

Modelagem cinética da fermentação Acetona-Butanol-Etanol por *Clostridium pasteurianum* DSM 525 e *Clostridium saccharobutylicum* DSM13864

Palavras-Chave: BUTANOL, COPASI, FERMENTAÇÃO, CINÉTICA, MODELAGEM

Autores:

Pedro Vasconcellos Cazzoli, FEQ – UNICAMP

Riann de Queiroz Nóbrega (coautor), FEQ – UNICAMP

Bruno Xavier Ferreira (coorientador), FEQ – UNICAMP

Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano (orientador), FEQ – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

Na atual conjuntura mundial da busca para se obter produtos de fontes renováveis, o butanol se mostra como um composto de destaque visto que pode ser utilizado como matéria prima de produtos, como acrilatos, ou ser aplicado diretamente como combustível, tendo uma previsão de crescimento de 3 % de CARG (*Compound Annual Growth Rate*) até 2030 (Statista, 2023; IMARC Group, 2022).

A rota mais convencional para a obtenção do biobutanol é através das fermentações anaeróbicas do tipo ABE (Acetona-Butanol-Etanol), onde o álcool C4 é o produto principal. Geralmente os microrganismos que realizam esse processo são espécies de bactérias do gênero *Clostridium*, que podem utilizar diferentes açúcares como fonte de energia (Zetty-Arenas *et al.*, 2019). Uma das formas que vem sendo exploradas para aumentar a produção do butanol nas fermentações ABE é a cocultura, podendo ser com microrganismos de espécies diferentes ou entre duas cepas de *Clostridium* (Pinto *et al.*, 2021).

Uma das formas de elevar o entendimento dessa dinâmica que ocorre entre os metabolismos dos microrganismos durante a cocultura é obter modelos matemáticos, sejam eles fenomenológicos (Rodrigues *et al.*, 2016) ou construídos a partir de dados (Kumar *et al.*, 2024). Entretanto, não encontramos na literatura um modelo fenomenológico para a cocultura de duas espécies de bactérias *Clostridium*. Com isso, esse projeto de IC visa à criação de um modelo para uma cocultura utilizando diferentes substratos.

2. METODOLOGIA

2.1. Fermentações e métodos analíticos

O preparo dos inóculos e as fermentações foram feitas conforme descrito em Chacón *et al.* 2020), utilizando os microrganismos *C. saccharobutylicum* DSM 13864 e *C. pasteurianum* DSM 525 a 35 °C por 96 h, em triplicatas. As fermentações foram separadas em monoculturas com *C. saccharobutylicum* (PVC 01-03) ou e *C. pasteurianum* (PVC 04-06), e coculturas (PVC 07-15). Sendo utilizado como fonte de carbono glicose, xilose e a combinação de ambos, e para as coculturas diferentes tempos de inoculação do segundo *Clostridium* (Tabela 1).

Tabela 1: Condição das fermentações realizados no projeto

Fonte de carbono (concentração inicial)	Fermentação
Glicose (60g/L)	PVC 01, 04, 07a, 10b e 11c
Xilose (60g/L)	PVC 02, 05, 08a, 12b e 15c
Glicose (30g/L) e Xilose (30g/L)	PVC 03, 06, 09a, 13b e 14c

Tempo em que é adicionado o inóculo do segundo microrganismo (*C. pasteurianum*): a – 0 h; b- 12 h; c- 24 h

As concentrações dos substratos e dos produtos foram medidas ao longo de toda a fermentação utilizando o método de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC - *Agilent 1260 Infinity*) (Chacón *et al.* 2020). A concentração celular foi acompanhada por densidade óptica (600 nm) usando um espectrofotômetro (LGI-VS0721N), sendo convertida para a concentração em g/L e mol/L, utilizando as correlações apresentadas em Raganati *et al.* (2015) e Shinto *et al.* (2007). Para avaliar a fermentação foram calculados os parâmetros de produtividade da fermentação (g/(L·h)), rendimento de ABE (g/g) e conversão de açúcares (%), sendo que a diferença entre os valores médios dos tratamentos foi comparada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). No que se refere à acurácia do modelo e dos parâmetros ajustados para a cocultura, foram avaliados utilizando os parâmetros de erro somatório dos erros quadráticos (SSE) e o coeficiente de determinação (R^2).

