DOSSIÊ

PRODUÇÃO DE BUTANOL E ETANOL A PARTIR DA MANIPUEIRA

BUTANOL AND ETHANOL PRODUCING FROM CASSAVA WASTEWATER

Marianne Akemi Neroni Chogi[1]
Ana Carolina Vieira Araújo[2]
Ariovaldo José da Silva[32]
Iolanda Cristina Silveira Duarte[4]

Submissão: 03/08/2017 Aceite: 17/09/2017

Resumo: O objetivo desse estudo foi avaliar a influência de diferentes inóculos na produção de butanol e etanol a partir de manipueira. Os inóculos utilizados foram *Clostridium beijerinckii* e esterco bovino. Somente a cultura de *C. beijerinckii* produziu butanol com rendimento de 0,014 $g.g^{-1}$ e taxa de produtividade igual a 0,002 $g/L.h^{-1}$. Etanol foi produzido pelo esterco bovino com rendimento 0,51 $g.g^{-1}$ e taxa de produtividade igual a 0,002 $g/L.h^{-1}$.

Palavras-chave: Butanol. Etanol. Esterco Bovino. Manipueira.

Abstract: The objective of this study was to evaluate the influence of different inocula on the production of butanol and ethanol from cassava wastewater. The inoculums used were *Clostridium beijerinckii* and cattle manure. Only the culture of *C. beijerinckii* produced butanol in yield of 0.014 $g.g^{-1}$ and yield rate equal to 0.002 $g/L.h^{-1}$. Ethanol was produced by cattle manure in yield of 0.51 $g.g^{-1}$ and yield rate equal to 0.002 $g/L.h^{-1}$.

Keywords: Butanol. Ethanol. Cattle Manure. Cassava Wastewater

[1] Mestrado. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), marianneakemi@hotmail.com
[2] Doutorado. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), acvaraujo@gmail.com
[3] Doutorado. Universidade de Campinas (Unicamp), ariovaldo.silva@feagri.unicamp.br
[4] Doutorado. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), iolanda@ufscar.br

Introdução

O butanol e etanol produzidos pela fermentação Álcool/Butanol/Acetona (ABE) são importantes alternativas de combustíveis em relação ao cenário atual de consumo e poluição por combustíveis fósseis (Sirisantimethakom et al., 2016).

A problemática dessa fermentação está relacionada a seu custo de produção, já que grande parte dos substratos utilizados competem diretamente com a base alimentar humana (Kennes et al., 2016). Geralmente são utilizados na fermentação substratos ricos em carboidratos, farinha e amido de milho, arroz, mandioca ou trigo, produtos que podem ser hidrolisados em açúcares fermentáveis. Outra fonte do processo fermentativo são os açúcares como glicose, sacarose, xilose, celobiose, entre outros (Chen et al., 2013).

Recentes pesquisas têm utilizado como substrato diferentes fontes ricas em carboidratos, mas que necessitam de um pré-tratamento (Harde et al., 2016) com a finalidade de disponibilizar esses carboidratos em substratos fermentáveis por esses micro-organismos. Fontes como palha de arroz, palha de milho, resíduos de madeira, resíduos da indústria de mandioca, resíduos da indústria de leite, resíduos da indústria sucroalcooleira, e diversas outras indústrias (Ibrahim et al., 2015; Kumar & Gayen, 2011), têm sido utilizadas como substratos para a produção ABE.

É importante ressaltar que essas fontes alternativas se tratam de resíduos que na sua grande maioria não tem alternativa de uso e são descartados em solos ou em rios seguindo os padrões de descarte descritos na legislação, é uma matéria prima com alto valor agregado e, portanto, passível de reutilização.

Um resíduo muito produzido é a água residuária do processamento da mandioca em farinha e amido. Esse resíduo apresenta um alto teor de carboidratos (O-Thong et al., 2011), e de cianeto, o qual é tóxico para os humanos e animais (Kaewkannetra, 2009). A maioria do resíduo gerado

geralmente é descartada no solo em forma de irrigação das plantações de mandioca ou é oferecido aos animais (Ribas & Barana, 2003).

