

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**LARISSA COUTO PROENÇA RIBEIRO**

**PRODUÇÃO DE BUTANOL POR *Clostridium beijerinckii* NRRL B 598 A  
PARTIR DE MATÉRIAS PRIMAS AGROINDUSTRIAIS**

RIO DE JANEIRO

2019

LARISSA COUTO PROENÇA RIBEIRO

PRODUÇÃO DE BUTANOL POR *Clostridium beijerinckii* NRRL B 598 A PARTIR  
DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador (as): Tatiana Felix Ferreira, D.Sc.

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

RIO DE JANEIRO

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

## CIP - Catalogação na Publicação

R484p      Ribeiro, Larissa Couto Proença  
            Produção de butanol por *Clostridium beijerinckii*  
            NRRL B 598 a partir de coprodutos agroindustriais /  
            Larissa Couto Proença Ribeiro. -- Rio de Janeiro,  
            2019.  
            98 f.

            Orientadora: Tatiana Felix Ferreira.  
            Coorientadora: Maria Alice Zarur Coelho.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do  
            Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós  
            Graduação em Engenharia de Processos Químicos e  
            Bioquímicos, 2019.

            1. butanol. 2. *Clostridium*. 3. fermentação ABE.  
            4. milhocina. I. Ferreira, Tatiana Felix, orient.  
            II. Coelho, Maria Alice Zarur, coorient. III. Título.

PRODUÇÃO DE BUTANOL POR *Clostridium beijerinckii* NRRL B 598 A PARTIR  
DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

LARISSA COUTO PROENÇA RIBEIRO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em 15 de agosto por:

Orientador(as):

---

Tatiana Felix Ferreira, D. Sc.

---

Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

Banca examinadora:

---

Nei Pereira Jr, D. Sc.

---

Claudia Maria Soares Ribeiro, D. Sc.

RIO DE JANEIRO

2019

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu pai, Jorge Proença Ribeiro (*in memoriam*), por ter me dado todo suporte necessário e me propiciado o privilégio de receber uma educação de qualidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Jorge e Augusta, por todos os ensinamentos, carinho, apoio e paciência em todos os meus momentos de indecisão na minha carreira profissional. Agradeço também ao meu irmão Leonardo, pela preocupação e carinho. Obrigada por estarem sempre ao meu lado!

Ao meu melhor amigo, Julio Sales, que me aturou (ou fui eu quem aturei?!), todos os dias dessa jornada, no trajeto, no laboratório, nos finais de semana e nos intervalos, que me atualizou dos memes e compartilhou do meu sofrimento. Sua amizade foi imprescindível para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao nosso pombinho doutor, Felipe Valle, por todos os questionamentos que, definitivamente, me fizeram evoluir como pessoa e profissional. Obrigada por me ensinar tudo e qualquer coisa, por brigar comigo quando eu mereço e por ter me ajudado tanto nessa trajetória.

Aos meus amigos, Douglas Passos principalmente pelos abraços de ursinho que acalenta a alma, Tayane Tizo pela amizade de tantos anos, Caroline Paixão, Bianca Amada, Letícia Macedo, Liana Camboim, Juliana Veras, Thana Munhoz e Katharine Rangel, por estarem sempre presentes mesmo que as responsabilidades da vida dificultem nossos encontros. A amizade de vocês é muito importante para mim.

Às minhas lindas, Lúcia Massariol, Camila Gabriele e Luíza Landim por terem permanecido na minha vida e proporcionado momentos tão divertidos e leves. Ninguém segura esse grupo de mulheres engenheiras inteligentes e pós-graduadas.

Às minhas orientadoras, Tatiana Felix e Maria Alice, que muito admiro, pela paciência, compreensão e por todos os ensinamentos.

Aos amigos do BIOSE, Ariane, Marselle, Carlos Eduardo, Ana Beatriz, Alana, Eliana, Verônica, Fernanda, Mariana, Gabriela, Andressa, Nanci e Prof. Bernardo, pelo convívio agradável e por todas as conversas.

À CAPES pelo financiamento.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

Resumo da Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Diversas espécies de *Clostridium* são capazes de produzir os solventes acetona, butanol e etanol (ABE) pela fermentação de variados substratos. O butanol tem se tornado um interessante substituto para o etanol em aplicação como aditivos de combustíveis, devido às suas propriedades físico-químicas superiores. Foi provado que é possível utilizar butanol diretamente em motores à gasolina, sem necessidade de modificação. Além disso, alguns derivados químicos do butanol, como o éter butilglicol, acetato de butila e plastificantes também possuem relevância comercial. A rota bioquímica de produção de butanol ainda apresenta custo elevado quando comparada com a rota petroquímica, especialmente devido ao alto custo dos componentes do meio de cultivo. Visando tornar a produção biotecnológica do butanol mais competitiva, esforços vêm sendo feitos para minimizar o custo desse processo. O presente trabalho tem por objetivo selecionar possíveis substratos, meio de cultura e cepa de *Clostridium* para produção de butanol. *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598, sacarose como fonte de carbono e milhocina como fonte de nutriente foram selecionadas como as opções que apresentaram maior produtividade dentre as estudadas. Parâmetros do processo como pH inicial, concentração inicial de melado, idade do pré inóculo e inibição por butanol também foram investigados. Os resultados mostraram que o pH inicialmente ajustado em 6,5 e o pré-inóculo na fase estacionária de crescimento alcançaram as melhores produtividades. A utilização de até 76 g.L<sup>-1</sup> de sacarose inicial proveniente de melado não apresentou inibição do metabolismo celular. Em contrapartida, a concentração inicial de 7,0 g.L<sup>-1</sup> de butanol resultou em inibição da atividade celular. Quando a fermentação foi realizada em tanque agitado de 1L, em batelada simples sem controle de pH, foi obtido 2,39 g.L<sup>-1</sup> de butanol e uma produtividade de 0,11 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, quando utilizado melado e milhocina como componentes do meio de cultivo. Comparativamente, quando realizada a fermentação com este mesmo meio de cultivo, porém com controle de pH 6,0, foi obtido 5,77 g.L<sup>-1</sup> de butanol e 0,28 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de produtividade.

Abstract of a Dissertation presented to Post-Graduation Program in Chemical and Biochemical Process Engineering – EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.

Several *Clostridium* strains are able to produce acetone, butanol and ethanol (ABE) solvents by fermentation using a range of substrates. Butanol has become an interesting substitute for ethanol in additives and fuel applications due to its superior physical chemical properties. It is proven to be possible to use a mixture of butanol and gasoline directly in gasoline engine without modification. Besides, some chemical derivatives such as butyl glycol ether, butyl acetate or plasticizers, also have economical relevance. Biochemical route for producing butanol still presents high cost in comparison with the petrochemical synthesis, especially due to expensive culture media components. In order to make the biotechnological production of butanol competitive, efforts have been made to minimize the cost of this process. The present study aims to screen possible substrates, culture media and *Clostridium* strains to produce biobutanol. *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598, sucrose as carbon source and corn steep liquor as nutrient source were established as presenting the best results among the options studied. Process parameters such as initial pH, initial concentration of commercial molasses, pre inoculum age and inhibition by butanol concentration were also investigated. Results showed that initially adjusted pH 6,5 and pre inoculum at stationary phase achieved best productivity. Initial sucrose concentration of 76g.L<sup>-1</sup> from commercial molasses did not present inhibition of cell metabolism. On the other hand, initial butanol concentration of 7,0 g.L<sup>-1</sup> resulted in cell metabolism inhibition. When batch fermentation was performed without pH control at a 1L stirred tank, 2,39 g.L<sup>-1</sup> of butanol and 0,11 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> of productivity were obtained using commercial molasses and corn steep liquor as nutrient source. Comparatively, when batch fermentation was performed with pH level at 6,0, 5,77 g.L<sup>-1</sup> of butanol and 0,28 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> of productivity were reached.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Derivados de butanol com valor comercial.....	6
Figura 2. Mercado mundial de n-butanol por aplicação, em 2012 .....	7
Figura 3. Dados de comércio de n-butanol no Brasil no período de 1998 a 2018. ....	11
Figura 4. Dados de comércio relativos aos demais isômeros de butanol (iso-butanol, sec-butanol e tert-butanol), referente ao período de 1998 a 2018.....	12
Figura 5. Esquema simplificado de vias metabólicas para fermentação de diferentes substratos por espécies de <i>Clostridium</i> .....	17
Figura 6. Via metabólica da fermentação ABE típica, a partir do piruvato .....	18
Figura 7. Posição filogenética proposta para a estirpe <i>C. pasteurianum</i> NRRL B-598 .....	23
Figura 8. Ciclo da divisão celular simétrica e assimétrica de espécies de <i>Clostridium</i> .....	25
Figura 9. Esquema simplificado do processo de beneficiamento da cana-de-açúcar.....	27
Figura 10. Foto ilustrando dispositivo de amostragem para fermentação em frasco de penicilina de volume útil de 100 mL.....	34
Figura 11. Curva de calibração de peso seco de célula por absorbância medida, para a bactéria <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em espectrofotômetro da marca (A) Shimadzu e (B) Bell.....	37
Figura 12. Concentração de glicerol, ácido butírico, butanol, biomassa e valor de pH no ensaio glicerol em meio simples, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 .....	41
Figura 13. Concentração de glicerol, glicose, ácido butírico, butanol, biomassa e valor de pH no ensaio contendo glicerol e glicose em meio complexo, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 .....	42
Figura 14. Concentração de lactose, ácido butírico, butanol e biomassa e valores de pH no ensaio contendo lactose P.A. em meio complexo, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598....	44
Figura 15. Concentração de lactose, ácido butírico, butanol e biomassa e valores de pH no ensaio contendo lactose P.A. em meio simples, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 .....	45
Figura 16. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol e biomassa e valores de pH no ensaio contendo sacarose P.A. em meio complexo, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 .....	45
Figura 17. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol e biomassa e valores de pH no ensaio contendo sacarose P.A. em meio simples, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 .....	46
Figura 18. Concentração de glicose, ácido butírico, butanol, ácido acético, etanol, valor de pH e DO <sub>600 nm</sub> no ensaio contendo glicose em meio complexo, utilizando <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 .....	48

Figura 19. Concentração de glicose, ácido acético, etanol, valor de pH e DO <sub>600 nm</sub> para ensaio contendo glicose em meio simples, utilizando <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013.....	49
Figura 20. Concentração de glicerol, ácido acético, etanol, valor de pH e DO <sub>600 nm</sub> para ensaio glicerol em meio complexo, utilizando <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013.....	50
Figura 21. Concentração de glicerol, ácido acético, etanol, valor de pH e DO <sub>600 nm</sub> para ensaio contendo glicerol em meio simples, utilizando <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013.....	51
Figura 22. Concentração de lactose, ácido acético, etanol, valor de pH e DO <sub>600 nm</sub> para ensaio contendo lactose P.A. em meio complexo, utilizando <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 .....	52
Figura 23. Concentração de lactose, ácido acético, etanol, valor de pH e DO <sub>600 nm</sub> para ensaio contendo lactose P.A. em meio simples, utilizando <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013.....	53
Figura 24. Concentração de sacarose, ácido acético, etanol, valor de pH e DO <sub>600 nm</sub> para ensaio contendo sacarose P.A. em meio complexo, utilizando <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013.....	54
Figura 25. Concentração de sacarose, ácido acético, etanol, valor de pH e DO <sub>600 nm</sub> para ensaio contendo sacarose P.A. em meio simples, utilizando <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 .....	54
Figura 26. Produtividade máxima em etanol para experimentos utilizando <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 em diferentes composições de meio de cultivo.....	55
Figura 27. Perfil cinético da cepa <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo RCM de acordo com a Metodologia 1 .....	57
Figura 28. Perfil cinético da cepa <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo RCM de acordo com a Metodologia 2 .....	58
Figura 29. Perfil cinético da cepa <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo RCM de acordo com a Metodologia 3 .....	59
Figura 30. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e valores de pH utilizando meio de cultivo contendo melão e milhocina, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598.....	61
Figura 31. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e valores de pH utilizando meio de cultivo contendo melado e milhocina, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598.....	62
Figura 32. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e pH utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milhocina com pH ajustado antes da etapa de esterilização em: (A) 5,6 ; (B) 6,5 ; (C) 7,3 e (D) 8,5 .....	65
Figura 33. Rendimento em butanol ( $Y_{p/s}$ ), rendimento em célula ( $Y_{x/s}$ ) e produtividade ( $Q_p$ ) utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milhocina com	