2.3. Modelagem

Para as modelagens, foram adotados os conjuntos de equações (balanços de massa e taxas de reação) apresentados nos trabalhos de Shinto *et al.* (2007, 2008) e Raganati *et al.* (2015). A estimativa dos parâmetros e implementação das equações foi feita utilizando o software COPASI (v4.44) (COMplex PATHway Simulator) (Hoops *et al.*, 2006) seguindo o trabalho de Raganati *et al.* (2015). Para a modelagem em cocultura, utilizou-se uma abordagem mais simplificada das equações, através de EDOs que modelassem o crescimento celular, o consumo de substrato, produtos principais e secundários, que foram quantificados pelos métodos analíticos disponíveis, desconsiderando os metabólitos, adaptando as EDOs apresentadas em Velásquez-Sanches e Aguilar-Lopez (2018).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Fermentações

Com o acompanhamento do crescimento da biomassa ao longo das fermentações (Figura 1), observou-se que todas as fermentações apresentaram crescimento exponencial a partir das 4 h, exceto pela PVC-05. O comportamento das curvas de cocultura varia conforme o tempo de adição do segundo microrganismo (*C. pasteurianum* DSM 525). Quando adicionado em 0 h (PVC-07, 08 e 09), o crescimento celular é semelhante ao do primeiro organismo (*C. saccharobutylicum* DSM 13864), provavelmente devido a temperatura da fermentação favorecer essa cepa. Entretanto, ao inserir o segundo microrganismo após 24 h de fermentação (PVC-10 e 14), observa-se que a curva assume o formato característico da cepa *C. pasteurianum*. Os resultados da análise dos compostos medidos ao longo das fermentações para alguns experimentos estão apresentados na Tabela 2.

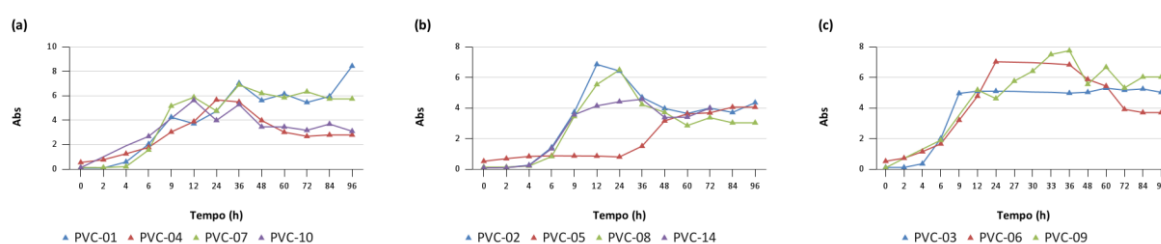


Figura 1: Perfil de absorvância da biomassa ao longo da fermentação para as fontes de carbono (a) glicose, (b) xilose e (c) glicose + xilose.

Tabela 2: Parâmetros principais calculados a partir dos dados coletados das fermentações (tempo final 96h).

	PVC					
	01	02	04	05	07	08
Concentração final de ABE (g/L)	13,25	13,59	4,54	3,33	11,90	10,11
Concentração final de butanol (g/L)	7,49	7,71	0,24	1,28	7,47	7,03
Concentração final de etanol (g/L)	3,4	2,63	2,03	1,49	2,26	2,08
Concentração final de acetona (g/L)	2,64	2,3	1,37	0,02	2,65	1,49
Substratos consumidos (g/L)	35,81	37,63	12,44	18,66	40,40	35,99
Substratos residuais (g/L)	20,07	20,44	43,85	36,15	16,44	20,94
% de substrato consumido	64,08	64,8	22,1	34,05	71,08	63,21
Rendimento de ABE	0,37	0,36	0,36	0,18	0,29	0,28
Rendimento de butanol	0,21	0,2	0,02	0,07	0,18	0,20
Rendimento de etanol	0,09	0,07	0,16	0,08	0,06	0,06
Rendimento de acetona	0,07	0,06	0,11	0,001	0,07	0,04
Produtividade de ABE (g/(L·h))	0,14	0,14	0,05	0,03	0,12	0,11
Produtividade de butanol (g/(L·h))	0,08	0,08	0,002	0,01	0,08	0,07

