conversão incompleta dos açúcares (conversão de ART variou entre 38 e 60 %), baixa concentração de butanol (3 – 5 $g \cdot L^{-1}$) e baixa produtividade (0,03 - 0,07 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) ainda são problemas a serem resolvidos para permitir a viabilidade econômica do processo.

De forma geral, os valores pouco estáveis ao longo do tempo da conversão de açúcares e concentração de butanol podem ser devido também ao ciclo de vida das células, este fenômeno sugere que as células iniciais para cada batelada eram capazes de dividir-se mais no meio e final de cada batelada, ou seja, seu ciclo de vida não coincidiria com o tempo da batelada (Liu *et al*., 2019). De igual maneira, Liu *et al*., (2019) indicam que parte das células imobilizadas se poderiam desprender do biofilme e alcançar o substrato fresco, assim teriam mais vitalidade do que as outras células e voltariam a crescer, causando assim estes resultados. Adicionalmente, pode-se observar como a concentração de butanol nas primeiras bateladas foi a mais alta em relação com ao etanol, mas nas últimas bateladas quando a produção de butanol diminuía a proporção de etanol aumentava. As condições Bagaço – 1 e 2, evidenciam concentrações altas de etanol quando a produção de butanol foi baixa, últimas três bateladas. Este fenômeno pode ser devido à uma transformação na via metabólica e indica que a capacidade da célula para produzir solventes diminuiu gradualmente com o passar das bateladas, sentindo assim o impacto do processo e não adaptando-se ao esquema de batelada repetida (Liu *et al*., 2019).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos realizados com a linhagem *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 para avaliar sua fermentabilidade em melaço mostraram que para uma concentração de 40 $g \cdot L^{-1}$ os açucares foram quase esgotados, independentemente da suplementação de nutrientes, alcançando uma conversão de 96 % e uma produção de butanol de 12,55 e 14,45 $g \cdot L^{-1}$, sem e com meio P2, respectivamente. O experimento com xilose obteve conversão do 75 %, assim confirmando o bom desempenho da linhagem na produção de butanol. Além disso, não se apresentou nenhuma produção de butanol nos testes com hidrolisado hemicelulósico (bruto e destoxificado por *overliming*) e em mistura direta com o melaço.

As diferentes proporções volumétricas (3:1, 3:1+P2 1.5:1, 0.75:1, 1:3) avaliadas nas fermentações com melaço em batelada alimentada por pulso com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar sem suplementação de nutrientes mostraram uma estratégia eficiente que permitiu a conversão do hidrolisado em butanol mesmo em presença dos inibidores, pois não foi realizado nenhum tratamento prévio de destoxificação. A estratégia operacional se beneficiou da capacidade do *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 de co-fermentar sacarose e xilose. Ao se verificar os açúcares consumidos para a produção do butanol, a xilose alcançou uma conversão de 89,63 (3:1) até 29,09 (1:3) %, portanto existiu consumo de açúcares de segunda geração. No entanto, observou-se que da primeira até a última proporção volumétrica se apresentou uma diminuição da conversão total de açúcares, rendimento, produtividade e concentração do butanol. Assim conclui-se que a quantidade de hidrolisado hemicelulósico fornecida à fermentação é limitada pela tolerância do microrganismo em relação aos inibidores presentes derivados do bagaço de cana-de-açúcar (particularmente os compostos fenólicos). O volume de hidrolisado hemicelulósico, produzido por pré-tratamento com ácido diluído, na fermentação deve ser pelo menos três vezes menor que o do melaço diluído. Independentemente desta restrição, a combinação de matérias-primas de primeira e segunda geração é uma estratégia promissora para melhorar a economia das

biorrefinarias de cana projetadas para produzir butanol a partir da fração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar.

Os testes experimentais desenvolvidos com imobilização celular comprovaram a adesão por parte das células *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 na superfície do bagaço *in natura* e da peça 3D. Quando integrada à imobilização celular ao esquema de batelada alimentada repetida foi evidenciada a conversão em butanol, de açúcares C5 (xilose) do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar não-destoxificado, no meio contendo melaço diluído diretamente no hidrolisado, o que não tinha acontecido em batelada simples. As condições experimentais Bagaço – 3 e Peça 3D – 2 mostraram produção de butanol e conversões de xilose entre 37,38 e 44,68 % após 360 h do início das fermentações em batelada repetida. Estes resultados foram obtidos nas bateladas alimentadas com melaço diluído diretamente no hidrolisado com suplementação nutricional (etapa 3). No entanto, as porcentagens de conversão individuais dos demais açúcares (sacarose, glicose e frutose) são maiores em comparação com a xilose, contribuindo também na produção final do butanol. Assim, pode-se observar que 41 % do butanol total produzido durante as 360 h de fermentação corresponde ao butanol de 2G na condição Bagaço – 3 (condição que apresentou os melhores resultados em comparação com as outras condições testadas). Desta forma, conclui-se que houve consumo de açúcares C5, provenientes do hidrolisado, e que no esquema de bateladas repetidas se conseguiu produzir butanol na presença de inibidores.

5.1. Conclusões

Da presente tese conclui-se que:

- O *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 não foi capaz de converter xilose em butanol a partir de hidrolisado hemicelulósico não-destoxificado de bagaço de cana-de-açúcar, nem quando o melaço foi diluído no hidrolisado hemicelulósico e suplementado com nutrientes em batelada

simples.