pH ajustado antes da etapa de esterilização em: (A) 24 horas e (B) 48 horas de fermentação. $Y_{p/s}$ em $\text{gbutanol/g}_{\text{sacarose}}$ ; $Y_{x/s}$ em $\text{g}_{\text{biomassa/g}_{\text{sacarose}}}$ e $Q_p$ em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .....	66
Figura 34. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e valores de pH utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo contendo 25 $\text{g.L}^{-1}$ de milho e: (A) 10 $\text{g.L}^{-1}$ ; (B) 18 $\text{g.L}^{-1}$ ; (C) 26 $\text{g.L}^{-1}$ e (D) 76 $\text{g.L}^{-1}$ de sacarose proveniente do melado. ....	68
Figura 35. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e valores de pH utilizando meio de cultivo contendo melado e milho, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 proveniente de pré-inóculo em diferentes estágios: (A) D1; (B) D2; (C) D3 e (D) D4.	71
Figura 36. Rendimento em butanol ( $Y_{p/s}$ ), rendimento em célula ( $Y_{x/s}$ ) e produtividade ( $Q_p$ ) utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milho em diferentes condições de pré-inóculo. $Y_{p/s}$ em $\text{gbutanol/g}_{\text{sacarose}}$ ; $Y_{x/s}$ em $\text{g}_{\text{biomassa/g}_{\text{sacarose}}}$ e $Q_p$ em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .....	72
Figura 37. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e valores de pH utilizando meio de cultivo contendo melado e milho, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em diferentes concentrações iniciais de butanol: (A) 4,5 $\text{g.L}^{-1}$ ; (B) 5,5 $\text{g.L}^{-1}$ ; (C) 7,0 $\text{g.L}^{-1}$ e (D) 9,0 $\text{g.L}^{-1}$ .....	74
Figura 38. Rendimento em butanol ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade em butanol ( $Q_p$ ) nas condições contendo 4,5 e 5,5 $\text{g.L}^{-1}$ de butanol no meio de cultivo contendo melado e milho, utilizando <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598.....	75
Figura 39. Micrografias do centrifugado celular de <i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B-598 em 24 horas de crescimento em meio de cultivo contendo melado e milho em diferentes concentrações iniciais de butanol: (A) 4,5 $\text{g.L}^{-1}$ ; (B) 5,5 $\text{g.L}^{-1}$ ; (C) 7,0 $\text{g.L}^{-1}$ e (D) 9,0 $\text{g.L}^{-1}$ ..	77
Figura 40. Perfil cinético da cepa <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo de composição descrita por Patakova et al. (2011) (Ensaio 1). A linha vertical indica o tempo no qual a concentração de butanol foi máxima. ....	78
Figura 41. Perfil cinético da cepa <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e de composição descrita por Patakova et al. (2011) (Ensaio 2). A linha vertical indica o tempo no qual a concentração de butanol foi máxima. ....	80
Figura 42. Perfil cinético da cepa <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milho (Ensaio 3). A linha vertical indica o tempo no qual a concentração de butanol foi máxima.....	81

Figura 43. Micrografias do centrifugado celular de <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milhocina em diferentes tempos de fermentação: (A) 13 horas; (B) 15 horas e (C) 41 horas.....	82
Figura 44. Perfil cinético da cepa <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milhocina (Ensaio 4). A linha vertical indica o tempo no qual a concentração de butanol foi máxima.....	84
Figura 45. Perfil cinético da cepa <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milhocina (Ensaio 5). A linha vertical delimita o tempo no qual a concentração de butanol foi máxima.....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades do n-butanol .....	4
Tabela 2. Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas dos isômeros de butanol.....	4
Tabela 3. Propriedades energéticas de diferentes combustíveis.....	8
Tabela 4. Tabela comparativa de espécies capazes de realizar fermentação ABE a partir de melão.....	29
Tabela 5. Composição do meio de cultivo <i>Reinforced Clostridium Medium</i> (RCM) da marca OXOID .....	30
Tabela 6. Composição do meio de cultivo adaptado de Yadav et al. (2014) .....	32
Tabela 7. Composição e propriedades físico-químicas da milhocina cedida pela empresa Icredion Brasil. Análises realizadas pelo Laboratório Agrônomo S/C Ltda. (LAGRO).....	32
Tabela 8. Composição do meio de cultivo de Patakova et al. (2011).....	36
Tabela 9. Comparação de parâmetros cinéticos calculados dos experimentos .....	47
Tabela 10. Concentração de butanol ( $C_{\text{butanol}}$ ), produtividade máxima de butanol ( $Q_{\text{Pmáx}}$ ) e tempo (t) em ensaios contendo diferente matérias-primas .....	62
Tabela 11. Análise de variância de fator único (ANOVA) para produção de butanol e produtividade em butanol, realizada com a ferramenta análise de dados do Excel .....	63
Tabela 12. Produtividade em butanol, em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , em diferentes concentrações iniciais de sacarose proveniente do melado .....	69
Tabela 13. Comparação entre os parâmetros cinéticos calculados a partir dos resultados obtidos nos ensaios em biorreator. $C_{\text{máx}}$ é a concentração máxima de butanol obtida no tempo t, $Q_{\text{Pmáx}}$ é a produtividade máxima em butanol obtida no tempo t e $Y_{\text{p/s}}$ é o rendimento de substrato em butanol .....	87
Tabela 14. Resultados obtidos para a cepa <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 em cada etapa realizada no presente trabalho.....	89
Tabela 15. Comparação entre os resultados de concentração e produtividade em butanol obtidos no presente trabalho e diversas cepas de Clostridia solventogênica. ....	90

## ÍNDICE DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- ABE – acetona, butanol e etanol
- ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química
- ANOVA – análise de variância
- ATP – adenosina trifosfato
- $C_{m\acute{a}x}$  – concentração máxima
- CoA – coenzima A
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- dDDH -
- EUA – Estados Unidos da América
- FOB – *Free on board*
- g<sub>p.s.</sub>- gramas de peso seco de célula
- h – horas
- kg - quilogramas
- MJ – megajoule
- MON – *motor octane number*
- MT – megatoneladas
- NAD – *Nicotine adenine dinucleotide*
- RCM – *Reinforced Clostridia Medium*
- RJ – Rio de Janeiro
- RNA – ácido ribonucleio
- RON – *research octane number*
- rpm – rotações por minuto
- p/v – peso por volume
- p/p – peso por peso
- $Q_p$  – produtividade volumétrica em produto
- $t_{m\acute{a}x}$  – tempo no qual se obteve concentração máxima
- $Y_{P/S}$  – rendimento de substrato em produto
- $Y_{X/S}$  – rendimento de substrato em células

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Objetivos .....	3
3	Revisão Bibliográfica.....	4
3.1	Butanol.....	4
3.1.1	Produção de butanol.....	5
3.1.2	Mercado .....	8
3.1.3	Fermentação ABE.....	13
3.2	Matérias-primas .....	25
3.2.1	Milhocina .....	25
3.2.2	Melaço.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
5	Resultados e Discussão .....	41
5.1	Seleção do microrganismo e do meio de cultivo .....	41
5.1.1	<i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B-598 e Glicerol como substrato .....	41
5.1.2	<i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B-598 e Lactose como substrato .....	44
5.1.3	<i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B-598 e Sacarose como substrato .....	45
5.1.4	Parâmetros cinéticos para <i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598 .....	47
5.1.5	<i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 e Glicose como substrato .....	48
5.1.6	<i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 e Glicerol como substrato .....	49
5.1.7	<i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 e Lactose como substrato.....	51
5.1.8	<i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 e Sacarose como substrato.....	53
5.1.9	Parâmetros cinéticos para <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 .....	55
5.2	Cinética do pré-inóculo.....	56
5.3	Seleção da matéria-prima.....	60
5.4	Influência de parâmetros iniciais .....	63
5.4.1	pH.....	63

5.4.2	Concentração da matéria-prima .....	67
5.4.3	Idade do pré-inóculo .....	70
5.4.4	Toxicidade aguda provocada por concentração inicial de butanol .....	72
5.5	Ensaio em biorreator .....	77
5.5.1	Ensaio 1 .....	77
5.5.2	Ensaio 2 .....	79
5.5.3	Ensaio 3 .....	80
5.5.4	Ensaio 4 .....	83
5.5.5	Ensaio 5 .....	84
5.6	Análise final dos resultados .....	87
6	Conclusões .....	91
7	Sugestões para trabalhos futuros .....	92
8	Bibliografia.....	93



## 1 INTRODUÇÃO

A utilização da energia de origem fóssil está impactando o ciclo natural do carbono, uma vez que a queima de derivados do petróleo, gás natural e carvão vêm aumentando a emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera contribuindo para o aumento da temperatura média global (SWANA et al., 2011). As perspectivas de que a demanda energética poderá ultrapassar a capacidade das reservas, as flutuações do preço do petróleo, bem como o compromisso com a questão ambiental reacenderam o interesse por processos produtivos baseados em matérias-primas renováveis, direcionando esforços para o desenvolvimento de biorrefinarias. Segundo o Laboratório Nacional de Energia Renovável Americano (NREL – *National Renewable Energy Laboratory*) biorrefinaria é uma instalação que integra processos com o objetivo de converter de biomassa em combustíveis, energia e/ou químicos de interesse. Nesse contexto, a fermentação ABE se apresenta como uma potencial ferramenta para o desenvolvimento de biorrefinarias, visto que dentre seus produtos, o butanol e o etanol podem ser utilizados principalmente como biocombustível e, ainda, assim como a acetona são precursores de produtos químicos de valor agregado (GARCÍA et al., 2011).

O butanol pode ser utilizado diretamente como solvente para indústria farmacêutica ou diluente em formulações de fluido de freios. Alguns de seus derivados também possuem importância econômica, como butilglicol éter, butilacetato e plastificantes. Algumas propriedades do butanol tornam possível sua utilização direta na gasolina sem necessidade de modificação ou substituição dos motores, tornando-o um interessante candidato a biocombustível. (JIN et al., 2011; LEE et al., 2016).

Em países da Europa e da Ásia usa-se, majoritariamente, a gasolina e o diesel como combustíveis, estabelecendo a necessidade de expandir a incorporação de biocombustíveis em sua matriz energética. Surge, portanto, uma oportunidade para o Brasil de se tornar uma base de exportação do biobutanol, uma vez que possui grande disponibilidade de matéria-prima fermentável, além de instalações industriais de fermentação alcoólica já bem estabelecidas (NATALENSE; ZOUAIN, 2013).

Inúmeras espécies da classe de bactérias Clostridia são capazes de produzir quantidade significativa de butanol, sob condições apropriadas. O microrganismo mais descrito capaz de realizar fermentação ABE é a bactéria *Clostridium acetobutylicum*. No entanto, outras espécies também são consideradas como boas produtoras de butanol, como por exemplo *C. pasteurianum* e *C. beijerinckii* (KÖPKE; DÜRRE, 2011; PATAKOVA et al., 2011a; TACONI; VENKATARAMANAN; JOHNSON, 2009).

Tradicionalmente as tecnologias fermentativas tendem a possuir baixa conversão, o que torna economicamente desfavorável seu processo em larga escala (MASCAL, 2012). A produção biotecnológica de butanol possui alguns gargalos, tais como o substrato utilizado; o microrganismo escolhido; a toxicidade dos produtos, a composição do meio de cultivo e a estratégia de condução do processo. O custo da matéria-prima representa cerca de 60% do total da fermentação (MAITI et al., 2016).

A utilização de matérias-primas de baixo custo na composição do meio de cultivo caracteriza uma tentativa de tornar a produção de biobutanol mais competitiva economicamente. Resíduos e coprodutos de processos agroindustriais, como a milhocina e o melação, se tornam atrativos para o processo fermentativo pois são compostos ricos em minerais e nutrientes provenientes do vegetal de origem.

O melação é o subproduto da etapa de centrifugação, após evaporação e cristalização da sacarose e consiste em, aproximadamente, 50 a 60% (p/p) de açúcares redutores (sacarose, frutose e glicose), suspensões coloidais, metais, vitaminas e compostos nitrogenados provenientes da cana-de-açúcar. Devido ao seu alto teor de carboidratos fermentáveis e seu baixo custo, o melação se apresenta como um excelente substrato para fermentação. Nas indústrias sucroalcooleiras, por exemplo, existe uma unidade de fermentação alcoólica integradas à unidade de processamento da cana-de-açúcar, que utiliza o melação para produção de etanol combustível (NI; WANG; SUN, 2012).

A milhocina é a água resultante da etapa de maceração dos grãos de milho recuperada por evaporação. Consiste, essencialmente, dos componentes solúveis do milho que são extraídos durante o processo de maceração, que compreendem, em grande maioria, nitrogênio e aminoácidos. Normalmente, a milhocina é utilizada como complemento de ração animal devido ao seu alto teor calórico. Ainda, a milhocina pode ser utilizada diretamente como fertilizante ou em sua forma diluída (LIGGETT; KOFFLER, 1998).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a produção de butanol por duas espécies de *Clostridium*, utilizando melação e milhocina como componentes do meio de cultivo. Avaliou-se, ainda, a influência de parâmetros iniciais do processo na produção de butanol, a inibição por produto e diferentes estratégias de condução do processo fermentativo em biorreator.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho é avaliar a produção de butanol por espécies da bactéria *Clostridium*, via fermentação ABE, utilizando coprodutos agroindustriais de baixo valor como componentes do meio de cultivo.