O presente estudo teve por objetivo utilizar a manipueira (resíduo do processamento de mandioca) para a produção de butanol e etanol.

Material e Métodos

O experimento foi realizado com dois inóculos, *C. beijerinckii* ATCC 10132 (CB) e esterco bovino (EB), a produção de ambos foi avaliada quando alimentados com manipueira com demanda química de oxigênio (DQO) de 5g. L^{-1}. O inóculo EB foi submetido a dois diferentes ensaios um no qual foi oferecido como substrato apenas a manipueira (EBS) e outro que o substrato foi enriquecido com o meio solvetogênico (EBE).

C. beijerinckii foi ativado em meio RCM (Reinforced Clostridial Media) a 37 °C. Após 48 h de crescimento foram repicadas em 800 mL do mesmo meio e incubadas nas mesmas condições, quando a leitura de OD 600nm da cultura alcançou 0,5-0,6 nm foi incubada nos reatores.

O inóculo de esterco bovino (EB) (10 g) foi inoculado em 150 mL de meio PYG (Peptone-Yest extract-Glucose), incubado a 37 °C por 24 h. Após esse período a cultura foi submetida a um choque-térmico a 90 °C em banho-maria por 10 min (Maintinguer et al., 2008) para selecionar as bactérias produtoras de endósporos. Com auxílio de uma seringa, 10 mL da cultura pré-tratada foram inoculados em 150 mL de meio RCM previamente fluxionado com gás N_2, incubados a 37 °C por 24 h e após esse período, 10 mL dessa cultura foram injetados em meio RCM seguindo as mesmas condições de preparo e incubação.

Essa cultura pré-tratada foi submetida a análise de PCR específico para o gênero *Clostridium* utilizando os *primers* SJ-F e SJ-R, para a confirmação da presença desse grupo (HU et al., 2014). A extração do DNA foi realizada

seguindo o protocolo de extração do kit para bactérias gram-positivas DNA GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo Scientific).

O substrato escolhido para os ensaios de produção de butanol e etanol foi a manipueira de uma fábrica de farinha localizada no município de Araras - SP. Esse efluente apresentou as seguintes características: pH 5,25, sólidos totais 64,75 g. L^{-1}, sólidos totais voláteis 49,67 g. L^{-1}, total de açúcar redutor 20 g. L^{-1}, DQO95,33 g. L^{-1}. A manipueira foi armazenada sob refrigeração (-20 °C).

Para tornar o amido mais disponível realizou-se a hidrolise da manipueira (Rosa et al., 2014), o pH foi ajustado para 6,0 com solução NaOH 10 M e amostras de 40 mL foram centrifugadas por 5 minutos em rotação igual 7500 rpm. Uma alíquota dessa manipueira foi filtrada em filtro de acetato de celulose 0,2 μm com a finalidade de medir a DQO do resíduo. A DQO foi determinada utilizando o kit de DQO HACH 3-150 mg.L^{-1}.

Com a cultura de *C. beijerinckii* foram montados dois reatores com volume reacional de 1,5 L cada e um total de 3 L, sob anaerobiose com N_2, o pH foi ajustado para 6 com solução NaOH 10 M. Com o intuito de manter o meio estéril, a manipueira foi adicionada ao frasco com auxílio de uma seringa, um filtro de acetato de celulose 0,2 μm foi acoplado entre a seringa e a agulha a manipueira foi injetada nos frascos passando pelo filtro. Com os reatores montados, 20% (v/v) do inóculo CB com OD600nm de 0,5-06 foi inoculado nos reatores.