- Foi possível converter xilose em butanol a partir do hidrolisado hemicelulósico não-destoxificado no esquema de batelada alimentada por pulso ao evitar a incorporação dos inibidores na fase de adaptação do microrganismo e ter iniciado a fermentação somente com melaço diluído em água.
- As células do *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 foram imobilizadas na superfície do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e na peça 3D e mostraram uma melhora na conversão de xilose no processo em comparação com sistema de células livres.
- Foi desenvolvida uma tecnologia de fermentação para a produção de butanol no esquema de batelada alimentada repetida com imobilização celular, assim permitindo a conversão de xilose em butanol a partir do melaço diluído diretamente no hidrolisado hemicelulósico não-destoxificado de bagaço de cana-de-açúcar com suplementação nutricional.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Algumas sugestões para trabalhos futuros são apresentadas na continuação:

- O esquema utilizado de batelada alimentada por pulso para evitar os problemas associados aos inibidores do hidrolisado hemicelulósico foi benéfico. No entanto, quando aplicado ao esquema de batelada alimentada repetida, testadas nesta tese, o tempo após a alimentação e a batelada seguinte foi curto, pois foi evidenciada a baixa conversão de açúcares e produção de butanol ao ser incorporado o hidrolisado ao processo. Então poderia ser apropriado aumentar este tempo para obter melhores resultados nesta batelada. Juntamente com esta sugestão, outra condição experimental futura a ser testada em batelada alimentada repetida é iniciar a primeira batelada com a proporção melaço/hidrolisado (3:1),

posteriormente na segunda usar a proporção 1:3 e na terceira o meio com melaço diluído diretamente no hidrolisado, sem suplementação de nutrientes em todos os casos. Esta condição poderia ser mais extrema às testadas neste trabalho, mas poderia dar maior informação em relação ao desempenho e tolerância da linhagem *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

- Visando determinar melhores condições operacionais do processo de imobilização celular ao esquema de batelada alimentada repetida seria interessante avaliar o ciclo de vida do *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923, de forma que coincida com o tempo da batelada e logre a utilização eficiente do substrato entre bateladas. Ao mesmo tempo, como já indicado em outros trabalhos, avaliar possíveis mutações ou adaptações evolutivas do microrganismo durante o processo repetido de fermentação que visem prever a degradação do mesmo. Um estudo a ser incluído nesta parte seria também medir a atividade do microrganismo entre estes ciclos (capacidade de produção de butanol no tempo) por meio da força fermentativa, assim verificando o grau de inibição que se apresenta através das bateladas repetidas. Desta forma espera-se que os valores pouco estáveis ao longo do tempo da conversão, concentração de butanol e rendimento encontrados nesta tese sejam melhorados.
- Com o propósito também de otimizar as condições operacionais e obter melhores resultados, poderia ser incorporado ao esquema de batelada repetida uma etapa de lavagem (diluição com água e drenagem), preparo (destoxificação e reativação) ou adição de algum meio de recuperação nas células entre cada batelada. Desta forma poderia ser evitada a baixa conversão de sacarose e xilose que se apresentou entre algumas bateladas e que supõe-se que o microrganismo sentiria o impacto do processo, assim não adaptando-se a este.
- A utilização de matérias-primas lignocelulósicas sem destoxificação é importante para a produção rentável do butanol, semelhante ao uso de imobilizadores celulares de baixo custo e reutilizáveis. No entanto, para as condições testadas a linhagem *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM

14923 poderia não estar apresentando os melhores resultados. Outra sugestão a ser considerada é procurar outras linhagens robustas produtoras de butanol, por exemplo, em um estudo realizado com diferentes hidrolisados se evidenciou que a linhagem *Clostridium tyrobutyricum* CtΔack-adhE2 (modificada metabolicamente com tolerância melhorada ao butanol) mostrou resultados promissores na produção de butanol.

- Embora as concentrações de butanol obtidas neste trabalho estejam abaixo dos níveis de toxicidade do microrganismo, é importante considerar a remoção *in situ* do produto para aliviar sua inibição no processo e na atividade do microrganismo ao ser escalado para reatores de bancada. Por exemplo, um reator de leito fluidizado onde as células imobilizadas são mantidas em movimento pelo fluxo contínuo da corrente de alimentação e pela recirculação interna, poderia apresentar alta produtividade e neste aspecto, uma técnica promissora para a recuperação do produto é o vácuo (pode remover o butanol em taxas 10 vezes mais rápidas que o gás *stripping*). A integração desta técnica consistiria em uma câmara externa conectada ao reator através da qual o caldo fermentativo circulará, ao ser aplicado o vácuo os solventes serão vaporizados e extraídos da corrente líquida, de forma que o meio restante será devolvido ao fermentador. Desta forma, o vácuo melhoraria a eficiência energética do processo, além de ser uma operação simples, compatível com sólidos em suspensão, porque o sistema não possui partes físicas sujeitas à entupimento, e reduziria as águas residuais (vinhaça).
- No caso de ser escalado para reatores de bancada o esquema de batelada alimentada repetida deve-se considerar a medição de pH no processo e o controle na alimentação do hidrolisado hemicelulósico de acordo aos parâmetros cinéticos com o propósito de controlar o efeito do hidrolisado sobre a produção do butanol. Além disso, no caso de biorreatores contínuos estabelecer um parâmetro de controle para as células livres que não consigam ser imobilizadas passivamente aos agentes imobilizadores, pois poderiam estas estar interferindo na produção.

- Dois estudos complementares ao presente trabalho são a realização de uma análise de rotas metabólicas para a fermentação ABE que contemple açúcares de cinco e seis carbonos e um modelo cinético que considere as inibições por substrato [pois o microrganismo poderia estar sentindo o impacto do processo, não adaptando-se ao esquema de batelada repetida, devido ao fato de que a conversão da sacarose diminui (situação que não acontecia com meio somente de melaço e em batelada simples), enquanto a glicose e frutose são rapidamente consumidas] e pelos inibidores microbianos do hidrolisado hemicelulósico, gerados durante o pré-tratamento termoquímico da biomassa (furanos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos), de forma que possam ser padronizados os níveis ótimos de operação e se evitem perdidas em substrato, além da diminuição nas velocidades de reação intrínsecas ao processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agu, C.V.; Ujor, V.; Gopalan, V.; Ezeji, T.C. (2016). Use of Cupriavidus basilensis-aided bioabatement to enhance fermentation of acid-pretreated biomass hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*. J Ind Microbiol Biotechnol., 43(9):1215-26.

Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Protocols., 2(4):875-877.

Amiri, H.; Karimi, K. (2018). Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: Challenges and perspectives. Bioresource Technology., 270:702–721.

Bader, N.B.; Germec, M.; Turhan, I. (2020). *Scheffersomyces stipitis* biofilm reactor for ethanol production from acid-pretreated/detoxified and glucose- or xylose-enriched rice husk hydrolysate under a continuous process. Biomass Conversion and Biorefinery., Bioref. https://doi.org/10.1007/s13399-020-00611-6.

Balat, M.; Balat, H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. Applied Energy., 86, 2273–2282.