Os objetivos específicos são:

- selecionar a melhor espécie de *Clostridium* produtora de butanol;
- selecionar o substrato a ser utilizado na fermentação ABE;
- avaliar a utilização de coprodutos agroindustriais como componentes do meio de cultivo;
- avaliar a influência de parâmetros iniciais do processo fermentativo na produção final de butanol: pH inicial, concentração inicial de substrato e a idade do pré-inóculo;
- avaliar o efeito inibitório do butanol no metabolismo celular;
- avaliar a produção de butanol em biorreator sob diferentes estratégias de condução do processo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Butanol

O butanol, também conhecido como álcool butílico ou n-butanol é um álcool primário de quatro carbonos, com sua hidroxila no carbono terminal. É um líquido incolor, com odor característico e forma vapor com efeito irritante à mucosas. É completamente miscível a solventes orgânicos e parcialmente miscível a água (LEE et al., 2008).

A Tabela 1 mostra algumas propriedades do n-butanol.

Tabela 1. Propriedades do n-butanol





<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O
<b>Peso molecular</b>	74,12 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Ponto de fusão</b>	-89,3 °C
<b>Ponto de ebulição</b>	117,7 °C
<b>Ponto de Flash</b>	35 °C
<b>Solubilidade em água</b>	70,7 g.L <sup>-1</sup>

Fonte: Adaptado de LEE et al., 2008.

O n-butanol possui isômeros de importância industrial, como o 2-butanol (ou sec-butanol), iso-butanol e tert-butanol, e suas diferenças estruturais determinam suas propriedades físicas. No entanto, esses isômeros possuem aplicações similares e podem ser utilizados, basicamente, como solventes, intermediários na fabricação de defensivos agrícolas, agentes de limpeza e aditivos combustíveis (JIN et al., 2011).

A Tabela 2 apresenta as principais diferenças estruturais e físico-químicas dos isômeros de butanol.

Tabela 2. Fórmula estrutural e propriedades físico-químicas dos isômeros de butanol

	n-butanol	sec-butanol	iso-butanol	tert-butanol
<b>Fórmula estrutural</b>				
<b>Densidade (kg.m<sup>-3</sup>)</b>	809,8	806,3	788,7	801,8
<b>Viscosidade (mPas)</b>	2,544	3,096	-	4,312

<b>Ponto de ebulição (°C)</b>	117,7	99,5	82,4	108
<b>Temperatura de autoignição (°C)</b>	343	406,1	477,8	415,6
<b>Entalpia de vaporização (kJ/kg)</b>	582	551	527	566

Fonte: Adaptado de JIN et al., 2011

### 3.1.1 Produção de butanol

Os três processos mais importantes para a indústria química de butanol são: a síntese OXO, síntese REPPE e a hidrogenação do crotonaldeído.

A principal via de síntese industrial do butanol é a hidroformilação do propeno, conhecida como síntese OXO. Na primeira etapa, o propeno reage com o gás de síntese (monóxido de carbono e hidrogênio), utilizando catalisador metálico (Co, Rh ou Ru), obtendo uma mistura de aldeídos. Posteriormente, os aldeídos são hidrogenados para a obtenção do butanol. As taxas isoméricas de butanol obtidas dependem das condições de pressão, temperatura e catalisador empregado (LEE et al., 2008; MASCAL, 2012).

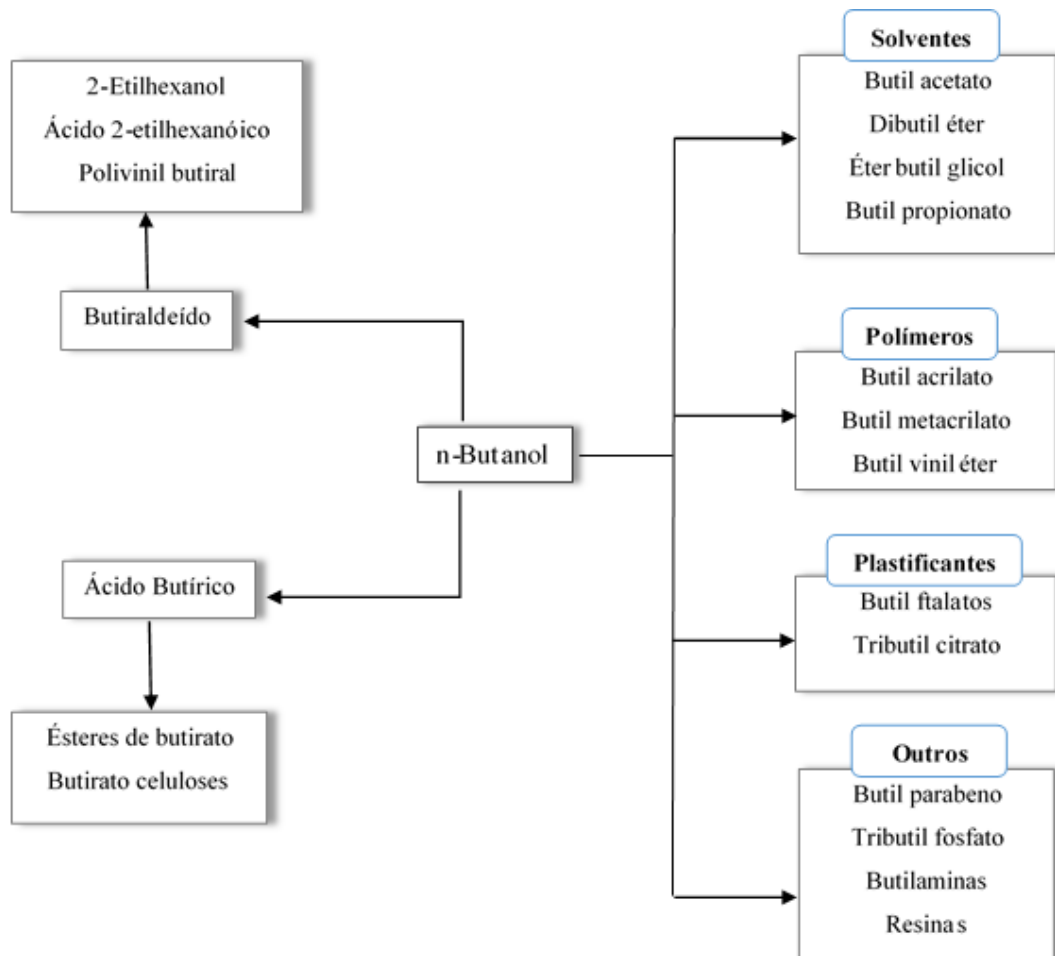
Na síntese REPPE, o propeno reage com monóxido de carbono e água, em presença de catalisador, obtendo butanol em condições brandas de temperatura e pressão. Por apresentar alto custo, esse processo não é aplicado comercialmente (LEE et al., 2008).

Já a rota de hidrogenação de crotonaldeído consiste na condensação, seguida por desidratação e hidrogenação de aldóis. Enquanto os outros processos dependem diretamente do petróleo, a hidrogenação de crotonaldeído pode ser realizada a partir de etanol, evidenciando uma rota alternativa à petroquímica. Nesse caso, o etanol deve ser desidrogenado para formar acetaldeído e, então, proceder a hidrogenação (LEE et al., 2008).

Além das vias de síntese química, o butanol também pode ser produzido por via bioquímica, a partir da fermentação de açúcares por microrganismos específicos. Embora todos os isômeros possam ser obtidos pela rota petroquímica, por diferentes métodos, o n-butanol é o isômero comumente produzido pela rota biotecnológica (JIN et al., 2011). Tradicionalmente as tecnologias fermentativas tendem a possuir baixa conversão, o que torna esse processo pouco competitivo em larga escala, quando comparado com as rotas químicas (MASCAL, 2012).

O butanol possui aplicação em diversos segmentos da economia. Na indústria farmacêutica o butanol pode ser utilizado como solvente, já na indústria automobilística esse álcool pode ser utilizado como diluente em formulações de fluido de freio. Além disso, alguns de seus derivados como butil glicol éter, butil acetato, butil ftalatos dentre outros também possuem importância econômica. Os ésteres butil acrilato e butil metacrilato são usados em revestimento de superfícies de látex, tintas e vernizes (LEE et al., 2016; LEE et al., 2008). A Figura 1 mostra esquema dos principais derivados do n-butanol.

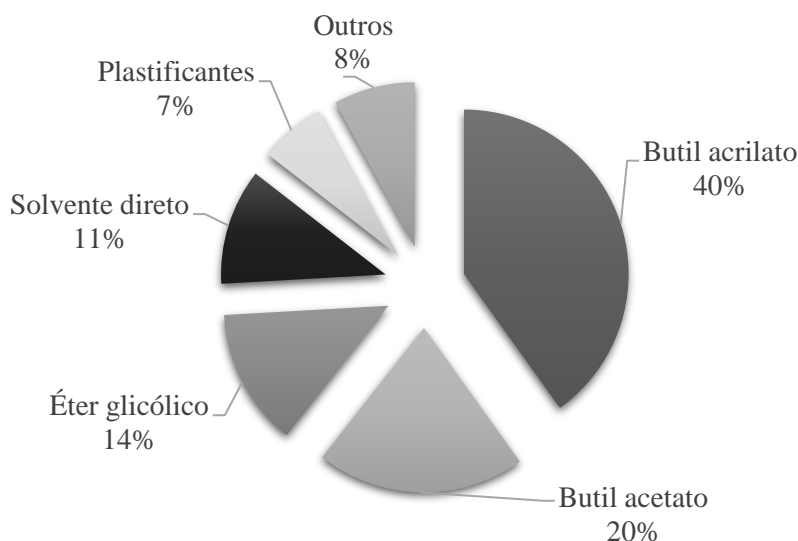
Figura 1. Derivados de butanol com valor comercial



Fonte: Adaptado de MASCAL, 2012

Dentre os derivados de valor comercial, o butil acrilato apresenta maior representatividade no mercado mundial, seguido do butil acetato. A distribuição das aplicações industriais do butanol e seus derivados é representada pela Figura 2, a seguir. Isso mostra a importância do butanol como insumo da indústria química, caracterizando-o como importante *building block*.

Figura 2. Mercado mundial de n-butanol por aplicação, em 2012



Fonte: Adaptado de LEE et al. (2016)

Atualmente, o principal interesse na utilização de butanol é sua aplicação como aditivo combustível. Algumas de suas propriedades tornam possível sua utilização direta na gasolina sem necessidade de modificação ou substituição dos motores. Adicionalmente, o butanol possui características que superam os álcoois de menor cadeia, como o etanol usualmente empregado como biocombustível (JIN et al., 2011).

Em comparação com o etanol, o butanol possui maior conteúdo energético, menor volatilidade, maior viscosidade e facilitada distribuição devido a sua menor corrosividade. Também possui vantagem na partida fria como resultado de sua menor temperatura de autoignição, além de apresentar menor consumo e maior autonomia do veículo. Ademais, por possuir menor pressão de vapor e maior ponto de *flash*, se torna mais seguro para uso em altas temperaturas (JIN et al., 2011).

Apesar das diferenças físico-químicas, o butanol e o etanol produzidos pela rota biotecnológica apresentam características sinérgicas. Ambos podem ser produzidos a partir de matérias-primas agroindustriais, como milho, trigo, cana-de-açúcar e mandioca. Uma planta industrial construída para a produção de bioetanol pode operar para produzir biobutanol se realizadas pequenas mudanças nas etapas de fermentação e destilação (JIN et al., 2011).

A Tabela 3 mostra as propriedades energéticas do butanol, gasolina, etanol e metanol. Em termos de densidade energética, o butanol possui cerca de  $10 \text{ MJ.L}^{-1}$  a mais que o etanol. O índice de octano representa a resistência à detonação de combustíveis em motores no ciclo

de Otto e pode variar em relação a rotação do motor. O índice de octano do tipo RON corresponde a rotação de 600 rpm, enquanto o tipo MON corresponde a rotação de 900 rpm.

Tabela 3. Propriedades energéticas de diferentes combustíveis

	Butanol	Gasolina	Etanol	Metanol
<b>Densidade energética (MJ.L<sup>-1</sup>)</b>	29,2	32	19,6	16
<b>Razão ar-combustível</b>	11,2	14,6	9	6,3
<b>Calor de vaporização (MJ.kg<sup>-1</sup>)</b>	0,43	0,36	0,92	1,2
<b>Índice de octano (RON)</b>	96	91-99	129	136
<b>Índice de octano (MON)</b>	78	81-89	102	104

Fonte: Adaptado de LEE et al. (2008).

Por outro lado, a utilização de butanol como combustível também possui desvantagens. Embora possua maior densidade energética que o etanol e o metanol, esse combustível possui calor de vaporização menor, o que requer aumento do fluxo de combustível no motor. O menor índice de octanagem do butanol indica menor eficiência de combustão, que por sua vez acarreta maior emissão de gases estufa por unidade de energia extraída, se comparado ao etanol. Sua maior viscosidade não é um problema para bombas de motor à diesel. No entanto, em motores de combustão interna, a alta viscosidade pode resultar em problemas de corrosão e lubrificação (JIN et al., 2011).