Para o inóculo EBE foi testado um meio de produção com a seguinte composição (g.L^{-1}): $MnSO_4$. H_20 (0,01), NaCl (0,01), $FeSO_4$. $7H_20$ (0,01), acetato de amônio (1,5), ácido para-aminobenzóico (0,001), biotina (0,00001), KH_2PO_4 (1,0), $K_2HPO_4.3H_2O$ (0,75), extrato de levedura (2,0). Para o inóculo EBS somente água destilada e manipueira.

Com uma seringa, amostras de 2 mL foram retiradas para as seguintes análises: pH, OD600nm, açúcares redutores com o método 3,5 ácido

dinitrosalicílico (DNS) (Miller et al., 1959) e biomassa seca ($g.L^{-1}$) (APHA, 2005). As medidas de DQO em $g.L^{-1}$ foram realizadas nos tempos 0 h e 106 h.

Os álcoois e ácidos orgânicos foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Penteado et al., 2012). A detecção dos ácidos foi realizada pelo detector ultravioleta e arranjo de diodos (UV-DAD) e a dos álcoois pelo detector de índice de refração (RID-10A). Para separação dos metabólitos utilizou-se a coluna Aminex HPX-87H a 43ºC e ácido sulfúrico 0,01 N como eluente com fluxo de 0,5 $mL.min^{-1}$, cada corrida tinha duração de 65 minutos, para a análise dos dados foi utilizado o software 42 Class-VP (SHIMADZU modelo Prominence).

Resultados e Discussão

A cultura de *C. beijerinckii* produziu 0,02 $g.L^{-1}$ de butanol em 12 h, com rendimento igual a 0,014 $g.g^{-1}$ e produção de 0,002 $g/L.h^{-1}$ (Tabela 1), outro fator que corrobora a produção de butanol nesse período é a diminuição do pH de 5,2 no início da operação para 4,9 após 12h. Porém, a partir das 12h de experimento a produção de butanol diminuiu. Desta forma, sob as condições utilizadas no período de 12 h é possível obter produção de butanol.

Para o inóculo EBE e EBS não ocorreu produção de butanol, o consumo de açúcar redutor e o crescimento do inóculo foram muito baixos. A diferença no crescimento, OD medido ao longo do ensaio, entre EBE e EBS deve-se ao fato do enriquecimento realizado com o inóculo EBE, mas quando comparado ao inóculo CB o EBE não apresenta valores de OD significativos.

Os inóculos EBE e EBS produziram apenas etanol sendo que o inóculo EBE apresentou rendimento mais elevado (0,51 $g.g^{-1}$) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados de produção de etanol e butanol obtidos na fermentação ABE com manipueira.

	Inóculos		
	C. beijerinckii	EBE	EBS
Tempo de fermentação (h)	12	106	12
Butanol ($g.L^{-1}$)	0,02	0	0
Etanol ($g.L^{-1}$)	0,69	0,17	0,026
Rendimento butanol ($g.g^{-1}$)	0,015	0	0
Rendimento etanol ($g.g^{-1}$)	0,51	0,51	0,21
Produção butanol ($g/L.h^{-1}$)	0,002	0	0
Produção etanol ($g/L.h^{-1}$)	0,06	0,002	0,002

A diferença de produção entre os inóculos EBE e EBS foi decorrência do meio suplementado que foi utilizado na fermentação de EBE.

A concentração inicial do substrato poderia ser mais elevada e provavelmente a produção de solventes pelo inóculo EBE poderia alcançar valores mais significativos de rendimento do que os encontrados.

É importante ressaltar que houve produção de ácido butírico (0,91 $g.L^{-1}$) em 12 horas de fermentação e etanol para cepa. Esse resultado mostra que existe a possibilidade de adequar as condições para que haja maior conversão de ácido butírico em butanol.