Balat, M.; Balat, M.; Kirtay, E.; Balat, H. (2009). Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. Energy Conversion and Management, v. 50, p. 3147–3157.

Baral, N.R.; Shah, A. (2014). Microbial inhibitors: formation and effects on acetone-butanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. Appl Microbiol Biotechnol., 98:9151–9172.

Bharathiraja, B.; Jayamuthunagai, J.; Sudharsanaa, T.; Bharghavi, A.; Praveenkumar, R.; Chakravarthy, M.; Yuvaraj, D. (2017). Biobutanol – An impending biofuel for future: A review on upstream and downstream processing tecniques. Renewable and Sustainable Energy Reviews., 68, 788–807.

Bizzo, W.A.; Lenço, P.C.; Carvalho, D.J.; Veiga, J.P.S. (2014). The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production. Renewable and Sustainable Energy Reviews., 29, 589-603.

Cai, D.; Chang, Z.; Gao, L.; Chen, C.; Niu, Y.; Qin, P.; Wang, Z.; Tan, T. (2015). Acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation integrated with simplified gas stripping using sweet sorghum bagasse as immobilized carrier. Chemical Engineering Journal., 277, 176–185.

Cai, D.; Li, P.; Chen, C.; Wang, Y.; Hu, S.; Cui, C.; Qin, P.; Tan, T. (2016). Effect of chemical pretreatments on corn stalk bagasse as immobilizing carrier of *Clostridium acetobutylicum* in the performance of a fermentation-pervaporation coupled system. Bioresource Technology., 220, 68–75.

Cai, D.; Zhang, T.; Zheng, J.; Chang, Z.; Wang, Z.; Qin, P.; Tan, T. (2013). Biobutanol from sweet sorghum bagasse hydrolysate by a hybrid pervaporation process. Bioresour Technol., 145, 97–102.

Chang, Z.; Cai, D.; Wang, C.; Li, L.; Han, J.; Qin, P.; Tan, T. (2014). Sweet sorghum bagasse as an immobilized carrier for ABE fermentation by using *Clostridium acetobutylicum* ABE 1201, The Royal Society of Chemistry., 4, 21819–21825.

Chen, Y.; Zhou, T.; Liu, D.; Li, A.; Xu, S.; Liu, Q. (2013). Production of butanol from glucose and xylose with immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnol Bioprocess Eng., 18, 234–241.

Conceição, A.; Rodrigues, M.I.; França, D.; Machado, A.; Mello, L.; Pereira, N. (2019). Acetone–butanol–ethanol fermentation from sugarcane bagasse hydrolysates: Utilization of C5 and C6 sugars. Electronic Journal of Biotechnology., 42, 16–22

Dolejs, I.; Rebros, M.; Rosenberg, M. (2014). Immobilisation of *Clostridium* spp. for production of solvents and organic acids. Chemical Papers., 68: 1–14.

Dürre, P. (1998). New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. Appl Microbiol Bio-technol., 49, 639–648.

Ezeji, T.C.; Qureshi, N.; Blaschek, H.P. (2007). Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. Current Opinion in Biotechnology., 18, 220–227.

Fischer, C.R.; Klein-Marcuschamer, D.; Stephanopoulos, G. (2008). Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. Metabolic Engineering., 10, 295–304.

Grassi, M.C.B.; Carazzolle, M.F.; Nakagawa, B.T.; Ferrari, A.; Nagamatsu, S.; Santos, C.R.; Murakami, M.T.; Pirolla, R.A.S.; Pereira, G.A.G. (2018). New contributions

for industrial n-butanol fermentation: An optimized *Clostridium* strain and the use of xylooligosaccharides as a fermentation additive. Biomass and Bioenergy., 119:304–313.

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. Electronic Journal of Biotechnology., 42:16–22.

Humbird, D.; Davis, R.; Tao, L.; Kinchin, C.; Hsu, D.; Aden, A. (2011). Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol–dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. Technical report., NREL/TP-5100-47764.

Jang, Y.S.; Malaviya, A.; Cho, C.; Lee, J.; Lee, S.Y. (2012). Butanol production from renewable biomass by *Clostridia*. Bioresource Technology., 123, 653–663.

Jiang, L.; Wang, J.; Liang, S.; Wang, X.; Cen, P.; Xu, Z. (2009). Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreac- tor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. Bioresource Technology., 100, 3403–3409.

Jin, C.; Yao, M.; Liu, H.; Lee, C. F.; Ji, J. (2011). Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. Renewable and Sustainable Energy Reviews., 15, 4080–4106.

Jin, Y.L.; Speers, R.A. (1998). Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Research International., 31, 421–440.

Jones, D.T.; Woods, D.R. (1986). Acetone–butanol fermentation revisited. Microbiol Reviews., 50:484–524.

Jönsson, L.J.; Alriksson, B.; Nilvebrant, N.O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. Biotechnol for Biofuels., 6, 10.

Karel, S.F.; Libicki, S.B.; Robertson, C.R. (1985). The immobilization of whole cells-engineering principles. Chemical Engineering Science., 40, 1321–1354.

Kong, X.; He, A.; Zhao, J.; Wu, H.; Jiang, M. (2015). Efficient acetone–butanol–ethanol production (ABE) by *Clostridium acetobutylicum* XY16 immobilized on chemically modified sugarcane bagasse. Bioprocess Biosyst. Eng., 38:1365–1372.

Kourkoutas, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I.M.; Marchant, R.; Koutinas, A.A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. Food Microbiology, 21, 377–397.

Kuittine, S.; Yang, M.; Kaipiainen, E.; Villa, A.; Keinanen, M.; Vepsalainen, J.; Pappinen, A.; (2018). Acetone-butanol-ethanol fermentation of non-detoxified dilute acid extracted hemicellulosic hydrolysate from the short-rotation coppice *Salix schwerinii* E. Wolf. Bioresources., 13, 5225–5240.

Kujawska, A.; Kujawski, J.; Bryjak, M.; Kujawski, W. (2015). ABE fermentation products recovery methods – A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews., 48, 648–661.

Li, J.; Du, Y.; Bao, T.; Dong, J.; Lin, M.; Shim, H.; Yang, S. (2019). n-Butanol production from lignocellulosic biomass hydrolysates without detoxification by *Clostridium tyrobutyricum* Δack-adhE2 in a fibrous-bed bioreactor. Bioresource Technology., 289, 121749.

