Artigo

Produção de Biocombustível e Ácidos Orgânicos para Agregar Valor ao Efluente de Mandioca

Chogi, M. A. N.;* Araujo, A. C. V.; Prado, P. F.; Silva, D. B.; Silva, A. J.; Silva, G. F.; Duarte, I. C. S. D.

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (1), 89-98. Data de publicação na Web: 29 de janeiro de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>

Production of Biofuel and Organic Acids for Adding Value to Cassava Wastewater

Abstract: Agroindustrial wastes are rich in fermentable sugars and they are considered a promising source in biotechnological process to produce added value products like solvents and organic acids. The acetone-butanol-ethanol fermentation (ABE) has been increasingly studied in order to increase the production of acids and solvents from renewable sources. The aim of this study was to produce solvents and organic acids from two substrates, glucose and cassava wastewater (manipueira). The ABE fermentations were carried out with *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132) – CB and with three microbial consortia, as inocula, these being swine effluent - SM; Sewage treatment plant UASB - UB; bovine manure - CM. These inocula was submitted a heat treatment before using. The solvent production by CB was higher using cassava wastewater as a carbon source, butanol (1.03 g L^{-1}) and ethanol (2.31 g L^{-1}), the others inocula except UB, produced more amount of butyric acid in the concentrations of 0.31 g L^{-1} (CM) and 0.13 g L^{-1} (SM) also with cassava wastewater as a carbon source. More acids were produced in these fermentations. The results showed a viability of cassava wastewater as a source of carbon in ABE fermentation for acids and solvents production, as well as promoting a way to add value to these wastes.

Keywords: Butanol; *clostridium beijerinckii*; ethanol.

Resumo

Resíduos agroindustriais são ricos em açúcares que podem ser fermentáveis, sendo promissores na geração de produtos de alto valor agregado em processos biotecnológicos. Dentre estes produtos estão os ácidos orgânicos voláteis e álcoois. A fermentação acetona-butanol-etanol (ABE) vem sendo cada vez mais estudada de modo a aumentar a produção dos ácidos e solventes produzidos a partir destas fontes renováveis. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de solventes e ácidos orgânicos a partir de dois substratos, glicose e água residual do processamento de farinha de mandioca (manipueira). As fermentações ABE em batelada foram realizadas com *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132) - CB, e três consórcios microbianos previamente submetidos a tratamento térmico, sendo estes o efluente de suinocultura - SM; lodo UASB da estação de tratamento de esgoto - UB; esterco bovino - CM. Enquanto que o inóculo CB obteve maior produção de butanol ($1,03 \text{ g L}^{-1}$) e etanol ($2,31 \text{ g L}^{-1}$) utilizando a manipueira como fonte de carbono, os demais inóculos exceto UB, produziram maiores quantidades de ácido butírico nas concentrações de $0,31 \text{ g L}^{-1}$ (CM) e $0,13 \text{ g L}^{-1}$ (SM) também com manipueira como fonte de carbono. Outros ácidos orgânicos também foram produzidos nestas fermentações. Os resultados deste estudo mostram a viabilidade do uso da manipueira como fonte de carbono na fermentação ABE para a produção de ácidos e solventes, além de promover uma forma de agregar valor a esses resíduos.

Palavras-chave: Auto-hidrólise; bagaço da cana-de-açúcar; pré-tratamento.

* Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Biologia, Campus Sorocaba, Rod. Washington Luiz, s/n, CEP: 13565-905, São Carlos - SP, Brasil.

iolanda.duarte@gmail.com
DOI: [10.21577/1984-6835.20200009](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200009)

Produção de Biocombustível e Ácidos Orgânicos para Agregar Valor ao Efluente de Mandioca

Marianne Akemi Neroni Chogi,^{a,*} Ana Carolina Vieira Araujo,^a Pierre Ferreira do Prado,^c Douglas Batista da Silva,^b Ariovaldo José da Silva,^b Gabriela Fiori da Silva,^a Iolanda Cristina Silveira Duarte^a

^a Universidade Federal de São Carlos, Laboratório de Microbiologia Ambiental, Rod. Washington Luiz, s/n, CEP: 13565-905, São Carlos - SP, Brasil.

^b Universidade de Campinas, Sanitation Laboratory, Faculdade de Engenharia Agrônoma, Campinas-SP, Brasil.

^c Universidade de Valencia- Burssajot, Av. de Blasco Ibáñez, 13, CEP: 46010, València, Valencia, Espanha.