Um estudo realizado por Fathima et al. (2016) a produção de etanol foi de 4,6 $g.L^{-1}$ de etanol com rendimento 0,26 $g.g^{-1}$ utilizando *C. phytofermentans* na fermentação de biomassa de alga. Outro estudo (Lehamann & Eversloh, 2011) utilizando um mutante de *C. acetobutylicum* alcançou rendimento igual a 0,29 $g.g^{-1}$ de etanol e uma produção de 16,2 $g.L^{-1}$ de etanol, modificando a espécie de *C. thermocellum*. Thompson et al. (2015) conseguiram uma produção de etanol igual a 1,27 $g.L^{-1}$ com de rendimento 0,32 $g.g^{-1}$ com a melhor cepa modificada.

Segundo Fond et al. (1986), em taxas de alimentação baixas a concentração do meio se torna limitante, o que resulta em um crescimento mais

lento, uma transição metabólica mais lenta, e assim há maior acúmulo de ácidos, já que para que ocorra a assimilação dos ácidos produzidos é necessário que ainda haja algum tipo de açúcar no meio. Linggang et al. (2013) relatam que ao utilizar uma concentração de açúcar igual a 30 $g.L^{-1}$ obtiveram maior concentração de ácidos residuais do que com uma concentração 50 $g.L^{-1}$, e devido a essa baixa concentração muitas vezes após a fermentação uma concentração de açúcar ainda pode ser encontrada no meio, porém não supre a quantidade necessária para a assimilação dos ácidos orgânicos.

A baixa produção de butanol pode estar relacionada à quantidade de substrato inicial pois, aumentando a concentração de substrato de 25 $g.L^{-1}$ para 75 $g.L^{-1}$ Abd-lla et al. (2012) obtiveram como resultado 3,10 $g.L^{-1}$ e 12,3 $g.L^{-1}$ de butanol. Ao isolarem uma cepa nativa, Al-Shorgani et al. (2016) ofereceram 20 $g.L^{-1}$ de substrato e a produção de butanol foi de 3,71 $g.L^{-1}$ para 6,2 $g.L^{-1}$ ao usarem uma concentração de 30 $g.L^{-1}$ de substrato.

Meios suplementados apresentaram maiores produção de solventes e melhor crescimento microbiano. Alguns estudos mostram que o enriquecimento com concentrações baixas de elementos, como zinco (Wu et al., 2013), extrato de levedura, nitrogênio (Abd-Alla et al., 2012), ou ácido butírico melhoram a produção de solventes na fermentação ABE. É importante ressaltar que mesmo sem suplementação é possível produzir os solventes mesmo que em baixas concentrações.

Conclusões

A produção de butanol e etanol a partir de manipueira pode ser obtida por *C. beijerinckii.*

A manipueira se mostrou como um substrato em potencial para a fermentação ABE, contudo é necessário adequar as condições do processo fermentativo a fim de aumentar as concentrações finais de solventes.

Esterco bovino pré-tratado pode ser usado para produção de etanol a partir de manipueira e, quando suplementado com meio enriquecido para micro-organismos solvetogênicos, apresentou rendimento mais elevado.

A pesquisa mostra o potencial de dois resíduos, manipueira e esterco bovino, na obtenção de butanol e etanol, gerando novas alternativas de uso e agregando valor aos resíduos em função dos produtos produzidos.

Referências

APHA; AWWA; WPCF. **Standard Methods for the Examination of water and wastewater.** 21. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2005.

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

AL-SHORGANI, N. K. N.; ISA, M. H. M.; YUSOFF, W. M. W.; KALIL, M. K.; HAMID, A. A. Isolation of a *Clostridium acetobutylicum* strain and characterization of its fermentation performance on agricultural wastes. **Renewable Energy**, v. 86, p. 459-465, 2016.

CHEN, Y.; ZHOU, T.; LIU, D.; LI, A.; XU, S.; LIU, Q.; LI,B.; YING, H. Production of Butanol from Glucose and Xylose with Immobilized Cells of *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering,** v. 18, p. 234-241, 2013.