Lino, F.S.O.; Basso, T.O.; Sommer, M.O.A. (2018). A synthetic medium to simulate sugarcane molasses. Biotechnol Biofuels., 11:221.

Liu, J.; Lin, Q.; Chai, X.; Luo, Y.; Guo, T. (2018). Enhanced phenolic compounds tolerance response of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 by inactivation of Cbei_3304. Microb Cell Fact., 17: 35.

Liu, Z.; Ying, Y.; Li, F.; Ma, C.; Xu, P. (2010). Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 37 (5), 495–501.

Liu, J.; Zhou, W.; Fan, S.; Qiu, B.; Wang, Y.; Xiao, Z. (2019). Cell degeneration and performance decline of immobilized *Clostridium acetobutylicum* on bagasse during hydrogen and butanol production by repeated cycle fermentation. International Journal of Hydrogen Energy., 44, 26204-26212.

Lu, C.; Dong, J.; Yang, S.T. (2013). Butanol production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation-gas stripping process. Bioresource Technology., 143, 467–475.

Magalhães, B.L.; Grassi, M.C.B.; Pereira, G.A.G.; Brocchi, M. (2018). Improved n-butanol production from lignocellulosic hydrolysate by *Clostridium* strain

screening and culture medium optimization. Biomass and Bioenergy., 108:157–166.

Mariano A.P.; Dias M.O.S.; Junqueira T.L.; Cunha M.P.; Bonomi A.; Maciel Filho R. (2013). Utilization of pentoses from sugarcane biomass: techno-economics of biogas vs. butanol production. Bioresource Technology., 142, 390–399.

Mariano, A.P.; Ezeji, T.C.; Qureshi, N. (2015). Butanol production by fermentation: efficient bioreactors. In: Snyder, S.W. (Ed.). Commercializing Biobased Products: Opportunities, Challenges, Benefits, and Risks. IL, USA: Royal Society of Chemistry, p. 48–70.

Mariano, A.P.; Maciel Filho, R. (2012). Improvements in biobutanol fermentation and their impacts on distillation energy consumption and wastewater generation. BioEnergy Research., 5, 504–514.

Mariano, A.P.; Tomasella, R.C.; Martino, C.D.; Maciel Filho, R.; Seleghim, M.H.R.; Contiero, J.; Angelis, D.F. (2009). Aerobic biodegradation of butanol and gasoline blends. Biomass and bioenergy., 33, 1175–1181.

Meza, J.J.O. Evaluación financiera de proyectos. Tercera edición. Ecoe Ediciones, p. 360. Bogotá, D.C., Colombia, 2013.

Mohagheghi, A.; Ruth, M.; Schell, D. (2006). Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. Process Biochemistry., 41, 1806–1811.

Moon, H.G.; Jang, Y.; Cho, C.; Lee, J.; Binkley, R.; Lee, S.Y. (2016). One hundred years of clostridial butanol fermentation. FEMS Microbiology Letters, 2016, Vol. 363, No. 3.

Narayanan, V.; Nogué, V.S.; Van Niel, E.W.J.; Gorwa-Grauslund, M.F. (2016). Adaptation to low pH and lignocellulosic inhibitors resulting in ethanolic fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. AMB Express., 6, 59.

Narayanasamy, S.; Chan, K.L.; Cai, H.; Abdul Razak, A.H.B.; Tay, B.K.; Miao, H. (2020). Biobutanol production from sugarcane bagasse by *Clostridium beijerinckii* strains. Biotechnology and Applied Biochemistry., doi:10.1002/bab.1865.

Plaza, P.E.; Gallego-Morales, L.J.; Peñuela-Vásquez, M.; Lucas, S.; García-Cubero, M.T.; Coca, M. (2017). Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*. Bioresource Technology., 244, 166–174.

Poehlein, A.; Solano, J.D.M.; Flitsch, S.K.; Krabben, P.; Winzer, K.; Reid, S.J.; Jones, D.T.; Green, E.; Minton, N.P.; Daniel, R.; Dürre, P. (2017). Microbial solvent formation revisited by comparative genome analysis. Biotechnol Biofuels., 10:58.

Pratto, B.; Chandgude, V.; Sousa Junior, R.; Cruz, A. J. G.; Bankar, S. (2020). Biobutanol production from sugarcane straw: Defining optimal biomass loading for improved ABE fermentation. Industrial Crops & Products., 148, 112265.

Qureshi, N.; Annous, B.A.; Ezeji, T.C.; Karcher, P.; Maddox, I.S. (2005). Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. Microbial Cell Factories., 4:24.

Qureshi, N.; Ezeji, T.C. (2008). Butanol, 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass): Recent progress in technology. Biofuel, Bioproducts & Biorefining (Biofpr)., 2, 319–330.

Qureshi, N.; Saha, B.C.; Dien, B.; Hector, R.E.; Cotta, M.A. (2010). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: part I—use of barley straw hydrolysate. Biomass Bioenergy., 34(4):559–565.

Qureshi, N.; Saha, B.C.; Klasson, K.T.; Liu, S. (2018). High solid fed-batch butanol fermentation with simultaneous product recovery: Part II-process integration. Biotechnology Progress., 34(4):967-972.

Raganati, F.; Procentese, A.; Olivieri, G.; Russo, M.E.; Gotz, P.; Salatino, P.; Marzocchella, A. (2016). Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a series of packed bed biofilm reactors. Chemical Engineering Science., 152, 678–688.

Ranjan, A.; Moholkar, V.S. (2013). Comparative study of various pretreatment techniques for rice straw saccharification for the production of alcoholic biofuels. Fuel., 112, 567–571.

Schiel-Bengelsdorf, B.; Montoya, J.; Linder, S.; Dürre, P. (2013). Butanol fermentation. Environ Technol., 34, 1691–710.

Sita, H.A.; Mangunwardoyo, W.; Yopi, Y. (2016). Sugarcane Bagasse as a carrier for the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in bioethanol production. Makara J. Technol., 20/2, 73–81.

Su, H.; Liu, G.; He, M.; Tan, F. (2015). A biorefining process: sequential, combinational lignocellulose pretreatment procedure for improving biobutanol production from sugarcane bagasse. Bioresour. Technol., 187:149-160.