*marianneakemi@hotmail.com

Recebido em 29 de julho de 2019. Aceito para publicação em 14 de janeiro de 2020

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

- 2.1. Microrganismo e condições de crescimento
- 2.2. Consórcios microbianos
- 2.3. Água residual do processamento da mandioca
- 2.4. Operação de reatores anaeróbios em batelada
- 2.5. Procedimentos analíticos

3. Resultados e Discussão

- 3.1. Caracterização de águas residuais da mandioca
- 3.2. Produção de etanol
- 3.3. Produção de butanol
- 3.4. Produção de ácidos orgânicos

4. Conclusões

1. Introdução

Os resíduos agroindustriais representam uma excelente fonte renovável de carboidratos que podem ser efetivamente convertidos em biocombustíveis e produtos de alto valor agregado como ácidos orgânicos voláteis e álcoois.¹ A utilização de novas fontes de biomassa e o reaproveitamento de seus resíduos é promissora e de grande interesse biotecnológico, podendo gerar biocombustíveis de modo a substituir os

combustíveis fósseis, que ainda são a principal fonte de energia do mundo.²

A mandioca (*Manihot esculenta*), segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), é considerada a principal fonte de alimento para mais de 700 milhões de pessoas em países tropicais sendo cultivada em uma área global de aproximadamente 18,6 milhões de hectares.³⁻⁵ Em seu processamento, para cada quilo da raiz, são gerados de 5 a 7 litros de água residuária a qual contém alto teor de matéria orgânica fermentável, nutrientes e cianeto, sendo inapropriado o seu

descarte no meio ambiente.^{6,7} Devido à grande quantidade de água residual gerada, seu uso a partir do processo fermentativo para obtenção de produtos de alto valor agregado, como combustíveis líquidos, torna-se uma opção a ser avaliada.

Os biocombustíveis mais comumente obtidos a partir da conversão biológica de matérias-primas renováveis durante a fermentação são: butanol e etanol. Diversas linhagens de *Clostridium* sp., a partir da fermentação acetona-butanol-etanol (ABE), geram como produto final a acetona, butanol e etanol e como subprodutos, ácido butírico e demais precursores destes solventes. Ressalta-se também estas bactérias pela capacidade em metabolizar tanto pentoses quanto hexoses, podendo assim consumir grande parte do conteúdo energético desses resíduos.⁸

Além do uso como biocombustíveis, podem ser utilizados como solventes e assim como os ácidos orgânicos voláteis, são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética, química e de polímeros.⁹

O objetivo deste estudo foi investigar o potencial da água residual do processamento de mandioca como fonte de carbono na produção de álcoois e ácidos orgânicos voláteis via fermentação ABE utilizando diferentes fontes de inóculo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismo e condições de crescimento

A bactéria utilizada foi *Clostridium beijerinckii* (CB) (ATCC 10132). A cepa foi incubada por 24 h sob condições anaeróbias a 37 °C em meio RCM (Clostridial Reinforced Media).¹ Para a preparação do pré-inóculo, 5 mL de cultura viável foram incubados em anaerobiose por 48 h, a 37 °C, em 300 mL de meio de produção de solvente, composto por (g L⁻¹): MnSO₄ · H₂O (0,01); NaCl (0,01); Fe (0,01); acetato de amônio (1,5); ácido para-aminobenzoico (0,001); biotina (0,00001); KH₂PO₄ (1,0); K₂HPO₄ · 3H₂O (0,75) e extrato de levedura (2,0), pH 6,5, suplementado com 30 g L⁻¹ de glicose.¹⁰ A atmosfera dos frascos foi preenchida com N₂ (100 %).

2.2. Consórcios microbianos

Para obtenção de consórcio microbiano foram amostrados distintos locais 1) efluente de

biodigestor de suinocultura da Granja Água Branca do município de Itu (SM); 2) lodo de reator UASB da estação de tratamento de Esgoto Sanitário do município de Porto Feliz (UB) e 3) dejetos bovinos (CM). As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis de 5 L e armazenados a 4 °C e submetidas a um pré-tratamento térmico para selecionar as bactérias produtoras de endósporos.¹¹ Após esse tratamento, 20 mL do meio de produção do solvente suplementado com glicose 30 g L⁻¹, foram adicionados nos frascos contendo o inóculo tratado. Este pré-inóculo foi incubado por 48 h sob condições anaeróbias a 37 ± 1 °C. Posteriormente, 5 mL de meio de cultura com inóculo foram transferidos para frascos contendo 300 mL de meio de produção de butanol,¹⁰ suplementado com 30 g L⁻¹ de glicose. Os frascos foram incubados por 48 h sob as mesmas condições e as culturas resultantes em cada frasco foram utilizadas nos processos de fermentação para produção de butanol.