FATHIMA, A. A.; SANITHA, M.; KUMAR, T.; IYAPPAN, S.; RAMYA, M. Direct utilization of wastewater algal biomass for ethanol production by cellulolytic *Clostridium phytofermentans* DSM1183. **Bioresource** Technology, v. 202, p. 253–256, 2016.

FOND, O.; ENGASSER, J.M.; MATTA-EL-AMOURI, G.; PETITDEMANGE, H. The acetone butanol fermentation on glucose and xylose. II. Regulation and kinetics in batch cultures. **Biotechnology Bioengineering**, v. 28, n. 2 p. 167–175, 1986.

HARDE, S. M.; JADHAV, S. B.; BANKAR, S. B.; OJAMO, H.; GRANSTROM, T.; SINGHAL, R. S.; SURVASE, S. A. Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using the root hydrolysate after extraction of forskolin from *Coleus forskohlii* . **Renewable Energy,** v. 86 p. 594-601, 2016.

HU, X.-L.; WANG, H.-Y.; WU, Q.; XU, Y. Development, validation and application of specific primers for analyzing the clostridial diversity in dark fermentation pit mud by PCR-DGGE. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 40-47, 2014.

KENNES, D.; ABUBACKAR, H. N.; DIAZ, M.; VEIGA, M C.; KENNES, C. Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 91, n. 4, p. 304–317, 2016.

KAEWKANNETRA, P.; IMAI, T.; GARCIA-GARCIA, F. J.; CHIU, T. Y. Cyanide removal from cassava mill wastewater using *Azotobactor vinelandii* TISTR 1094 with mixed

microorganisms in activated sludge treatment system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p.224–228, 2009.

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

IBRAHIM, M. F.; ABD-AZIZ, S.; EZREEZA, M.; YUSOFF, M.; PHANG, L. Y.; HASSAN, M. A. Simultaneous enzymatic saccharification and ABE fermentation using pretreated oil palm empty fruit bunch as substrate to produce butanol and hydrogen as biofuel. **Renewable Energy**, v. 77, p. 447-455, 2015.

LEHMANN, D.; EVERSLOH, T. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 464–473, 2011.

LINGGANG, S.; PHANG, L.-Y.; WASOH, H.; ABD-AZIZ, S. Acetone–Butanol–Ethanol Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Using Sago Pith Residues Hydrolysate. **Bioenergy Research**, v.6, p. 321-328, 2013.

MAINTINGUER, S.I.; FERNANDES, B.S.; DUARTE, I.C.S.; SAAVEDRA, N.K.; ADORNO, M.A.T.; VARESCHE, M.B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, 33 (16), p. 4309-4317, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-429, 1959.

O-THONG, S.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P. IMAI, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 3409-3411, 2011.

PENTEADO, E. D.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M. Simple and accurated method for determination of fatty acids, alchools and carbohydrates by HPLC with UV/DAD and RID Detectors. **38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques**. Anais.California, USA: 2012.

RIBAS, M. M. F.; BARANA, A.C. Start-up adjustment of a plug-flow digester for cassava wastewater (Manipueira) treatment. **Scientia Agricola**, v. 60 n.2, 2003.

SIRISANTIMETHAKOM, S.; LAOPAIBOON, L.; SANCHANDA, P; CHATLEUDMONGKOL, J.; LAOPAIBOON, P. Improvement of butanol production from sweet sorghum juice by *Clostridium beijerinckii* using an orthogonal array design. **Industrial Crops and Products**, v.79, p. 287–294, 2016.

THOMPSON, R. A.; LAYTON, D. S.; GUSS, M. A.; OLSON, D. G.; LYND, L R.; TRINH, C. T. Elucidating central metabolic redox obstacles hindering ethanol production in *Clostridium thermocellum*. **Metabolic Engineering**, v.32, p. 207–219, 2015.

WU, Y. D.; XUE, C. CHEN, L. J.; BAI, J. W. Effect of zinc supplementation on acetone–butanol–ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Biotechnology**, v. 165, p. 18– 21, 2013.