O butanol possui compatibilidade com os motores a gasolina e com dutos de transporte existentes. Misturas de butanol, em até 30%, na gasolina foram testadas em diferentes carros da Skoda® e não apresentaram efeitos negativos para os motores ou para o meio ambiente (MASCAL, 2012; PATAKOVA et al., 2011b). Em 2005, um americano viajou por 10.000 milhas, correspondente à 16.000 km, aproximadamente, pela costa dos EUA em um Buick 92, sem modificações, usando apenas butanol como combustível. O automóvel alcançou a marca de aproximadamente 8,5 km/L de butanol adicionado (BUTANOL, 2005).

### 3.1.2 Mercado

O butanol é uma *commodity* e possui preço de comercialização de, aproximadamente, US\$ 0,99/L. Em 2017, o mercado global de n-butanol foi estimado em 4,18 bilhões de dólares com projeção de movimentar 5,58 bilhões até 2022 com uma taxa de crescimento anual composta de 5,9% entre 2017 e 2022. O crescimento do mercado é estimulado pelo aumento da demanda de butanol como solvente ou intermediário de uso industrial (MANSUR et al., 2010; RESEARCH AND MARKET, 2018)



Atualmente, o propeno e o gás de síntese são as matérias-primas majoritariamente utilizadas para a síntese de butanol. Por ser proveniente do petróleo, o propeno está sujeito a variações de preço de acordo com as condições do mercado, impactando diretamente no preço final do butanol. A produção biotecnológica de butanol reduziria a demanda por propeno para essa finalidade, aumentando sua disponibilidade para utilização em rotas de síntese de demanda crescente, como por exemplo, a produção de prolipropileno.

O segmento de butil acrilato foi projetado como o maior mercado, em valor e volume, para o n-butanol até 2022, consumindo mais de um terço do total produzido deste solvente. O butil acrilato é utilizado para aumentar a flexibilidade, maleabilidade e a durabilidade de resinas de revestimento. Além disso, é utilizado na produção de homopolímeros e copolímeros incorporados em tinturas industriais a base de água. A crescente demanda por butil acrilato aumenta a necessidade de produção global de n-butanol (RESEARCH AND MARKET, 2018).

O mercado para n-butanol é mais de dez vezes maior que o mercado para o isobutanol. O n-butanol utilizado como solvente movimentava um mercado de 50 mil toneladas desse produto por ano nos EUA, o que corresponde a 8% do total de butanol consumido (MASCAL, 2012).

A China está liderando a recomercialização de butanol via fermentação ABE com uma capacidade produtiva de 210000 MT. No entanto, a fermentação ABE permanece economicamente viável apenas para o mercado de especialidades químicas. A nível de *commodity* o processo ABE ainda é custoso e pouco viável economicamente, sendo o maior custo da produção proveniente da etapa de *downstream* (SREEKUMAR et al., 2015).

Para tornar o processo biotecnológico economicamente viável é necessário investir em matérias-primas de baixo custo, aumento de performance da fermentação e operações sustentáveis para recuperação do solvente e reaproveitamento de água. A matéria-prima possui a maior contribuição no custo do processo. Para exemplificar, uma planta que opera utilizando amido de milho como fonte de substrato possui 79% do custo de operação relativo à matéria-prima, enquanto os custos com energia, incluindo a consumida para destilação, contribuem em 14% do custo total de operação. Portanto, qualquer flutuação no preço da matéria-prima pode impactar no preço do produto final (GREEN, 2011).

Além disso, o processo fermentativo gera três principais produtos: acetona, butanol e etanol. A recuperação do butanol no mosto fermentado é dificultada pela formação de azeótropos entre etanol e água, que demanda um gasto enorme de energia para obter a efetiva separação dos produtos (SWANA et al., 2011).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM), apenas duas empresas produziam isômeros de butanol no Brasil em 2018, a Oxiteno e a Elekeiroz.

Os isômeros de butanol produzidos pela ELEKEIROZ S/A são aplicados na produção de plastificantes, tintas, vernizes e acetatos. Também são utilizados na fabricação de éteres glicólicos e aditivos para lubrificantes. Já os produtos da OXITENO S/A são aplicados diretamente como solventes e na fabricação de aditivos agrícolas e agroquímicos comercializados pela própria empresa (OXITENO, 2018; ELEKEIROZ 2018).

Freitas (2012) reporta a existência da empresa Agace Sucroquímica como produtora de butanol por fermentação ABE de bactéria da classe Clostridia. Com uma capacidade instalada de 7,3 mil toneladas por ano, essa empresa operava no período de safra da cana-de açúcar, entre os meses de maio e novembro, na região de Campos dos Goytacazes (RJ). A produção de butanol era destinada, principalmente, para a fabricação de acetato de butila utilizado no processo de produção de tintas. No entanto, a Agace Sucroquímica declarou falência em 2013, cessando sua operação e, atualmente, encontra-se sob processo de recuperação judicial (TJRJ, 2018).

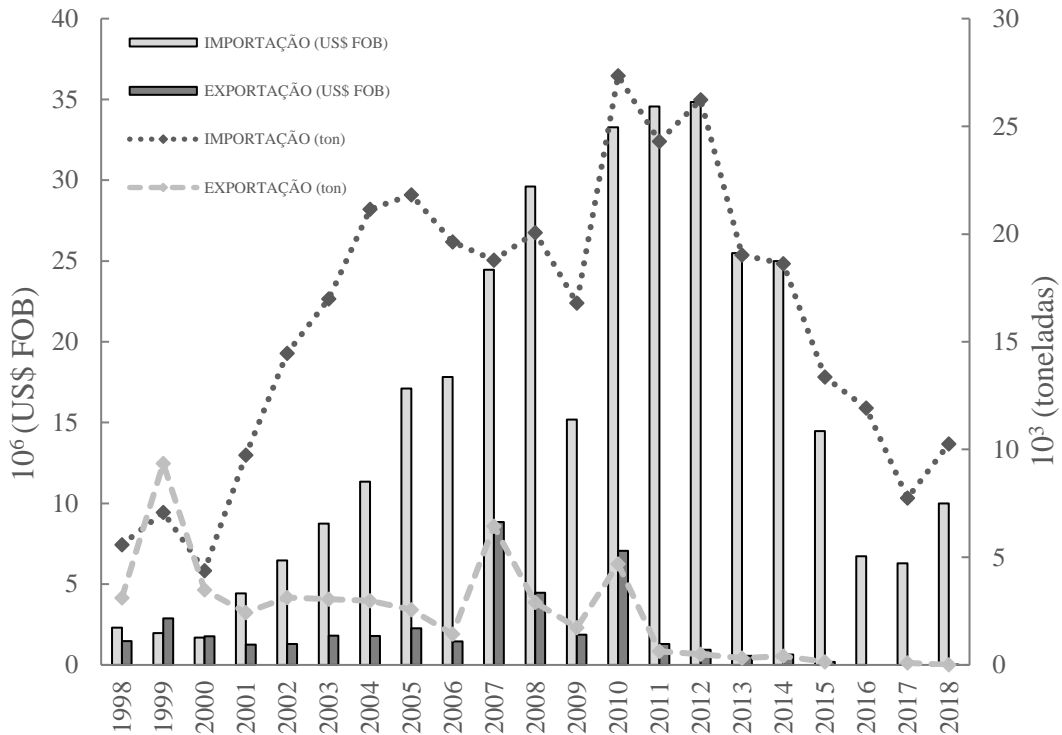
A Butamax, uma *joint venture* formada pela BP e pela DuPont, instalou em 2010, um laboratório de pesquisa para desenvolver a produção de isobutanol a partir da cana-de açúcar. A tecnologia é baseada na rota bioquímica que utiliza *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente para produzir biobutanol com alta seletividade. A empresa possui mais de 70 patentes registradas no mundo, nessa área. A expectativa é que a Butamax tenha capacidade produtiva para fabricar cerca de 7,5 bilhões de litros de biobutanol por ano, a partir de 2020, para abastecer o mercado internacional (NATALENSE; ZOUAIN, 2013)

A Granbio é uma empresa brasileira de biotecnologia, instalada em São Miguel dos Campos, em Alagoas, e possui capacidade de produzir 82 milhões de litros por ano de etanol de segunda geração. Em 2014, a GranBio e Rhodia formaram uma *joint venture* denominada SGBio, que através da aquisição de ativos da Cobalt Technologies aumentaram sua propriedade intelectual em tecnologias de alta performance na produção de bioquímicos. A SGBio possui foco na produção e *marketing* do bio n-butanol para aplicação na fabricação de tintas e solventes. O processo industrial será baseado na fermentação de açúcares de biomassa lignocelulósica, obtidos a partir de palha e bagaço de cana de açúcar. Segundo a Cobalt Technologies, o bio-butanol produzido pelo seu processo é 30% a 60% mais barato que o butanol produzido pela rota petroquímica (NATALENSE; ZOUAIN, 2013; GRANBIO, 2018)

O mercado brasileiro de n-butanol é bastante dependente de importação, como mostra a Figura 3. A partir do início da década de 2000, as importações de n-butanol aumentaram significativamente, superando as exportações. Em 2018, até o mês de agosto, as importações já

chegaram a um valor total de aproximadamente 10 milhões de US\$ FOB, correspondente a 10 mil toneladas, enquanto o valor exportado foi de 1120 US\$ FOB, equivalente a 640 kg.

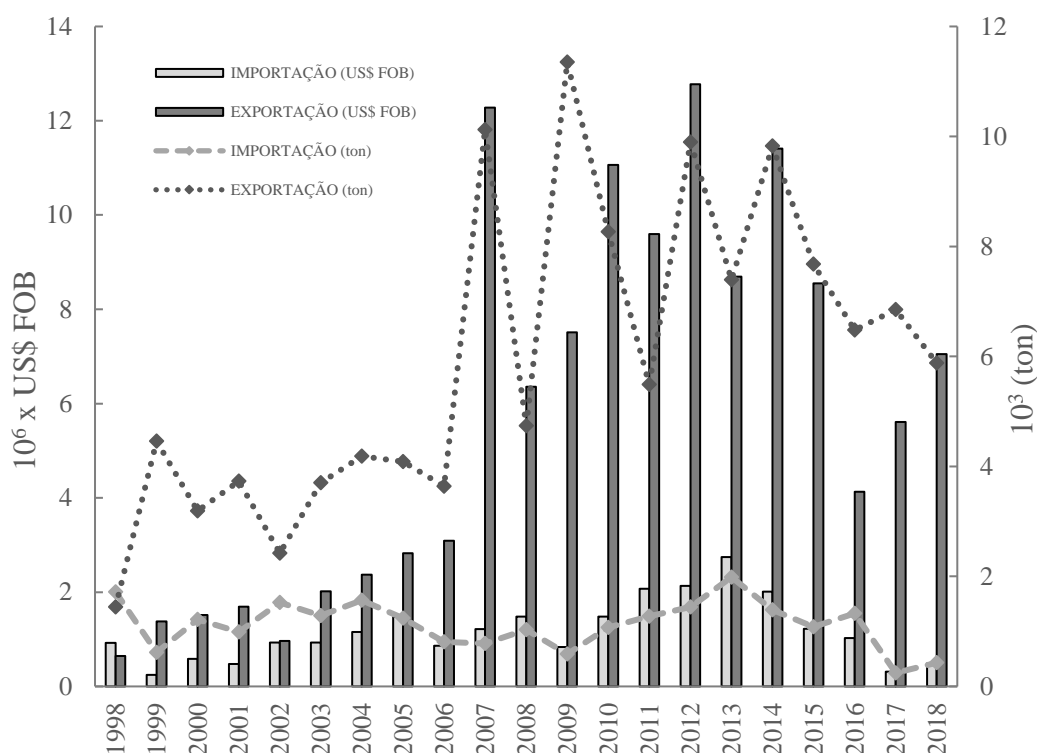
Figura 3. Dados de comércio de n-butanol no Brasil no período de 1998 a 2018.



Fonte: Elaboração própria a partir de dados do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (COMEX STAT, 2018).

Ao analisar os dados de mercado dos demais isômeros de butanol (iso-butano, sec-butanol e tert-butanol) como uma mesma categoria (Figura 4), é possível observar que a relação da balança comercial é inversa à observada para o n-butanol. As exportações superam as importações, representando um superávit para essa categoria. Isso se dá, principalmente, pela influência dos dados de exportação do sec-butanol, o mais significativo em valor e quantidade exportada. Até o mês de agosto de 2018, as importações correspondem a cerca de 490 mil US\$ FOB, enquanto as exportações chegaram a 7 milhões de US\$ FOB, dentre os quais 4,7 milhões de US\$ FOB equivalem a exportação apenas do sec-butanol.

Figura 4. Dados de comércio relativos aos demais isômeros de butanol (iso-butanol, sec-butanol e tert-butanol), referente ao período de 1998 a 2018.



Fonte: Elaboração própria a partir de dados do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (COMEX STAT, 2018).

Embora seja um isômero do n-butanol, o sec-butanol possui propriedades físico-químicas distintas e, por isso, sua aplicação predominante não é como aditivo combustível. O sec-butanol é majoritariamente utilizado para síntese de butanona, um solvente de aplicação industrial. Além disso, é utilizado como solvente de vernizes, adesivos, removedores e agentes flavorizante (JIN et al., 2011; PUBCHEM, 2018).