2.3. Água residual do processamento da mandioca

A água residual da mandioca foi obtida da fábrica de farinha de mandioca Caio Prado (Araras, Brasil). Inicialmente a água foi caracterizada quanto ao pH, sólidos totais (TS), sólidos voláteis totais (VTS), demanda química total de oxigênio (COD),¹² e a determinação de açúcares foi realizada pelo método de açúcares redutores totais (DNS) ácido 3,5 dinitrossalicílico.¹³

Esse efluente foi autoclavado a 121 °C por 30 min com uma solução de 0,5 % de H₂SO₄ 1:1 (v/v) para a ruptura do amido em açúcares fermentáveis.¹⁴ O pH foi ajustado para 6,5 com uma solução de NaOH 10 M, alíquotas de 40 mL foram centrifugadas durante 5 min a 7500 rpm. O sobrenadante obtido foi usado para determinar os açúcares redutores totais.

2.4. Operação de reatores anaeróbios em batelada

Como condição controle foi usado glicose na concentração de 10 g L⁻¹ como fonte de carbono. Nos ensaios onde o efluente de mandioca foi a fonte de carbono, utilizou-se quantidade equivalente a 10 g L⁻¹ de açúcares redutores totais. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Todos os reatores em batelada foram submetidos a atmosfera de N₂ (100 %) de modo

a manter as condições anaeróbias. Os frascos foram fechados com tampa de butila. Os inóculos (CB, SM, UB e CM) foram incubados em frascos reagentes de 250 mL contendo 150 mL de meio de produção em 20 % (v/v).

Os inóculos foram padronizados na absorbância de 0,1 a 600 nm e injetados com uma seringa nos frascos.¹⁵ Os frascos foram mantidos sob agitação (50 rpm) e temperatura controladas (37 ± 1 °C) durante 90 h. Os valores de pH foram medidos após a inoculação e no final da fermentação.

2.5. Procedimentos analíticos

Amostras dos sobrenadantes foram analisadas quanto aos açúcares redutores pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS)¹³ álcoois e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o detector de raios ultravioleta e o arranjo de diodos (UV-DAD) foram usados para análise de ácido e o índice de refração (RID-10A) foi usado para álcoois. A separação de ácidos e álcoois foi realizada em coluna Aminex HPX-87H a 43 °C e ácido sulfúrico 0,01 N foi usado como o eluente com um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O tempo de execução de cada amostra foi de 65 minutos e a análise dos resultados foi

realizada utilizando o software Class-VP (modelo SHIMADZU Prominence).¹⁶

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização de águas residuais de mandioca

A Tabela 1 apresenta a caracterização inicial da água residual do processamento de mandioca utilizada como substrato na fermentação.

3.2. Produção de etanol

C. beijerinckii obteve a maior produção de etanol e butanol (2647,9 mg L⁻¹ e 1131,7 mg L⁻¹, respectivamente) (Figuras 1B e 2B) utilizando o efluente de mandioca como fonte de carbono. Em uma fermentação ABE a proporção de butanol produzido é maior em relação ao etanol, geralmente de 3:6:1 (acetona:butanol:etanol).^{17,18} No entanto essa proporção não foi observada no presente trabalho, pois pode-se variar dependendo da natureza do carboidrato e das condições do meio.¹⁹

Tabela 1. Caracterização da água residual do processamento de mandioca

Determinação	Valor
pH	5,25
Sólidos totais	64,75 g L ⁻¹
Sólidos voláteis totais (SVT)	49,67 g L ⁻¹
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	95,33 g L ⁻¹
Açúcares redutores totais	20,00 g L ⁻¹

Figura 1. Etanol obtido na fermentação: (A) Ensaio controle (B) Ensaio em meio suplementado com efluente de mandioca

Figura 2. Butanol obtido na fermentação: (A) Ensaio controle (B) Ensaio em meio suplementado com efluente de mandioca

Estudos utilizando glicose como fonte de carbono, mostram produções de etanol muito baixas em comparação ao butanol. Estudos prévios como Ezeji *et al.* (2004),²⁰ obtiveram uma produção de butanol igual a 11900,0 mg L⁻¹ e apenas 500,0 mg L⁻¹ de etanol, Li *et al.* (2013),²¹ reportaram 500,0 mg L⁻¹ de etanol enquanto que a produção de butanol foi de 9080,0 mg L⁻¹ e Kheyrandish *et al.* (2015),²² obtiveram produção de butanol 100 vezes maior que o etanol, sendo 11500,0 g L⁻¹ e 100,0 mg L⁻¹ respectivamente.