Sun, Z.; Liu, S. (2012). Production of n-butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Clostridia acetobutylicum* ATCC 824. Biomass Bioenergy., 39, 39–47.

Survase, S.A; Heiningen, A.; Granström, T. (2012). Continuous bio-catalytic conversion of sugar mixture to acetone–butanol–ethanol by immobilized *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. Applied Microbiology and Biotechnology., 93, 2309–2316.

Tangney, M.; Rousse, C.; Yazdanian, M.; Mitchell, W.J. (1998). Note: sucrose transport and metabolism in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. Journal of Applied Microbiology., 84, 914–919.

Taylor, J.R. An introduction to error analysis. The study of uncertainties in physical measurements. Second edition. University Science Books, p. 327. Sausalito, California, USA, 1982.

Todhanakasem, T.; Sangsutthiseree, A.; Areerat, K.; Young, G.M.; Thanonkeo, P. (2014). Biofilm production by *Zymomonas Mobilis* enhances ethanol production and tolerance to toxic inhibitors from rice bran hydrolysate. New Biotechnology., 31:451-459.

Todhanakasem, T. (2017). Developing microbial biofilm as a robust biocatalyst and its challenges. Biocatalysis and Biotransformation., 35, 86–95.

Vasconcelos, M.H.; Mendes, F.M.; Ramos, L.; Dias, M.O.S.; Bonomi, A.; Jesus, C.D.F.; Watanabe, M.D.B.; Junqueira, T.L.; Milagres, A.M.F.; Ferraz, A.; Dos Santos, J. C. (2020). Techno-economic assessment of bioenergy and biofuel production in integrated sugarcane biorefinery: Identification of technological bottlenecks and economic feasibility of dilute acid pretreatment. Energy., 199:117422.

Vieira, C.F.S.; Maugeri Filho, F.; Maciel Filho, R.; Mariano, A.P. (2020). Isopropanol-butanol-ethanol (IBE) production in repeated-batch cultivation of *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 immobilized on sugarcane bagasse. Fuel., 263-116708.

Wang, L.; Chen, H.Z. (2011). Increased fermentability of enzymatically hydrolyzed steam-exploded corn stover for butanol production by removal of fermentation inhibitors. Process Biochem., 46, 604–607.

Wang, Y.; Chiang, Y.; Chuang, P.; Chao, Y.; Li, S. (2016). Direct in situ butanol recovery inside the packed bed during continuous acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. Appl Microbiol Biotechnol., 100, 7449–7456.

Wang, P.; Zhang, J.; Feng, J.; Wang, S.; Guo, L.; Wang, Y.; Lee, Y.; Taylor, S.; McDonald, T.; Wang, Y. (2019). Enhancement of acid re-assimilation and biosolvent production in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* through metabolic engineering for efficient biofuel production from lignocellulosic biomass. Bioresource Technology., 281, 217–225.

Yao, D.; Dong, S.; Wang, P.; Chen, T.; Wang, J.; Yue, Z.; Wang, Y. (2017). Robustness of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* for acetone-butanol-ethanol production: Effects of lignocellulosic sugars and inhibitors. Fuel., 208, 549–557.

Yen, H.W.; Li, R.J.; Ma, T.W. (2011). The development process for a continuous acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by immobilized *Clostridium acetobutylicum*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers., 42, 902–907.

Yu, J.L.; Zhang, X.; Tan, T.W. (2007). A novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. Journal of Biotechnology., 129, 415–20.

Zajkoska, P.; Rebroš, M.; Rosenberg, M. (2013). Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology., 97, 1441–1455.

Zetty-Arenas, A.M.; Alves, R.F.; Portela, C.A.F.; Mariano, A.P.; Basso, T.O.; Tovar, L.P.; Maciel Filho, R.; Freitas, S. (2019). Towards enhanced n-butanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate: Strain screening, and the effects of sugar concentration and butanol tolerance. Biomass and Bioenergy., 126:190–198.

Zhang, Y.; Ma, Y.; Yang, F.; Zhang, C. (2009). Continuous acetone–butanol–ethanol production by corn stalk immobilized carrier. J. Ind. Microbiol Biotechnol., 36, 1117–1121.

Zhang, Y.; Xia, C.; Lu, M.; Tu, M. (2018). Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. Biotechnol Biofuels., 11:178.

Zhuang, W.; Liu, X.; Yang, J.; Wu, J.; Zhou, J.; Chen, Y.; Liu, D.; Ying, H. (2017). Immobilization of *Clostridium acetobutylicum* onto natural textiles and its fermentation properties. Microbial Biotechnolog., 10, 502–512.

Zhuang, W.; Yang, J.; Wu, J.; Liu, D.; Zhou, J.; Chen, Y.; Ying, H. (2016). Extracellular polymer substances and the heterogeneity of *Clostridium acetobutylicum* biofilm induced tolerance to acetic acid and butanol. RSC Advances., 6, 33695–33704.

APÊNDICE A – Experimentos complementares

Além dos experimentos e resultados apresentados nesta tese de doutorado foram realizadas as atividades seguintes:

- Curvas de crescimento das linhagens *C. saccharoperbutylacetonicum* DSMZ 2152 (ATCC 27022), *C. acetobutylicum* DSMZ 792 (ATCC 824) e *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 para estabelecer os tempos do pre-inóculo e inóculo (Figura A.1).