Ainda que exista a intenção de comercializar o butanol como um biocombustível, no Brasil essa aplicação não seria oportuna em um primeiro momento. Desde 1975, o etanol é comercializado puro ou misturado à gasolina e, por isso, tanto os motores dos automóveis como a logística de transporte são adaptados a esse álcool. A curto prazo, um possível alternativa seria fornecer o biobutanol para o mercado de químicos até que se estabeleça capacidade produtiva suficiente para suprir a demanda, caso ele venha a ser utilizado como biocombustível (NATALENSE; ZOUAIN, 2013)

Diferentemente do Brasil, países da Europa e da Ásia possuem sua matriz de combustíveis baseada, majoritariamente, em gasolina e diesel. Dessa forma, esses países veem a necessidade de expandir a incorporação de biocombustíveis em sua matriz energética diante

da crise energética global. Por possuir grande disponibilidade de matéria-prima fermentável e instalações industriais de fermentação alcoólica já bem estabelecidas, o Brasil tem a oportunidade de estabelecer uma base de exportação do biobutanol (NATALENSE; ZOUAIN, 2013).

### 3.1.3 Fermentação ABE

A produção microbiana de butanol foi primeiramente reportada por Louis Pasteur em 1861. No entanto, apenas em 1905 foi reportada a produção de acetona por fermentação (JONES; WOODS, 1986)

No início do século XX, uma escassez de borracha natural estimulou a interesse na produção de borracha sintética. O químico Chaim Weizmann estabeleceu que a melhor rota de produção seria a partir do butanol ou do álcool isoamílico. Iniciou-se, portanto, uma investigação para possibilidade de produção desses compostos por meios fermentativos. Em 1912 Weizmann isolou um microrganismo, posteriormente nomeado de *Clostridium acetobutylicum*, capaz de produzir butanol e acetona com alto rendimento a partir de matérias-primas amiláceas (DÜRRE, 2007; JONES; WOODS, 1986).

Com o início da Primeira Guerra Mundial em 1914, o exército inglês necessitou de grande quantidade de acetona para manufatura de cordite, componente de explosivos sem fumaça. Isso impulsionou a operação de plantas de fermentação ABE pelo processo Weizmann. Como consequência, produziu-se enorme quantidade de butanol que era subutilizado. Com o desenvolvimento da indústria automobilística, o butanol e seus ésteres passaram a ser consumidos como solvente para a produção de tinturas de automóveis (DÜRRE, 2007; JONES; WOODS, 1986).

Em 1936 a patente de Weizmann expirou e novas plantas de fermentação ABE a partir de melaço foram construídas nos EUA, Japão, Índia, Austrália e África do Sul. Na década de 1950, o fim da Segunda Guerra Mundial aliado ao surgimento da indústria petroquímica e o aumento no preço do melaço causaram o declínio da indústria de fermentação de acetona e butanol. A maioria das plantas fecharam em 1960, com exceção da fábrica Germiston, na África do Sul, onde o preço baixo do melaço permitiu sua operação até 1983 (PATAKOVA et al., 2011b).

O conceito de biorrefinaria é definido pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável Americano (NREL – *National Renewable Energy Laboratory*) como uma instalação que integra processos com o objetivo de converter de biomassa em combustíveis, energia e/ou químicos de interesse. Diante disto, a fermentação ABE se apresenta como possível ferramenta para o

desenvolvimento de biorrefinarias. Dentre os produtos da fermentação ABE, o butanol e o etanol podem ser utilizados diretamente como biocombustíveis e, assim como a acetona, também são precursores de produtos químicos de valor agregado (GARCÍA et al., 2011).

Inúmeras espécies da classe de bactérias Clostridia são capazes de produzir quantidade significativa de solventes, principalmente o butanol, sob condições apropriadas. O microrganismo modelo na fermentação ABE é a bactéria *Clostridium acetobutylicum*, uma vez que seu metabolismo é bastante descrito na literatura, tendo as enzimas e genes envolvidos na produção de butanol identificados e caracterizados (KÖPKE; DÜRRE, 2011). É importante ressaltar que por muito tempo outras espécies foram erroneamente classificadas como *C. acetobutylicum*. Apenas com o desenvolvimento de técnicas que permitiram a correta identificação das espécies que a classificação filogenética foi sendo atualizada (JONES; WOODS, 1986).

Tipicamente, *C. acetobutylicum* realiza fermentação em duas fases. Durante o crescimento exponencial as células produzem ácidos, acético e butírico, para gerar o máximo de ATP possível por substrato, o que resulta na diminuição do pH do meio de cultivo. Os ácidos butírico (pKa 4,82) e acético (pKa 4,75) em pH próximo ao seus pKa's prevalecem em sua forma não dissociada e, atravessam a membrana plasmática por difusão, chegando ao citoplasma. (KÖPKE; DÜRRE, 2011). Bactérias do gênero *Clostridium* são incapazes de manter o pH intracelular constante, e como consequência, o pH externo impacta diretamente nas condições bioquímicas e fisiológicas. Sob condições fisiológicas normais, o gradiente de pH transmembrana é mantido constante a uma diferença de 1 unidade a mais no meio intracelular (MILLAT; WINZER, 2017).

Como o ambiente citoplasmático tende a ser 1 unidade de pH acima do ambiente externo, os ácidos passam a sua forma ionizada e perturbam o gradiente transmembrana de prótons, influenciando mecanismos de transporte e conservação de energia. Nesse momento, a célula passa para a fase estacionária de crescimento e a produção de solventes é iniciada, permitindo que a célula se mantenha metabolicamente ativa por mais tempo. Concomitante ao consumo de açúcar, a célula passa a re-assimilar os ácidos, causando aumento do pH do meio de cultivo. Adicionalmente, a complexa formação de endósporos é iniciada. A associação temporal de fase estacionária, formação de solventes e esporulação pode levar a conclusão que a solventogênese está associada a esporulação e, logo, ao não crescimento celular. No entanto, é mais provável que esses processos dividam mecanismos regulatórios, controlados por um regulador gênico, como Spo0A (DÜRRE, 2014; MILLAT; WINZER, 2017).

Para *C. acetobutylicum*, o fator de transcrição Spo0A se liga aos genes envolvidos na esporulação, ativando-os, bem como ativa a transcrição dos genes contidos no operon sol, que são: acetoacetato descarboxilase (*adc*), álcool/aldeído desidrogenase (*adhE*) e coA transferases (*ctfAB*), envolvidos na solventogênese (LEE et al., 2008). Mutantes com deleção do Spo0A apresentam produção deficiente de solventes e dificuldade de septação enquanto mutantes que superexpressam Spo0A não produzem solventes visto que o processo de esporulação é muito acelerado (HARRIS; WELKER; PAPOUTSAKIS, 2002).

### 3.1.2.1 Clostridia solventogênica

O gênero *Clostridium* pertence à família Clostridiaceae, classe Clostridia e filo Firmicutes. Todas as espécies do gênero *Clostridium sensu stricto* são bactérias estritamente anaeróbicas, formadoras de esporos e possuem formato de bastonete. Embora anaeróbicas, algumas espécies apresentam maior tolerância ao oxigênio, podendo inclusive crescer na presença de ar atmosférico, sendo seu esporo completamente resistente ao O<sub>2</sub> (BERGEY, 2009; TRACY et al., 2012).

Em sua maioria, são Gram positivas e não redutoras de sulfato. Crescem rapidamente na faixa de pH de 6,5 a 7 e em temperaturas entre 30 e 37°C. A maioria das espécies *Clostridium sensu stricto* crescem heterotroficamente em açúcares e formam ácido butírico como produto principal da fermentação. Já as espécies denominadas homoacetogênicas produzem ácido acético como produto principal pela via Wood-Ljungdahl, autotroficamente a partir de CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> ou CO (BERGEY, 2009; DÜRRE, 2014).

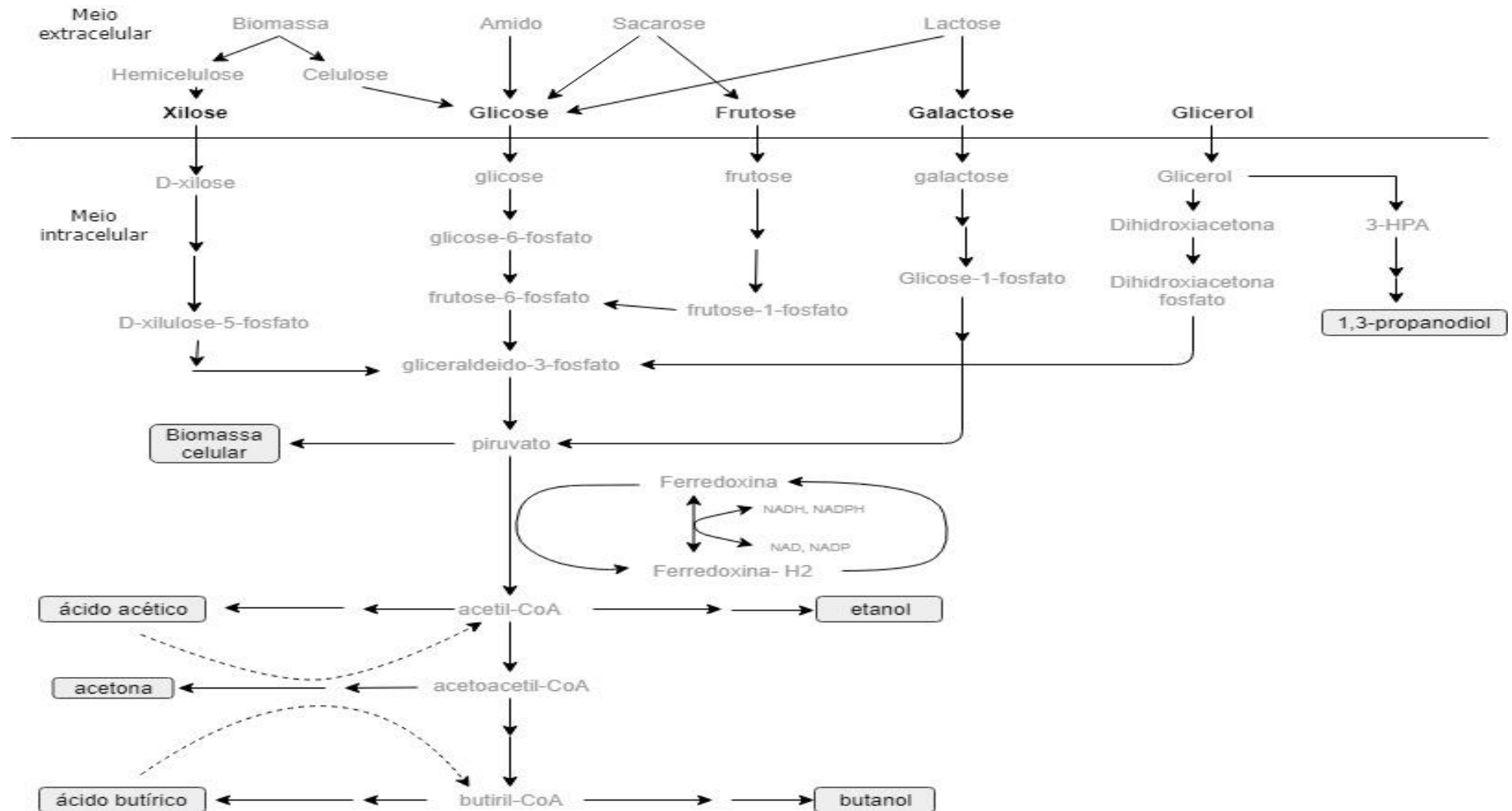
Por ser uma classe capaz de crescer em ambientes diversos, as bactérias da classe Clostridia desenvolveram habilidade de fermentar diferentes compostos orgânicos, como carboidratos simples e complexos, proteínas, aminoácidos e, inclusive, moléculas orgânicas tóxicas, os xenobióticos. Produzem metabólitos como butirato, acetato, lactato, butanol, acetona, acetoína, etanol, além de grande quantidade metabólitos gasosos como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Adicionalmente, a classe Clostridia sintetiza enzimas extracelulares variadas com o objetivo de degradar moléculas biológicas grandes como celulose, xilose, proteínas e lipídeos (TRACY et al., 2012).

Pelo fato de metabolizar desde carboidratos simples, mono ou dissacarídeos, a polissacarídeos complexos, Clostridia solventogênica torna possível estabelecer plataformas fermentativas utilizando matérias-primas baseadas em resíduos ou biomassa, que por sua vez, possuem misturas de açúcares (TRACY et al., 2012)

A Figura 5 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** ilustra, de maneira condensada, possíveis vias fermentativas partindo de diferentes substratos que podem ser metabolizados por espécies distintas de *Clostridium*. A partir do piruvato, a rota metabólica seguida pelas espécies de *Clostridium* é similar, formando os produtos principais da fermentação ABE, que são os ácidos acético e butírico e os solventes acetona, butanol e etanol.