3.2. Modelagem

Para PVC-01 foram testados dois conjuntos de equações, o primeiro que conseguiu uma representação mais fiel do consumo de glicose (Modelo I) e o segundo que teve um ajuste melhor para a predição de butanol (Modelo II). Para o Modelo I, foram usadas as

equações de taxa de reação de Shinto *et al.* (2007), alterando a inibição do butanol sobre o consumo de glicose, de forma a aumentar sua influência sobre o consumo do açúcar. Gerando um perfil semelhante ao observado experimentalmente para o açúcar (Figura 2A). No Modelo II, a alteração foi feita sobre a equação de formação de butanol, seguindo a expressão usada por Reganati *et al.* (2015), buscando modelar o crescimento atrasado do butanol quando comparado ao consumo da glicose. Com isso, houve um aumento no ajuste para o butanol, mas prejudicou a predição do consumo de glicose (Figura 2B). A Tabela 3 contém os valores de R^2 para os compostos previstos para os dois modelos testados.

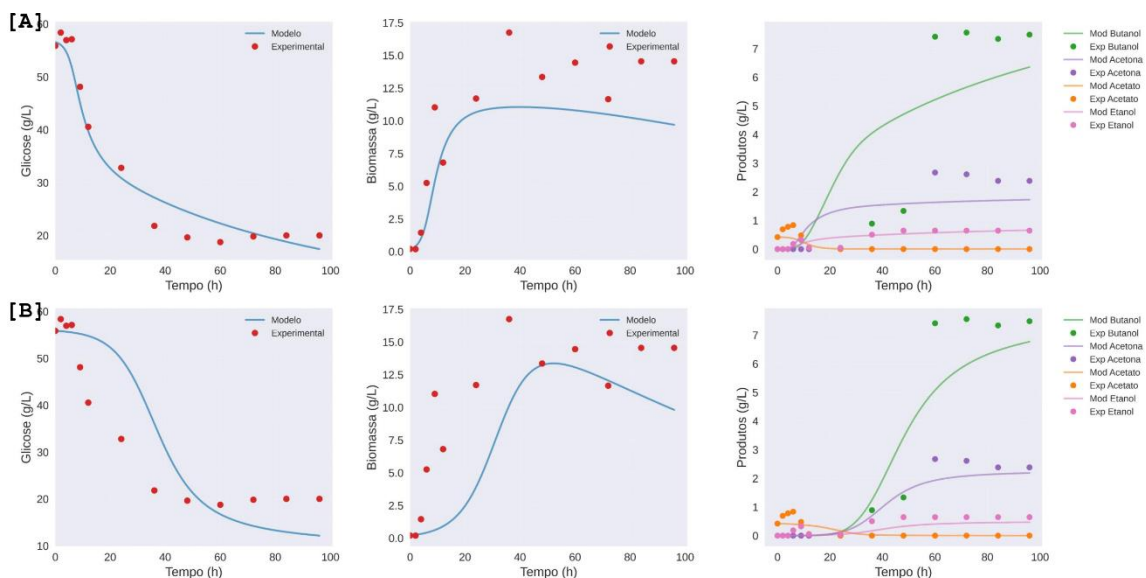


Figura 2: Comparação dos resultados do Modelo I [A] e II [B] com dados experimentais.

Tabela 3: R^2 para os ajustes dos modelos I e II.