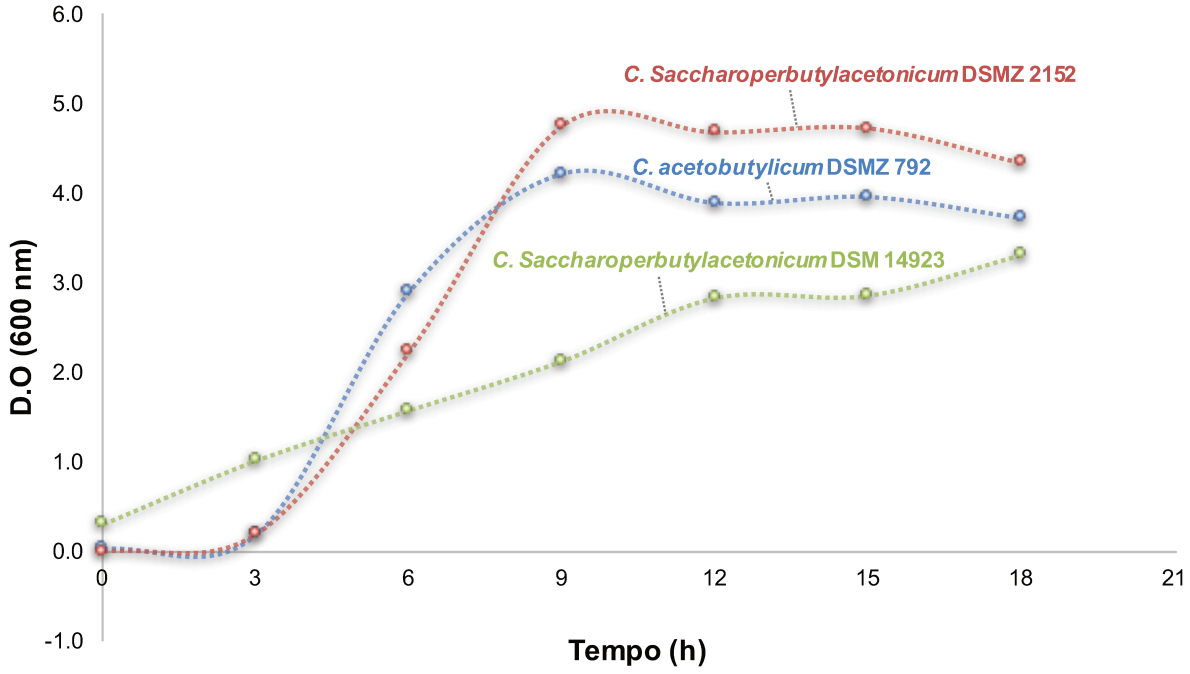


Figura A.1. Curvas de crescimento.

- Avaliação da fermentabilidade das linhagens *C. saccharoperbutylacetonicum* DSMZ 2152 (glicose, xilose, melaço puro e melaço com adição dos nutrientes do meio P2, Tabela A.1) e *C. acetobutylicum* DSMZ 792 (meios com glicose e xilose, Tabela A.2). No entanto, os resultados obtidos não cumpriram as expectativas e foi adquirida a linhagem *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923, com a qual foi desenvolvido o estudo.

Tabela A.1. Desempenho do *C. saccharoperbutylacetonicum* DSMZ 2152 (ATCC 27022) considerando diferentes fontes de carbono.

Parâmetro	**G-P2**	**X-P2**	**M**	**M-P2**
Inicial ART ($g \cdot L^{-1}$)	64,75	62,34	78,18	79,52
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-	55,75	55,27
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	64,75	-	9,37	11,20
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-	10,12	10,14
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	-	62,34	-	-
Residual ART ($g \cdot L^{-1}$)	23,19	46,54	61,87	61,60
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-	53,38	53,04
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	23,19	-	0,27	0,32
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-	5.41	5,44
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	-	46,54	-	-
Conversão ART (%)	64,18	25,35	20,86	22,54
Sacarose (%)	-	-	4,26	4,03
Glicose (%)	64,18	-	97,17	97,15
Frutose (%)	-	-	46,51	46,34
Xilose (%)	-	25,35	-	-
Ácido Acético ($g \cdot L^{-1}$)	1,68	1,32	1,50	2,59
Etanol ($g \cdot L^{-1}$)	1,64	1,80	2,44	2,50
Butanol ($g \cdot L^{-1}$)	6,17	2,41	4,22	3,49
Rendimento de butanol ($g \cdot g^{-1}$)	0,15	0,15	0,26	0,19
Produtividade de butanol ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,10	0,04	0,07	0,06

G: fermentação de glicose; X: fermentação de xilose; M: fermentação de melaço; P2: adição de nutrientes do meio P2.

Tempo de fermentação 60 h.

Tabela A.2. Desempenho do *C. acetobutylicum* DSMZ 792 (ATCC 824) considerando diferentes fontes de carbono.

Parâmetro	**G-P2**	**X-P2**
Inicial ART ($g \cdot L^{-1}$)	64,25	62,14
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	64,25	-
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	-	62,14
Residual ART ($g \cdot L^{-1}$)	44,73	43,49
Sacarose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-
Glicose ($g \cdot L^{-1}$)	44,73	-
Frutose ($g \cdot L^{-1}$)	-	-
Xilose ($g \cdot L^{-1}$)	-	43,49
Conversão ART (%)	30,39	30,00
Sacarose (%)	-	-
Glicose (%)	30,39	-
Frutose (%)	-	-
Xilose (%)	-	30,00
Ácido Acético ($g \cdot L^{-1}$)	0,69	0,81
Etanol ($g \cdot L^{-1}$)	4,49	3,31
Butanol ($g \cdot L^{-1}$)	4,37	4,08
Rendimento de butanol ($g \cdot g^{-1}$)	0,22	0,22
Produtividade de butanol ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,07	0,07

G: fermentação de glicose; X: fermentação de xilose.

Tempo de fermentação 60 h.

- Armazenagem dos microrganismos (*C. saccharoperbutylacetonicum* DSMZ 2152 (ATCC 27022), *C. acetobutylicum* DSMZ 792 (ATCC 824) e *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923) em forma de esporos e em suspensões celulares em solução de glicerol (40 % v/v) armazenados em criotubos (-80 °C). Concluindo que os testes indicados anteriormente apresentaram melhor desempenho quando foram armazenados em criotubos.