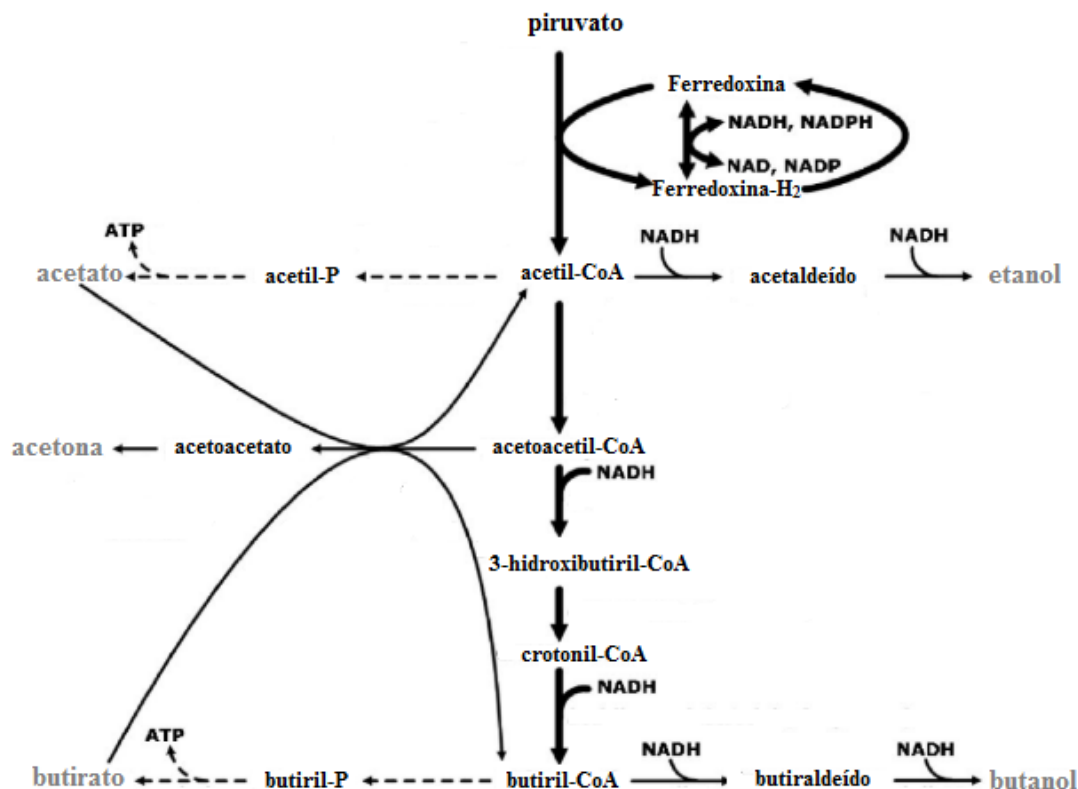
Figura 5. Esquema simplificado de vias metabólicas para fermentação de diferentes substratos por espécies de *Clostridium*



Fonte: Adaptado de PATAKOVA et al. (2013); DOBSON et al. (2012); LEE et al. (2008); TRACY et al. (2012)

A Figura 6 ilustra a via metabólica partindo do piruvato e considerando as moléculas de ATP e NADH envolvidas no metabolismo.

Figura 6. Via metabólica da fermentação ABE típica, a partir do piruvato



Fonte: Adaptado de LEE et al. (2008)

Muitas espécies de Clostridia formam butirato como produto principal da fermentação. Como poder ser visto na Figura 6, o piruvato é convertido a acetil-CoA, CO<sub>2</sub> e ferredoxina reduzida. Parte do acetil-CoA pode ser metabolizado a acetato, formando ATP na reação da enzima acetato quinase. Para a formação de butirato, duas moléculas de acetil-CoA são combinadas em acetoacetyl-CoA que é convertido a butirato passando pelos intermediários 3-hidroxi-butiril-CoA, crotonil-CoA e butiril-CoA (DÜRRE, 2014).

O butanol é formado pela ação da butiraldeído e butanol desidrogenases a partir de butiril-CoA, enquanto a acetona é formada pela descarboxilação do acetoacetato, que por sua vez é derivado do acetoacetyl-CoA pela ação da coenzima A transferase. Em algumas espécies de *C. beijerinckii*, a acetona pode ser posteriormente reduzida a isopropanol. No entanto, essas reações acontecem ao final da fase exponencial de crescimento, em que ocorre a típica fermentação butírica (DÜRRE, 2014).

A redução de ácidos em solventes não envolve síntese de ATP. O mecanismo de produção de solventes pode ser explicado como movimento de recuperação da coenzima A e regeneração de NAD (KIM; GADD, 2008).

Dentre a classe Clostridia solventogênica, as espécies *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* e *C. saccharobutylicum* são as maiores produtoras de solventes (DÜRRE, 2007). Algumas espécies são conhecidas por produzir solventes antes mesmo de chegar a fase estacionária, como a espécie *C. pasteurianum* (LIPOVSKY et al., 2016).

Em culturas contínuas com limitação de fosfato, nitrogênio e ferro, a mudança de fase pode ser regulada por mudança de pH externo. BAHLE et al. (1982) mostraram que quando o pH externo é maior que 5,2, as células estão priorizando a produção de ácido, enquanto a fase solventogênica é favorecida em pH externo menor que 5,1. Segundo os autores, o pH ótimo para a produção de butanol foi de 4,3.

### **3.1.2.2 Fatores que influenciam a produção de butanol**

A produção biotecnológica de butanol possui alguns gargalos: o substrato utilizado; o microrganismo escolhido; a toxicidade dos produtos e a composição do meio de cultivo. O custo da matéria-prima representa cerca de 60% do custo total da fermentação. No caso de matérias-primas lignocelulósicas, há necessidade de uma etapa de pré-tratamento que encarece o processo, além de seus produtos de hidrólise (compostos fenólicos e lignina) muitas vezes causarem efeitos inibitórios ao microrganismo (MAITI et al., 2016).

A concentração final de butanol obtida, cerca de 2% (p/v), é baixa quando comparada com a produção de etanol por levedura, que apresenta uma conversão de 10% (p/v). Isso torna a fermentação ABE pouco econômica tendo em vista que o processo de recuperação do produto é custoso, uma vez que exige alto consumo de energia. Tanto etanol quanto butanol formam azeótropos com água e exigem destilação em múltiplos estágios para garantir a separação completa de cada solvente, demandando alto consumo de energia. Técnicas de recuperação *in situ* tem como objetivos diminuir o custo de purificação do produto e aumentar a produtividade do processo, pois contornam o problema de toxicidade dos solventes. (MAITI et al., 2016; SREEKUMAR et al., 2015).

A escolha da estirpe a ser utilizada no processo industrial depende da natureza da matéria-prima a ser utilizada, da razão de produtos desejada, da necessidade de suplementação de nutrientes e da resistência à contaminação por bacteriófagos (JONES e WOODS, 1986).

Segundo Jones e Woods (1986), a produção típica de butanol é em torno de 11 a 13 g.L<sup>-1</sup> para microrganismos selvagens. A inibição total do crescimento acontece a 70 g.L<sup>-1</sup> de acetona, 12 a 16 g.L<sup>-1</sup> de butanol e 50 g.L<sup>-1</sup> de etanol.

Muitos metais são essenciais para o metabolismo Clostridial. No entanto, a faixa de concentração ótima é estreita para alguns metais, que em altas concentrações tornam-se tóxicos. Íons como Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> podem formar radicais de hidroperóxido que interferem na via de transporte de elétrons. Ainda, o íon Cu<sup>2+</sup> pode interagir com resíduos de cisteína presente na membrana do esporo e em proteínas de revestimento, acarretando efeitos negativos na esporulação e germinação desses microrganismos (MAITI et al., 2016).

Os íons Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> são muito importantes para o metabolismo energético da célula, visto que a conversão de piruvato a acetil-coA é realizada pela enzima ferredoxina oxidoreductase. Essa enzima é bastante importante para o equilíbrio redox da célula e, é instável e muito sensível a presença de oxigênio. Sob exposição a O<sub>2</sub> puro, a enzima é 50% inativada em 1 hora. Quando exposta a atmosfera de N<sub>2</sub> por 24 horas não é observada inativação da enzima (GHESLAGHI et al., 2009).

Para estimular o crescimento celular e produção de solventes é necessário, no geral, a presença de uma fonte complexa de nitrogênio, como extrato de levedura, e nutrientes minerais. A classe Clostridia, requer alto potencial redox para garantir a produção de butanol e etanol. Por isso, a adição de poder redutor ao meio de cultivo tende a aumentar a produção de butanol e etanol em detrimento a produção de acetona (LEE et al., 2008)

Em alta concentração, o butanol diminui a atividade de ATPases e desestabiliza a estrutura lipídica da membrana celular. Portanto, é esperado que cepas solvente tolerantes possam reduzir o custo final, diminuindo cerca de 50% o custo da purificação desse produto (MAITI et al., 2016).

A estratégia de condução do processo fermentativo também influencia na produção final de butanol. Em processos conduzidos em batelada simples, é possível alcançar alta concentração final de produtos e alto rendimento. No entanto, a baixa produtividade se torna um gargalo. Essa característica negativa pode ser associada à inibição por substrato e produto, além do limite de substrato que pode ser processado em uma única batelada. A técnica de batelada alimentada tende a reduzir a inibição por substrato e ocasiona um leve aumento na produtividade do sistema devido à adição de substrato e inclusão da taxa de diluição (LIPOVSKY et al., 2016).

No caso do processo contínuo esperam-se vantagens, ao menos teóricas, em relação ao processo em batelada, uma vez que se elimina a inibição por produto que esse

está sendo continuamente retirado. Em contrapartida, é difícil alcançar o estado estacionário verdadeiro nesse tipo de processo devido à fisiologia complexa do microrganismo, degeneração da cepa e provável contaminação. Além disso, a concentração de butanol na saída do reator é baixa o que torna alto o custo de sua separação (LI et al., 2016; LIPOVSKY et al., 2016).

Pesquisas mais recentes investigam a combinação de diferentes propostas de condução do processo fermentativo em conjunto com engenharia metabólica e modificações genéticas. O objetivo é obter elevadas concentrações de butanol bem como maximizar parâmetros de rendimento e produtividade de modo a tornar o processo mais competitivo industrialmente (MOON et al., 2016).

### 3.1.2.3 *Clostridium pasteurianum*

Nem todas as espécies e cepas da classe Clostridia produtora de solventes se comportam da mesma maneira (LIPOVSKY *et al.*, 2016). A espécie *Clostridium pasteurianum* difere da classe Clostridia solventogênica típica, pois as fases acidogênicas e solventogênicas se sobrepõem. A produção de butanol, portanto, começa durante a fase exponencial de crescimento, e os ácidos orgânicos produzidos não precisam ser totalmente convertidos em solventes. A taxa de solventes produzidos (butanol:acetona:etanol) também difere do padrão clássico (6:3:1) (KOLEK et al., 2015; PATAKOVA et al., 2013).

As células da espécie *Clostridium pasteurianum*, foram inicialmente isoladas do solo, possuem coloração positiva para Gram, no entanto, culturas mais velhas tendem a corar negativamente para Gram. Seus bastonetes costumam ocorrer sozinhos ou em pares e sua motilidade é variável. São bactérias granulose positivas, isto é, sintetizam grânulos de reserva que estocam em seu citoplasma antes da esporulação. Seus esporos são ovais, subterminais e aumentam o tamanho da célula. A temperatura ótima de crescimento é 37°C, no entanto, a bactéria pode crescer moderadamente a 25°C e não apresenta crescimento em temperaturas acima de 45°C. Além disso, são capazes de fixar N<sub>2</sub> atmosférico (BERGEY, 2009).

O crescimento da indústria de biodiesel resultou no acúmulo de glicerol, na forma de glicerina bruta. O custo de purificação da glicerina bruta para obter glicerol puro com aplicação direta na indústria química e farmacêutica é alto e se torna não economicamente viável quando considerado o volume total de glicerina bruta produzida. Dessa maneira, a utilização da glicerina bruta em bioprocessos se torna uma alternativa para absorver o excesso desse sub-produto no mercado (VENKATARAMANAN et al., 2012).

A possibilidade de utilização do glicerol como fonte de carbono para a produção de butanol por uma cepa mutante não formadora de esporos de *C. pasteurianum* foi inicialmente reportada por Dabrock (1992), seguido de Biebl (2001). Os dois utilizaram a cepa *C. pasteurianum* DSM 525, e em ambos os casos o padrão da fermentação divergiu da rota típica da fermentação ABE. Parte do glicerol é oxidado a dihidroxiacetona (DHA) pela enzima glicerol desidrogenase e posteriormente fosforilado pela dihidroxiacetona quinase originando a dihidroxiacetona fosfato (DAP), que segue para via glicolítica. O glicerol excedente é desidratado a 3-hidroxi propionaldeído (3HPA) e, então, reduzido a 1,3-propanodiol (PDO) (PATAKOVA et al., 2013).