Modelo	Glicose	Butanol	Acetona	Biomassa	Etanol	Ác. Acético
I	0,96	0,72	0,4	0,67	0,77	0,64
II	0,74	0,91	0,79	0,26	0,5	0,61

O modelo para PVC-04 mostrou-se um desafio. Ficou evidente que as equações dos artigos estudados não descreviam de forma satisfatória o microrganismo DSM 525. Apesar de ser possível chegar a um ajuste satisfatório da glicose, as demais substâncias não são bem representadas. O ajuste para os demais experimentais ainda está em desenvolvimento.

4. CONCLUSÕES

Os conjuntos de equações estudados revelaram uma maior afinidade com o microrganismo *C. saccharobutylicum* DSM 13864. Segundo o resultado das análises das fermentações em cocultura, os conjuntos de equação estudados têm potencial para descrever o comportamento de uma cocultura com adição de *C. pasteurianum* DSM 525 em 0 h.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao apoio da FAPESP (2023/01072-7, 2023/01219-8 e 2024/07704-8).

BIBLIOGRAFIA

- CHACÓN, S. J.; MATIAS, G.; VIEIRA, C. F. dos 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. **Industrial Crops and Products**, v. 155, 1 nov. 2020.
- HOOPS, S.; SAHLE, S.; GAUGE, R.; LEE, C.; PAHLE, J.; SIMUS, N.; SINGHAL, M.; XU, L.; MENDES, P.; KUMMER, U.. COPASI—a COMplex PATHway Simulator. **BIOINFORMATICS**, v. 22, p. 3067-3074, 2006.
- IMARC GROUP. **Biobutanol Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2023-2028**. Disponível em: <<https://www.imarcgroup.com/biobutanol-market>>. Acesso em: 16 out. 2023.
- KUMAR, K.; JADHAV, S. M.; MOHOLKAR, S.. Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation with clostridial co-cultures for enhanced biobutanol production. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 185, p. 277-285, 2024.
- PINTO, T.; FLORES-ALSINA, X.; GERNAEY, K. V.; JUNICKE, H. Alone or together? A review on pure and mixed microbial cultures for butanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 147, set. 2021.
- RAGANATI, F.; PROCENTESE, A.; OLIVIERI, G.; GÖTZ, P.; SALATINO, P.; SALATIN, A.. Kinetic study of butanol production from various sugars by *Clostridium acetobutylicum* using a dynamic model. **Biochemical Engineering Journal**, v. 99, p. 156-166, 2015.
- RODRIGUES, B.; LIMA-COSTA, M. E.; CONSTANTINO, A.; RAPOSO, S.; FELIZARDO, C.; GONÇALVES, D.; FERNANDES, T.; DIONÍSIO, L.; PEINADO, J. M.. Growth kinetics and physiological behaviour of co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*, fermenting carob sugars extracted with whey. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 92, p. 41-48, 2016.
- STATISTA. **Market volume of n-Butanol worldwide from 2015 to 2022, with a forecast for 2023 to 2030**. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/1245211/n-butanol-market-volume-worldwide/>>. Acesso em: 16 out. 2023.
- SHINTO, H.; TASHIRO, H.; YAMASHITA, M.; KOBAYASHI, G.; SEKIGUCHI, T.; HANAI, T.; **Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone–butanol–ethanol production**. *Journal of Biotechnology*, v. 131, n. 1, p. 45–56, 1 ago. 2007.
- VELÁZQUEZ-SÁNCHEZ, H. I.; AGUILAR-LÓPEZ, R. Novel kinetic model for the simulation analysis of the butanol productivity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 under different reactor configurations. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 4, p. 812–821, apr. 2018.
- ZETTY-ARENAS, A. M.; ALVES, R. F.; PORTELA, C. A. F.; MARIANO, A. P.; BASSO, T. O.; TOVAR, L. P.; FILHO, R. M.; FREITAS, S. Towards enhanced *n*-butanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate: Strain screening, and the effects of sugar concentration and butanol tolerance. **Biomass and Bioenergy**, v. 126, p. 190–198, jul. 2019.