O etanol foi o solvente mais produzido neste estudo, este resultado pode ser atribuído possivelmente à alta concentração de ácido acético inicial (Figura 3), como foi observado no ensaio com o inóculo CB (Figura 3B) em meio suplementado com efluente de mandioca, que

apresentou a maior concentração inicial de ácido acético (1906,1 ± 286,67 mg L⁻¹), e obteve uma produção de etanol de 2647,9 ± 0,06 g L⁻¹ (Figura 1B). Esta concentração de ácido acético, especificamente na presença deste inóculo, tem a possibilidade de ter sido convertido em etanol, pois duas enzimas presentes na cepa denominadas aldeído desidrogenase de coenzima A-acilação e álcool desidrogenase NAD(P)H são capazes de metabolizar o ácido acético, transformando-o em etanol.²³

Li *et al.* (2014) incrementaram a eficiência de produção de butanol quando adicionaram ácido butírico ao meio, e o mesmo foi convertido em butanol.²⁴

O rendimento da produção de etanol foi de 0,33 g g⁻¹ (g de etanol por g de açúcar

Figura 3. Produção de ácido acético na fermentação: (A) Ensaio controle (B) Ensaio em meio suplementado com efluente de mandioca

consumido) com o efluente de mandioca como fonte de carbono. O ensaio controle obteve rendimento de $0,24 \text{ g g}^{-1}$. Estudos que utilizaram outros substratos na fermentação e outras espécies de *Clostridium* obtiveram rendimentos iguais a $0,26 \text{ g g}^{-1}$ com biomassa de algas oriundas de águas residuárias,²⁵ $0,29 \text{ g g}^{-1}$,²⁶ $0,32 \text{ g g}^{-1}$.²⁷ Para a obtenção do maior rendimento utilizando o efluente da mandioca, o pré-tratamento ácido realizado anteriormente à esta fonte de carbono proporcionou uma maior disponibilidade de açúcares fermentáveis, diminuindo sua recalcitrância e não gerou a formação de inibidores fermentativos. Além disso, a mandioca é uma excelente fonte de amido, um polissacarídeo formado pela união de diversas moléculas de glicose. Mitiet *et al.* (2016) utilizaram na fermentação ABE, resíduos agroindustriais como substrato (resíduo líquido de cervejaria; resíduo líquido da indústria de amido e lodo de maçã) e obtiveram o melhor rendimento total ABE com o resíduo da indústria de amido ($0,465 \text{ g g}^{-1}$).²⁸

Este resultado indica que os efluentes da mandioca podem ser usados como substrato potencial para a produção de etanol, devido ao alto teor de matéria orgânica, um bom substrato para processos biotecnológicos.^{14,29}

3.3. Produção de Butanol

A produção de butanol foi restrita a condição em que foi utilizado *C. beijerinckii* como inóculo e como no caso do etanol, a maior produção

ocorreu quando a cepa foi alimentada com efluente de mandioca, comparativamente ao uso da glicose. Enquanto $1131,7 \pm 85,2 \text{ mg L}^{-1}$ foram obtidos com a mandioca, apenas $272,51 \pm 132,35 \text{ mg L}^{-1}$ de butanol foi produzido com glicose como substrato (Figura 2). Os rendimentos foram iguais a $0,14 \text{ g g}^{-1}$ e $0,04 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente.