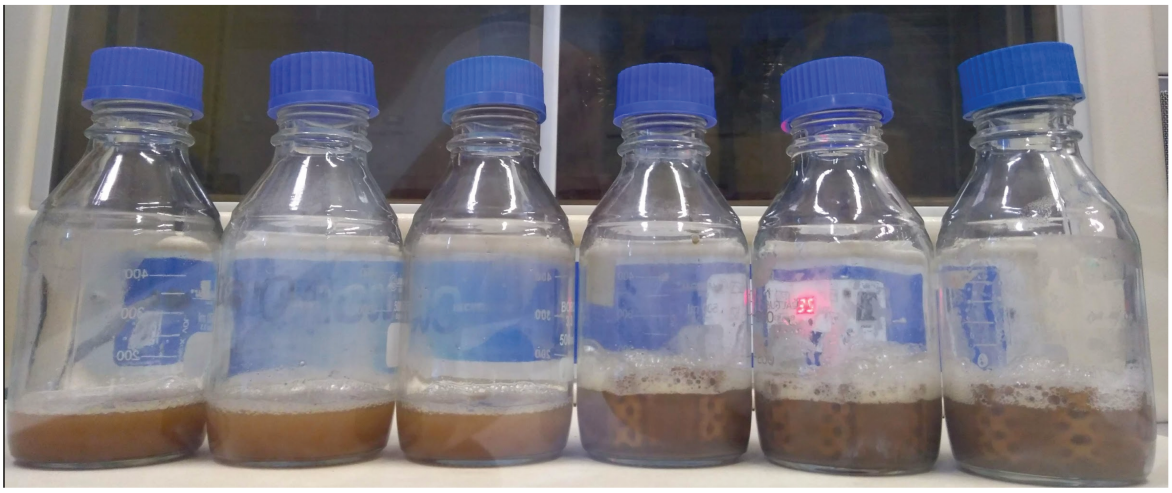
- Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído (1 % v/v, 121 °C por 90 min) em autoclave para produzir hidrolisado hemicelulósico, no entanto, foi selecionado o produzido na planta piloto no

Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) (CNPEM, Campinas, SP, Brasil).

- Testes preliminares em batelada alimentada por pulso com melaço diluído que possuíam uma quantidade inicial de açúcares de 40 e 60 $g \cdot L^{-1}$ com e sem adição de suplementação nutricional (meio P2). Além disso, foi testado um esquema de batelada alimentada por pulso para a condição experimental com a proporção volumétrica de 1:3 (melaço/hidrolisado), contendo a maior quantidade de hidrolisado, onde o hidrolisado foi alimentado às 24, 36, 48 h.

APÊNDICE B – Fermentações com imobilização celular

a. t = 24 h (antes de alimentar o hidrolisado hemicelulósico)



b. t = 24 h (após alimentação do hidrolisado hemicelulósico)

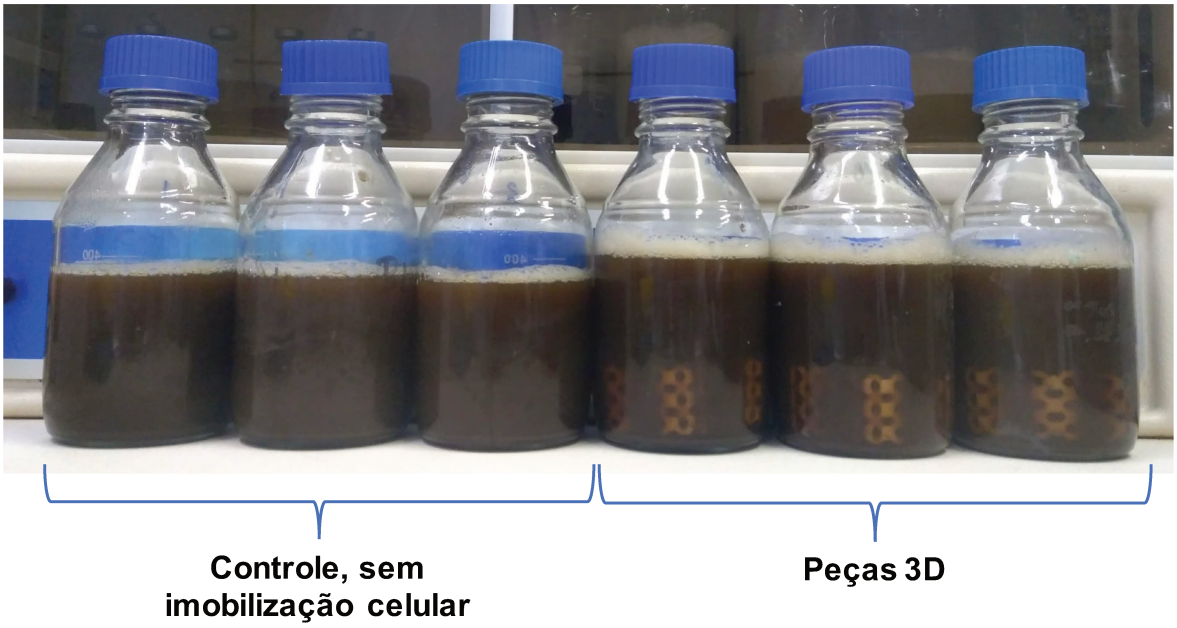
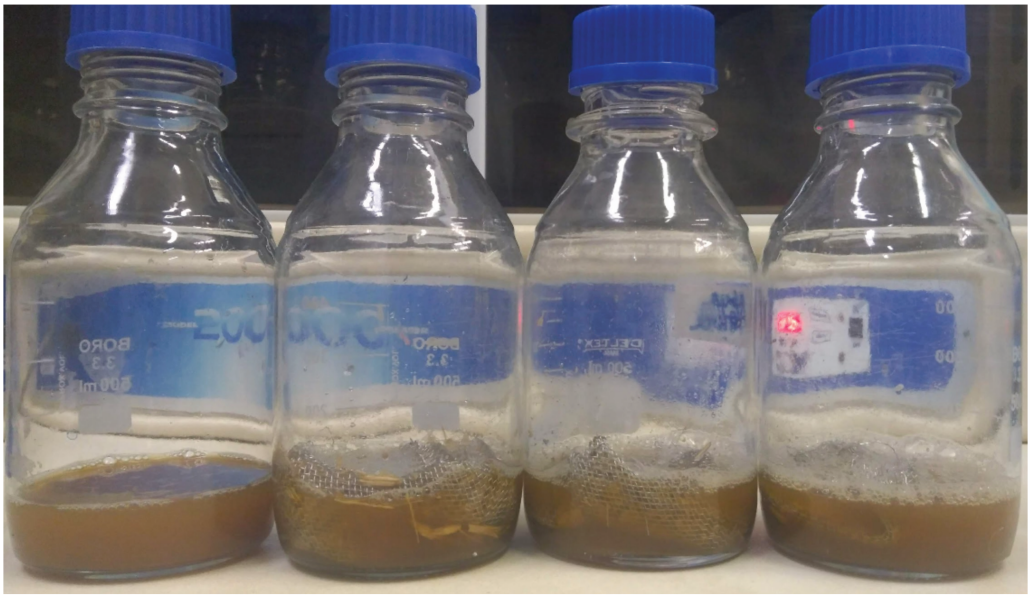