Taconi et al. (2009) reportaram comportamento similar da cepa *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013, que produziu butanol, 1,3-propanodiol e etanol em meio contendo tanto glicerol puro como glicerina bruta proveniente da produção de biodiesel. A maior produtividade em butanol obtida por esse estudo foi de  $0,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Biebl (2001) realizou uma batelada simples utilizando a estirpe *C. pasteurianum* DSM 525 e, obteve  $10,7 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol e uma produtividade correspondente de  $0,56 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , a partir de glicerol.

No caso da espécie *C. acetobutylicum*, o glicerol só é consumido quando em conjunto com glicose, uma vez que o glicerol reprime a formação de  $\text{H}_2$  e elimina a síntese de acetona devido à necessidade de regenerar  $\text{NAD}^+$ , pois a formação desse composto na via fermentativa de glicerol é duas vezes maior se comparada à via fermentativa da glicose (PATAKOVA et al., 2013). Andrade e Vaconcelos (2003) obtiveram  $8,6 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol utilizando a cepa *C. acetobutylicum* ATCC 4259 em processo contínuo com uma mistura de glicerol e glicose como substrato. A produtividade obtida para o processo foi de  $0,42 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

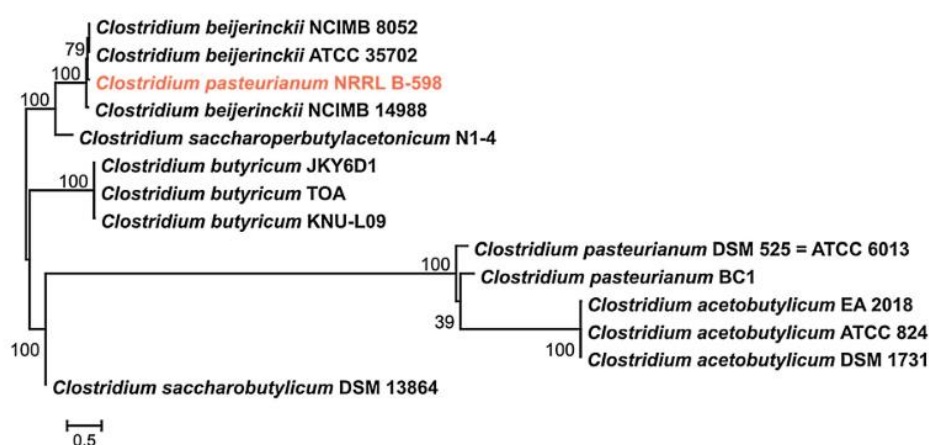
A espécie *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 é robusta e resistente a pequenas mudanças no processo fermentativo, além de possuir alta tolerância ao oxigênio quando comparada com outras espécies de *Clostridium*. Grande produção de  $\text{H}_2$ , pouquíssima produção de etanol e a não utilização de glicerol como substrato são importantes características dessa cepa. Embora seja incapaz de utilizar glicerol como substrato, essa cepa pode fermentar uma grande variedade de substratos como glicose, xilose, arabinose, manose, sacarose, lactose, celobiose e amido. A mudança no metabolismo da fase acidogênica para fase solventogênica, ocorre no início da fermentação, durante a fase exponencial, e a reutilização de ácido é pouca ou nenhuma. Além disso, essa cepa é pouco tolerante à concentração de butanol (LIPOVSKY et al., 2016; SEDLAR et al., 2017).

Sua inabilidade de fermentar glicerol instigou a hipótese de má classificação filogenética, visto que essa é a característica principal de bactérias da espécie *Clostridium pasteurianum*. Sedlar e colaboradores (2017), analisaram comparativamente a sequência de rRNA 16S da estirpe *C. pasteurianum* NRRL B-598 com a estirpe típica *C. pasteurianum* ATCC 6013 e encontraram uma similaridade de apenas 92%. Por análise de dDDH (hibridação DNA-DNA) a estirpe em questão mostrou muita similaridade com a espécie *C. beijerinckii* e pouca similaridade com a espécie *C. pasteurianum* ATCC 6013. *C. pasteurianum* NRRL B-598 não se mostrou idêntica a nenhuma estirpe de *C. beijerinckii* e, portanto, se classificaria como uma nova estirpe dessa espécie.

Uma diferença genômica importante entre *C. beijerinckii* e *C. pasteurianum* é a composição do operon *sol* envolvido na solventogênese. Na estirpe *C. pasteurianum* este operon consiste dos genes *adhE* (álcool/acetaldéido desidrogenase), *ctfA* (CoA transferase subunidade A), *ctfB* (CoA transferase subunidade B) e *adc* (acetacetado descarboxilase). Na espécie *C. beijerinckii*, como na *C. pasteurianum* NRRL B-598, o gene *adhE* não está presente no operon *sol* e, sim, o gene *ald* (aldeído desidrogenase) (SEDLAR et al., 2017). Essa característica torna a cepa *C. pasteurianum* NRRL B-598 geneticamente mais próxima à espécie *C. beijerinckii*.

Dessa forma, os pesquisadores propõem uma nova organização filogenética para essa espécie, como mostrado na Figura 7, bem como sua nova denominação como *C. beijerinckii* NRRL B-598.

Figura 7. Posição filogenética proposta para a estirpe *C. pasteurianum* NRRL B-598



Fonte: SEDLAR et al. (2017)

### 3.1.2.4 *Clostridium beijerinckii*

Bergey (2009) classifica as bactérias da espécie *Clostridium beijerinckii* como Gram positivas, podendo corar como Gram negativa em culturas mais antigas. Possuem

forma de bastonetes retos com as bordas arredondadas que costumam ocorrer sozinhos, em pares ou em pequenas cadeias. Seus endósporos são ovais, podendo ser cêntricos ou subterminais e levam ao inchaço celular. A temperatura ótima de crescimento é 37°C, crescendo muito pouco ou nada nas temperaturas de 25°C e 45°C. Suas estirpes foram isoladas do solo, feridas infectadas, azeitonas fermentadas e fezes humanas. São capazes de fixar N<sub>2</sub> e produzem gás (CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>) abundantemente. Das características listadas muitas são compartilhadas pela espécie *Clostridium pasteurianum* sendo, portanto, compreensível a classificação filogenética incorreta da estirpe NRRL B-598.

Algumas estirpes de *C. beijerinckii* possuem habilidade de produzir 2-propanol a partir da acetona por uma isoenzima de álcool desidrogenase, dependente de NADPH. A ausência de acetona no mosto fermentado pode ser considerada uma vantagem do ponto de vista comercial, uma vez que esse produto não possui aplicação como componente combustível como o 2-propanol (PATAKOVA et al., 2013).

Parekh et al. (1998) obtiveram 12,6 g.L<sup>-1</sup> de butanol e produtividade em butanol de 0,25 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> a partir de glicose, em batelada simples, utilizando uma cepa selvagem de *C. beijerinckii* NCIMB 8052. Moon et al. (2015) utilizaram a cepa isolada *C. beijerinckii optinoii* para produzir butanol a partir de glicose e obtiveram uma concentração máxima de 6,45 g.L<sup>-1</sup> e uma produtividade máxima de 0,10 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. ZHANG e JIA (2018) utilizaram hidrolisado de espiga de milho como fonte de carbono para fermentação ABE da cepa *C. beijerinckii* SE-2. A concentração obtida de butanol foi de 11,65 g.L<sup>-1</sup>, com produtividade de 0,16 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

### 3.1.2.5 Processo morfológico

Durante o processo de esporulação a célula passa por diferentes mudanças morfológicas. A primeira morfologia distinta que a célula adota é a chamada clostridial. Devido ao acúmulo de granulose, que são vesículas de armazenamento de amilopectina, a célula incha e adota forma de um charuto. Esta morfologia foi, inicialmente, reconhecida como a responsável pela formação de solvente, no entanto, sabe-se que a solventogênese se inicia antes da célula atingir a forma clostridial. No chamado estado vegetativo, em condições favoráveis, a célula se divide por fissão binária. Sob situação de estresse, como acúmulo de ácidos no ambiente intracelular, depleção de nutrientes ou presença de oxigênio, o DNA replicado segue para divisão assimétrica. Forma-se um septo assimétrico em uma extremidade da célula que será destinado a formar o endósporo. Uma membrana envolve o material genético replicado e, em seguida, o esporo passa pelo processo de maturação no qual formam-se o córtex e a camada de revestimento. As



características adquiridas no processo de maturação permitem quem o esporo seja a forma mais resistente da célula, sendo capaz de resistir ao calor, químicos, dessecação e radiação (AL-HINAI et al., 2015; DÜRRE, 2014)

A Figura 8 esquematiza as diferentes morfologias observadas nas bactérias da classe Clostridia solventogênica.

Figura 8. Ciclo da divisão celular simétrica e assimétrica de espécies de *Clostridium*



Fonte: DÜRRE (2014)

## 3.2 Matérias-primas

### 3.2.1 Milhocina

O milho é um cereal originário da América que após o descobrimento foi levado para Europa e Ásia. Hoje, o milho é um dos cereais mais cultivados em todos os continentes. Seu grão é composto por endosperma, película, água e germe. O endosperma corresponde à maior parte do grão, cerca de 80% do peso total, e é composta, majoritariamente, por amido e glúten que envolve os grânulos de amido. A película (ou pericarpo) é a parte que reveste o grão e, após devido processamento, é empregada como ingrediente em ração animal. O germe é extremamente rico em lipídios e é componente importante para alimentos, produtos farmacêuticos e outras aplicações industriais (ABIMILHO, 2018).

A industrialização do milho é dividida em dois processos: moagem a seco, processo menos tecnológico e, moagem úmida, que gera produtos de maior valor agregado (CARDOSO et al., 2010).

No processo de moagem por via seca o grão é degerminado e separado em endosperma, pericarpo e germe. O endosperma seco é fragmentado, dando origem aos produtos de interesse comercial. Na moagem via úmida adiciona-se uma etapa de maceração, na qual incorpora-se água ao grão. A finalidade dessa etapa é aumentar a eficiência da separação de proteínas e grânulos de amido do endosperma.

A água utilizada na maceração contém 0,1 a 0,2% de dióxido de enxofre, que além de inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes, possibilita o rompimento de ligações dissulfeto que envolvem os grânulos de amido na matriz proteica. Nessa água é comumente observada a proliferação de *Lactobacillus sp.*, que consome parte dos açúcares solúveis presentes e produz ácido lático, ocasionando a diminuição do pH (CARDOSO et al., 2010).

A milhocina é, portanto, a água resultante da etapa de maceração dos grãos de milho recuperada por evaporação. Consiste, essencialmente, dos componentes solúveis do milho que são extraídos durante o processo de maceração, em sua maioria grandes quantidades de nitrogênio e aminoácidos. Normalmente, a milhocina é utilizada como complemento de ração animal (LIGGETT; KOFFLER, 1998)

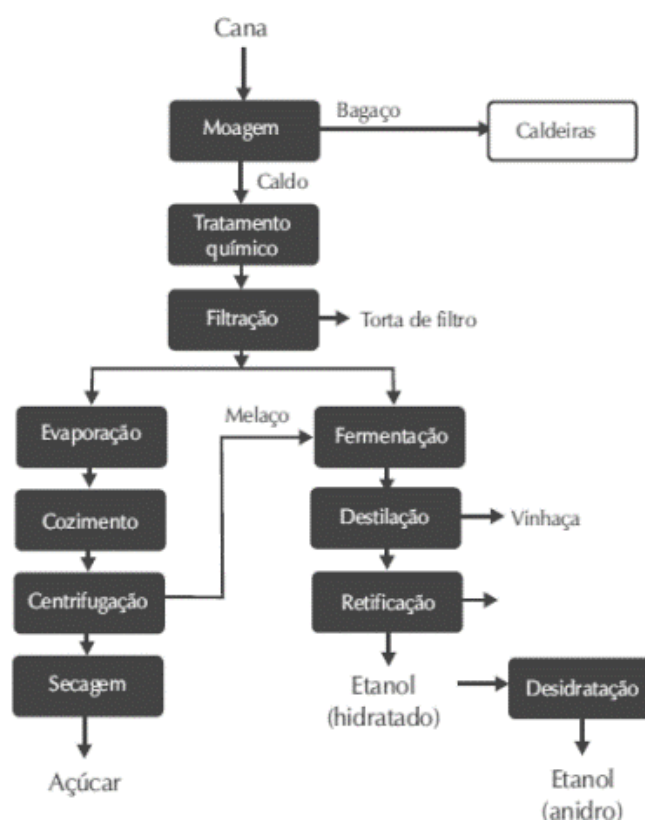
Em escala laboratorial, a milhocina pode ser utilizada para substituir extratos ou como fonte principal de nitrogênio e carbono. No geral, qualquer microrganismo que cresça em meio simples contendo extrato de carne ou peptona irá crescer em meio contendo apenas milhocina. Industrialmente, a milhocina contribuiu para o rápido desenvolvimento da indústria de penicilina. Em 1946, Moyer e Coghill, descobriram o aumento significativo nos rendimentos de produção de penicilina por *Penicilium notatum-chrysogenum* em meio de cultivo suplementado com milhocina (LIGGETT; KOFFLER, 1998)

Na literatura, muitos estudos utilizam milhocina como componente do meio de cultivo para produção de produtos biotecnológicos de valor comercial. Liu et al. (2015) utilizaram a milhocina como fonte de nitrogênio orgânico e vitaminas para produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b. Wischral et al. (2016) estudaram a viabilidade da substituição de extrato de levedura por milhocina na composição do meio de cultivo para a produção de 1,3-propanodiol por *C. beijerinckii* DSM 791. Saxena e Tanner (2012) buscaram otimizar a fermentação de gás de síntese para produzir etanol por *C. ragsdalei*, introduzindo a milhocina como um substituto barato para fontes complexas de nutrientes como extrato de levedura e triptona.