No entanto, é possível observar elevada concentração residual de ácido butírico (Figura 4) ao final dos experimentos com CB ($2756,24 \pm 301,54 \text{ mg L}^{-1}$ com glicose $4140,59 \pm 112,97 \text{ mg L}^{-1}$ e com água residuária da mandioca). Isso pode ser explicado pela baixa concentração inicial de substrato, que favoreceu somente a produção de ácido butírico ao contrário da assimilação do ácido em butanol. Alguns estudos mostraram que, o aumento da concentração inicial da fonte de carbono, reduz a concentração final de ácido butírico e aumenta a concentração de butanol.^{30,31} Esse aumento na produção de butanol está relacionado ao fato de que, após a solventogênese, são direcionados para a formação de solventes mais carbono e elétrons.³²

Wang *et al.* (2014) alcançaram uma maior produção (de $13030,0 \text{ mg L}^{-1}$ de butanol), elevando a concentração de substrato para $80000,0 \text{ mg L}^{-1}$, sugerindo que a fermentação do butanol deve ser realizada a uma concentração de carbono relativamente maior para se atingir maior desempenho.

Usando outros resíduos agroindustriais estudos obtiveram as seguintes concentrações de solventes: butanol $850,0 \text{ mg L}^{-1}$ e etanol de $1760,00$

Figura 4. Produção de ácido butírico na fermentação: (A) Ensaio controle (B) Ensaio em meio suplementado com efluente de mandioca

mg L⁻¹ utilizando polpa de mandioca,³³ etanol e butanol a 300,0 g L⁻¹ ao utilizarem água residuária de fábrica de cana-de-açúcar,³³ e com todos os substratos testados, ao final da fermentação a concentração final de ácido butírico foi superior à produção de etanol e butanol.³³

Em relação aos consórcios microbianos utilizados na fermentação, ambos os substratos (glicose e efluente de mandioca) não foram convertidos em butanol. Apenas com efluente da mandioca foi observada a produção de ácido butírico. As concentrações mais significativas foram alcançadas com o inóculo CM (319,50 ± 36,23 mg L⁻¹) e SM (122,33 ± 50,68 mg L⁻¹). Isso pode ser explicado pela presença do grupo *Clostridium* que já foi encontrado em lodo ativado proveniente de estação de tratamento de esgoto,³⁴ lodo de efluente de água suína,³⁵ e esterco bovino.³⁶

3.4. Produção de ácidos orgânicos

Além do ácido butírico, obteve-se uma produção de ácido láctico com o inóculo SM (1650,0 ± 580,0 mg L⁻¹) e CM (3170,0 ± 1100,0 mg L⁻¹) (Figura 5), mostrando que os consórcios tiveram potencial para produzir outros bioprodutos com interesse comercial.

Virunanon *et al.* (2013), utilizando como substrato efluente de mandioca e *Clostridium acetobutyricum* como inóculo, obtiveram produção de butanol de 850,0 mg L⁻¹ e 1760,0 mg L⁻¹ de etanol, a concentração final de ácido

butírico foi de 2800,0 mg L⁻¹, também evidenciado no presente estudo.

Já foi relatado que *Clostridium kogasensis* isolada do solo sob o gasoduto corroído, não foi capaz de produzir butanol e etanol, mas sintetizaram ácido butírico e o ácido acético, tendo como substrato a glicose.³⁷

Possivelmente os consórcios utilizados no estudo principalmente os inóculos CM e SM, que produziram ácido butírico, as condições de fermentação podem ser adequadas para a maior produção de ácido butírico e consequente assimilação para o butanol. A baixa capacidade de produzir ácido orgânico e solvente ABE pelo inóculo SM, UB e CM pode ser explicada pela interferência do ciclo glicolítico, uma vez que o piruvato está sendo reduzido para solventes ABE ou ácido láctico.³²

O ácido acético e butírico têm importantes papéis no metabolismo de espécies do gênero *Clostridium*, pois são responsáveis pela geração de ATP, importante no crescimento celular durante a fase acidogênica e solventogênica. Na fase acidogênica, o ácido butírico é importante para a manutenção do balanço redox, pois os dinucleotídeos de nicotinamida adenina (NADHs) produzidos durante a glicólise são oxidados na via do ácido butírico e não na via do ácido acético.³⁸ Em algumas condições, o ácido láctico pode ser produzido e de fato, o ácido láctico foi produzido na maior concentração por CB, seguido por CM e UB, nas concentrações de 3170,0 mg L⁻¹, 1650,0 mg L⁻¹ e 650,0 mg L⁻¹, respectivamente.

Figura 5. Produção de ácido láctico na fermentação: (A) Ensaio controle (B) Ensaio em meio suplementado com efluente de mandioca

4. Conclusões

O Efluente do processamento de mandioca (manipueira) pode ser utilizado em processos fermentativos para produção de etanol, butanol e ácidos orgânicos por *Clostridium beijerinckii*, agregando maior valor a este resíduo.