Figura B.1. Frascos sem imobilização e com peças 3D.

a. t = 24 h (antes de alimentar o hidrolisado hemicelulósico)



b. t = 24 h (após alimentação do hidrolisado hemicelulósico)

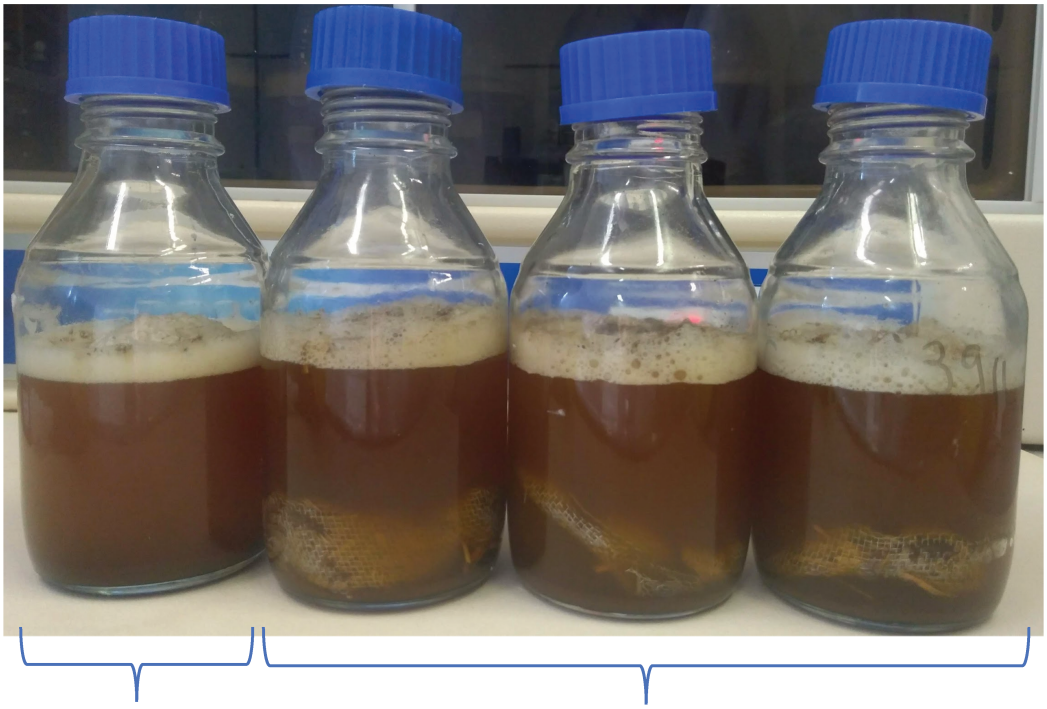


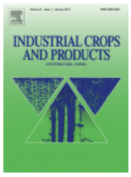
Figura B.2. Frascos sem imobilização e com bagaço *in natura*.

APÊNDICE C – Permissão para usar o conteúdo do artigo 1

Permissão para usar o conteúdo do artigo 1 - Chacón, S.J.; Matias, G.; Vieira, C.F.S.; Ezeji, T.C.; Maciel Filho, R.; Mariano, A.P., 2020. Enabling butanol production from crude sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by batch-feeding it into molasses fermentation. Industrial Crops & Products, 155, 112837.

Copyright Clearance Center | RightsLink®

Home | Help | Email Support | Sign in | Create Account



Enabling butanol production from crude sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by batch-feeding it into molasses fermentation

Author:
Suranny Jiménez Chacón,Gabriela Matias,Carla Ferreira dos Santos Vieira,Thaddeus Chukwuemeka Ezeji,Rubens Maciel Filho,Adriano Pinto Mariano

Publication: Industrial Crops and Products

Publisher: Elsevier

Date: 1 November 2020

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights

BACK | CLOSE WINDOW

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

APÊNDICE D – Permissão para usar o conteúdo do artigo 2

Permissão para usar o conteúdo do artigo 2 - Chacón, S.J.; Matias, G.; Ezeji, T.C.; Maciel Filho, R.; Mariano, A.P., 2020. Three-stage repeated-batch immobilized cell fermentation to produce butanol from non-detoxified sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates. Bioresource Technology, 321, 124504.

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Dec 08, 2020

This Agreement between Dr. Suranny Jiménez Chacón ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4964540004546
License date	Dec 08, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Bioresource Technology
Licensed Content Title	Three-stage repeated-batch immobilized cell fermentation to produce butanol from non-detoxified sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates
Licensed Content Author	Suranny Jiménez Chacón, Gabriela Matias, Thaddeus Chukwuemeka Ezeji, Rubens Maciel Filho, Adriano Pinto Mariano
Licensed Content Date	Available online 7 December 2020
Licensed Content Volume	n/a
Licensed Content Issue	n/a

Licensed Content Pages	1
Start Page	124504
End Page	
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Circulation	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	Desenvolvimento de tecnologia de fermentação para a produção de butanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: integrando imobilização celular e batelada alimentada repetida
Institution name	University of Campinas (UNICAMP)
Expected presentation date	Dec 2020
Specific Languages	Portuguese
Requestor Location	Dr. Suranny Jiménez Chacón Avenida Albert Einstein, 500 Campinas, São Paulo 13083-852 Brazil Attn: Dr. Suranny Jiménez Chacón
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Billing Type	Invoice
Billing Address	Dr. Suranny Jiménez Chacón Avenida Albert Einstein, 500 Campinas, Brazil 13083-852 Attn: Dr. Suranny Jiménez Chacón
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk here). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict

between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation**: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website**: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).
Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).
If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
    - via their non-commercial person homepage or blog
    - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
    - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
    - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
    - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
    - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
    - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.
Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.
If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.
Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.
The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.
If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made

of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by/4.0.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. **Other Conditions**:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.