Consórcios microbianos obtidos a partir de esterco bovino e dejetos de suínos, após pré-tratamento térmico para seleção de microrganismos, podem ser utilizados como inóculo para produção de ácido butírico e láctico.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Caio Prado Cassava Flour Ind. que forneceu o efluente da mandioca. M.A.N.C., A.C.V.A. e M.M. foram apoiados financeiramente pelas bolsas de pesquisa da CAPES / Brasil previstas para os programas de pesquisa “Biotecnologia e Monitoramento Ambiental” e “Planejamento e Uso de Recursos Renováveis” e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) por meio de proc. 2012 / 09785-8.

Referências Bibliográficas

- ¹ khamaiseh, E.I.; Kalil, M.S.; Dada, O.; Yusoff, W.M.W. Date Fruit as Carbon Source in RCM-Modified Medium to Produce Biobutanol by *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 13357. *Journal of Applied Sciences* **2012**, *12*, 1160. [CrossRef]
- ²Volpe, M.; Panno, D.; Volpe, R.; Messineo, A. Upgrade of citrus waste as a biofuel via slow pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2015**, *115*, 66. [CrossRef]
- ³OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015), *OECD-FAO Agricultural Outlook 2015*, OECD Publishing, Paris. [CrossRef]
- ⁴Secretaria da Agricultura e Abastecimento SEAB, Departamento de Economia Rural – Prognóstico Mandioca 2017/18, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/>>. Acesso em: 05 novembro 2018.

- ⁵Patil, B. L.; Fauquet, C. M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. *Molecular Plant Pathology* **2009**, *10*, 685. [CrossRef]
- ⁶Sangyoka, S.; Reungsang, A.; Moonamart, S. Repeated-batch Fermentative for Bio-hydrogen Production from Cassava Starch Manufacturing Wastewater. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **2007**, *10*, 1782. [CrossRef]
- ⁷O-Thong, S.; Hniman, A.; Prasertsan, P. Imai, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* **2011**, *36*, 3409. [CrossRef]
- ⁸Qi, G.; Xiong, L.; Luo, M.; Huang, Q.; Huang, C.; Li, H.; Chen, X.; Chen, X. Solvents production from cassava by co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2018**, *6*, 128. [CrossRef]
- ⁹Thapa, L. P.; Lee, S. J.; Park, C.; Kim, S. W. Production of L-lactic acid from metabolically engineered strain of *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007. *Enzyme and Microbial Technology* **2017**, *102*, 1. [CrossRef]
- ¹⁰Monot, F.; Martin, J. R.; Petidemange, H.; Gay, R. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. *Applied and Environmental Microbiology* **1982**, *44*, 1318. [PubMed]
- ¹¹Xiao, B. Y.; Liu, J. X. Biological hydrogen production from sterilized sewage sludge by anaerobic self-fermentation. *Journal of Hazardous Materials* **2009**, *168*, 163. [CrossRef]
- ¹²APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Environment Federation); *Standard Methods for the Examination of water and wastewater*. 21th. ed. American Public Health Association: Washington, DC, 2005. [Link]
- ¹³Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **1959**, *31*, 426. [CrossRef]
- ¹⁴Rosa, P. R. F.; Santos, S. C.; Sakamoto, I. K.; Varesche, M. B. A.; Silva, E. L. The effects of seed sludge and hydraulic retention time on the production of hydrogen from a cassava processing wastewater and glucose mixture in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy* **2014**, *39*, 13118. [CrossRef]

- ¹⁵Ezeji, T. C.; Qureshi, N.; Blaschek, H. P. Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Biotechnology* **2005**, *115*, 179. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶Penteado, E. D.; Adorno, M. A. T.; Zaiat, M. *Proceedings of the 38th International Symposium on High Performance Liquid Separations and Related Techniques*. Simple and accurated method for determination of fatty acids, alchools and carbohydrates by HPLC with UV/DAD and RID Detectors., Anaheim, CA, USA, 2012.
- ¹⁷Bellido, C.; Infante, C.; Coca, M.; González-Bento, G.; Lucas, S.; García-Cubero, M. T. Efficient acetone–butanol–ethanol production by *Clostridium beijerinckii* from sugar beet pulp. *Bioresource Technology* **2015**, *190*, 332. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸García, R.; Pizarro, C.; Lavín, A.G.; Bueno, J. L. Characterization of Spanish biomass wastes for energy use. *Bioresource Technology* **2012**, *103*, 249. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹Compere, A. L.; Griffith, W. L. Evaluation of substrates for butanol production. *Developments in Industrial Microbiology* **1979**, *20*, 509.
- ²⁰Ezeji, T. C.; Qureshi, N.; Blaschek, H. P. Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. *Appl Microbiol Biotechnol* **2004**, *63*, 653. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹Li, L.; Ai, H.; Zhang, S.; Li, S.; Liang, Z.; Wu, Z. Q.; Yang, S. T.; Wang, J. F. Enhanced butanol production by coculture of *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium tyrobutyricum*. *Bioresource Technology* **2013**, *143*, 397. [CrossRef] [PubMed]
- ²²Kheyrandish, M.; Asadollahi, M. A.; Jeihanipour, A.; Doostmohammadi, M.; Rismani-Yazdi, H.; Karimi, K. Direct production of acetone–butanol–ethanol from waste starch by free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Fuel* **2015**, *142*, 129. [CrossRef]
- ²³Huang, H.; Liu, H.; Gan, Y. R. Genetic modification of critical enzymes and involved genes in butanol biosynthesis from biomass. *Biotechnology Advances* **2010**, *28*, 651. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴Li, H.; Ofosu, F. K.; Li, K.; Gu, Q.; Wang, Q.; Yu, X. Acetone, butanol, and ethanol production from gelatinized cassava flour by a new isolates with high butanol tolerance. *Bioresource Technology* **2014**, *172*, 276. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵Fathima, A. A.; Sanitha, M.; Kumar, T.; Iyappan, S.; Ramya, M. Direct utilization of waste water algal biomass for ethanol production by cellulolytic *Clostridium phytofermentans* DSM1183. *Bioresource Technology* **2016**, *202*, 253. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶Lehmann, D.; Eversloh, T. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metabolic Engineering* **2011**, *13*, 464. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷Thompson, 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* **2015**, *32*, 207. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸Maiti, S.; Sarma, S. J.; Brar, S. K.; Le, B.; Drogui, P.; Buelna, G.; Verma, M. Agro-industrial wastes as feedstock for sustainable bio-production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. *Food and Bioproducts Processing* **2016**, *98*, 217. [CrossRef]
- ²⁹Cappelletti, B. M.; Redinatto, V.; Amante, E. R.; Antônio, R. V. Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Renewable Energy* **2011**, *36*, 3367. [CrossRef]
- ³⁰Linggang, 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* **2013**, *6*, 321. [CrossRef]
- ³¹Wang, Y.; Guo, W.; Lo, Y.; Chang, J.; Ren, N. Characterization and kinetics of bio-butanol production with *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 using mixed sugar medium simulating microalgae-based carbohydrates. *Biochemical Engineering Journal* **2014**, *91*, 220. [CrossRef]
- ³²Gheshlaghi, R.; Scharer, J. M.; Moo-Young, M.; Chou, C. P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology Advances* **2009**, *26*, 764. [CrossRef] [PubMed]
- ³³Virunanon, C.; Ouephanit, C.; Burapatana, V.; Chulalaksananukul, W. Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. *Journal of Cleaner Production* **2013**, *39*, 273. [CrossRef]
- ³⁴Chen, B. Y.; Chuang, F. Y.; Linc, C. L.; Chang, J. S. Deciphering butanol inhibition to Clostridial species in acclimatized sludge for improving biobutanol production. *Biochemical Engineering Journal* **2012**, *69*, 100. [CrossRef]

- ³⁵Shida, G. M.; Maintinguer, S. I.; Saavedra, N. K.; Varesche, M. B. A.; Silva, E. L. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. *International Journal of Hydrogen Energy* **2012**, 37, 16925. [[CrossRef](#)]
- ³⁶Bagge, E., Persson, M., Johansson, K.-E. Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *Journal of Applied Microbiology* **2010**, 109, 1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷Shin, Y.; Kang, S. S.; Paek, J.; Jin, T. E.; Song, H. S.; Kim, H.; Park, H. M.; Chang, Y. H. *Clostridium kogasensis* sp. nov., a novel member of the genus *Clostridium*, isolated from soil under a corroded gas pipeline. *Anaerobe* **2016**, 39, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸Ezeji, T.; Milne, C.; Price, N.; Blascheck, H. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, 85, 1697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]