### 3.2.2 Melação

O melação é o co-produto majoritário da indústria sucroquímica, que consiste no processamento da cana-de-açúcar. O processo de fabricação do açúcar, de maneira simplificada, visa extrair o caldo contido no colmo da cana, que é rico em sacarose, prepará-lo e concentrá-lo, de forma a obter vários tipos de açúcares. Em linhas gerais a cana-de-açúcar segue as seguintes etapas: lavagem e preparo da cana, extração do caldo, clarificação e filtração, evaporação do caldo, cozimentos, cristalização da sacarose, centrifugação, secagem e estocagem (Figura 9) (EMBRAPA, 2018).

Figura 9. Esquema simplificado do processo de beneficiamento da cana-de-açúcar



Fonte: DOS SANTOS, 2011

A etapa de extração consiste no processo físico de separação da fibra (bagaço) do caldo, e pode ser realizada por meio de dois processos: moagem ou difusão. O bagaço produzido nessa etapa é, usualmente, utilizado como combustível nas caldeiras, embora já existam diretrizes que visam seu reaproveitamento em bioprocessos (MEZARROBA et al., 2010).

Do caldo de cana extraído removem-se as impurezas grosseiras e segue para o tratamento químico (etapa de clarificação). O caldo tratado contém cerca de 85% de

umidade e segue, então, para evaporação. Nessa etapa, o caldo é concentrado obtendo um xarope grosso e amarelado, com teor de sólidos solúveis entre 60 e 70° BRIX. A esse xarope, dá-se o nome de melado. O produto dessa etapa passa por um processo de cozimento, onde recebe uma carga de vapor até atingir grau de supersaturação, tomando consistência de mel. Em seguida, o material segue para os cristalizadores, cujo objetivo é produzir cristais mais uniformes, do tamanho desejado (MACHADO, 2012; MEZARROBA et al., 2010; HAMERSKI, 2009).

Na etapa de centrifugação, separa-se os cristais para obter o açúcar propriamente dito. Ao subproduto desta etapa dá-se o nome de melaço (MACHADO, 2012).

O melaço é, portanto, produto da etapa de centrifugação do xarope simples e consiste em, aproximadamente, 50 a 60% (p/p) de açúcares redutores (sacarose, frutose e glicose), suspensões coloidais, metais, vitaminas e compostos nitrogenados provenientes da cana-de-açúcar. A composição do melaço varia, assim como a da cana-de-açúcar, de acordo com a localidade, variedade vegetal, composição do solo, clima e método de processamento.

Devido ao seu alto teor de carboidratos fermentáveis e seu baixo custo, o melaço se apresenta como excelente matéria-prima para fermentação. Geralmente, nas usinas de processamento de cana-de-açúcar já existe uma unidade de fermentação alcoólica que utiliza o melaço para produção de etanol combustível (NI; WANG; SUN, 2012).

Na fermentação ABE, a utilização do melaço é bastante conveniente pois é uma matéria-prima líquida, ou seja, de fácil manuseio, apresenta relativa facilidade de esterilização, não necessita de hidrólise prévia à fermentação, além de ser relativamente barata (NI; WANG; SUN, 2012; VAN DER MERWE, 2010).

A utilização de melaço de cana como matéria prima de processos fermentativos tem sido reportada para produção de ácido butírico, ácido glucônico, ácido cítrico, isopropanol e na fermentação ABE (IKRAM-UL; ALI, 2004; JIANG et al., 2009; MOON et al., 2015; NI; WANG; SUN, 2012; SHARMA; VIVEKANAND; SINGH, 2008)

A Tabela 4 mostra diferentes cepas e espécies de *Clostridium* que são capazes de realizar fermentação ABE a partir de melaço e seus resultados.

Tabela 4. Tabela comparativa de espécies capazes de realizar fermentação ABE a partir de melação

Estirpe	Solventes Totais (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Referência
<i>C. acetobutylicum</i>				
PCSIR-10	19,2	34,0	0,42	Syed (1994) <i>apud</i> Van der Merwe (2012)
PCSIR-5	15,2	30,0	0,24	Syed (1994) <i>apud</i> Van der Merwe (2012)
ATCC 4259	9,5	15,8	N.D.	Shaheen et al. (2000)
ATCC 824	7,8	13,0	N.D.	Shaheen et al. (2000)
<i>C. beijerinckii</i>				
BA 101	22,8	39,0	0,19	Ezeji et al. (2004)
NCP P260	18,9	31,5	N.D.	Shaheen et al. (2000)
<i>C. saccharobutylicum</i>				
BAS/B3/SW/336(S)	19,6	30,0	N.D.	Shaheen et al. (2000)
NCP P108	18,6	28,6	N.D.	Shaheen et al. (2000)

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo

A bactéria *C.beijerinckii* NRRL B-598 é uma bactéria selvagem e foi adquirida em ampola liofilizada da *Agricultural Research Service Culture Collection* pertencente à *United States Department of Agriculture*.

A bactéria *C. pasteurianum* ATCC 6013 também é uma bactéria selvagem e foi adquirida em ampola liofilizada da Coleção de Culturas Tropicadas pertencente à Fundação Andre Tosello de Pesquisa e Tecnologia.

### 4.2 Reativação e conservação

Ambas as estirpes foram reativadas em meio *Reinforced Clostridium Medium* (RCM), da marca OXOID de composição descrita na Tabela 5.

Tabela 5. Composição do meio de cultivo *Reinforced Clostridium Medium* (RCM) da marca OXOID

Composição	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Extrato de carne	10
Peptona	5
Cloreto de sódio	5
Dextrose	5
Extrato de levedo	3
Acetato de sódio	3
Amido solúvel	1
L-cisteína HCl	0,5
Agar	0,5
pH	6,8

O meio RCM comercial solubilizado é submetido ao aquecimento até ebulição e fracionado em volumes de 47 mL para cada frasco. Em seguida, é adicionado N<sub>2</sub> por 5 minutos imediatamente antes de serem vedados com rolhas de borracha e lacres de alumínio. Os frascos seguem para a etapa de esterilização, na qual permanecem por 15 min sob temperatura de 121°C em autoclave.

A cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 foi reativada no interior de uma câmara anaeróbica adaptada. A ampola de vidro foi quebrada mecanicamente e o material liofilizado foi resuspendido em meio RCM. Em seguida, o volume de suspensão foi utilizado para inocular dois frascos de soro contendo 47 mL de meio RCM cada,

previamente autoclavados. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 37°C, sob agitação de 150 rpm, até crescimento visível (aparecimento de turvação no meio).

Após crescido, um frasco de penicilina foi utilizado como pré-inóculo para novos frascos contendo RCM, que foram incubados a 37°C, 150 rpm, durante 24 horas e mantidos crescidos a 4°C. O segundo frasco crescido foi utilizado para montar um banco de conservação dessas células. A um criotubo, previamente autoclavado, contendo 0,5 mL de solução 60% (v/v) de glicerol foi adicionado 1,0 mL de células crescidas. Dessa forma, a solução de glicerol foi diluída a 20% (v/v), concentração que apresenta atividade crioprotetora, com cada criotubo apresentando uma concentração inicial de 1,27 g<sub>p.s.</sub>L<sup>-1</sup> de células.

Os criotubos foram congelados em ultra freezer vertical ColdLab CL374-80 (a -50°C) parcialmente imersos em solução de álcool isopropílico para possibilitar a diminuição gradual da temperatura e, por consequência, evitar a formação abrupta de cristais que possam lisar a parede celular e comprometer a viabilidade.

A cada mês um criotubo foi retirado do ultra-freezer e parcialmente mergulhado em banho a 37°C para o descongelamento rápido. Após o descongelamento, foi retirado 1,0 mL do criotubo e inoculado em frasco de penicilina pequeno contendo 19 mL de meio RCM estéril. Esse frasco foi incubado em agitador rotatório sob agitação de 180 rpm a 37°C. Após 24 horas, utilizou-se esse frasco como pré-inóculo para novos frascos de soro contendo 47 mL, aos quais foram adicionados 3 mL de meio crescido de células. Esses frascos, foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C, por aproximadamente 24 horas. Esses novos frascos crescidos serviram, portanto, como pré inóculo para os experimentos.

A reativação da cepa *C. pasteurianum* ATCC 6013 se deu seguindo o protocolo acima descrito.

### **4.3 Ensaios preliminares**

#### **4.3.1 Seleção de meio de cultivo e microrganismo**

Com a finalidade selecionar o melhor microrganismo produtor de butanol e a matéria-prima a ser utilizada, foram estudadas diferentes composições de meio de cultivo. Como fonte de carbono foram avaliadas glicose, glicerol, sacarose e lactose. Como fonte de nutrientes foi avaliada a utilização de um meio complexo adaptado de Yadav et al. (2014), cuja composição está descrita na Tabela 6 e de milhocina como única fonte de nutrientes.

Tabela 6. Composição do meio de cultivo adaptado de Yadav et al. (2014)

Composição	Concentração
Extrato de levedura	5 g.L <sup>-1</sup>
Peptona	10 g.L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g.L <sup>-1</sup>
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2 g.L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2 g.L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 g.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> S	0,02 g.L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,028 g.L <sup>-1</sup>
pH	6,5

A milhocina foi utilizada na forma líquida e é proveniente do processo produtivo da empresa Ingredion Brasil – Ingredientes Industriais Ltda. e, passou por análises do Laboratório Agrônomo S/C Ltda. (LAGRO). Sua composição e propriedades físico-químicas se encontram descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Composição e propriedades físico-químicas da milhocina cedida pela empresa Ingredion Brasil. Análises realizadas pelo Laboratório Agrônomo S/C Ltda. (LAGRO).

Minerais		Vitaminas	
Nitrogênio	3,41 %		
Fósforo Total	1,12 %		
Potássio	2,90 %	Biotina	0,3 mg.kg <sup>-1</sup>
Cálcio	2,00 %	Cholina	3500,0 mg.kg <sup>-1</sup>
Magnésio	0,95 %	Inositol	6000,0 mg.kg <sup>-1</sup>
Enxofre	0,25 %	Niacina	80,0 mg.kg <sup>-1</sup>
Ferro	647,50 mg.kg <sup>-1</sup>	Ácido Pantotênico	15,0 mg.kg <sup>-1</sup>
Manganês	7,50 mg.kg <sup>-1</sup>	Piridoxina	9,0 mg.kg <sup>-1</sup>
Cobre	2,50 mg.kg <sup>-1</sup>	Riboflavina	6,0 mg.kg <sup>-1</sup>
Zinco	152,20 mg.kg <sup>-1</sup>	Tiamina	3,0 mg.kg <sup>-1</sup>
Boro	0,08 %		
Sódio	0,08 %		



<b>Propriedades</b>	
Carbono Orgânico Total	16,72 %
Relação C/N	4,90
pH	4,00
Condutividade elétrica	1,52 mS.cm <sup>-1</sup>
Densidade	1,15 g.cm <sup>-3</sup>

Os ensaios foram realizados em frasco de penicilina contendo 45 mL de meio de cultivo com pH ajustado a 6,5, utilizando NaOH 2M, devidamente lacrados, sob condições anaeróbias e posteriormente esterilizados. A cada frasco foi transferido 5 mL de meio RCM crescido a 37°C e 150 rpm por 24 horas. Foram realizados ensaios destrutivos em duplicata, ou seja, para cada ponto de amostragem foram preparados dois frascos distintos.

#### **4.3.2 Seleção da matéria-prima fonte de substrato**

Com a finalidade de avaliar a utilização de melado e melaço como fonte de sacarose para a produção de butanol, foram realizados experimentos em frasco de penicilina contendo 25 g.L<sup>-1</sup> de milhocina como única fonte de nutrientes. Os meios de cultivo foram preparados de modo a conter aproximadamente 10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose proveniente de cada uma das matérias-primas. Os ensaios foram realizados em frasco de penicilina contendo 45 mL de meio de cultivo com pH ajustado a 6,5, utilizando NaOH 2M, devidamente lacrados, sob condições anaeróbias e posteriormente esterilizados. A cada frasco foi transferido 5 mL de meio RCM crescido a 37°C e 150 rpm por 24 horas. Foram realizados ensaios destrutivos em triplicata.

De posse dos resultados, foi calculado a produção de butanol e a produtividade e, então, realizou-se análise de variância (ANOVA) utilizando a ferramenta de estatística do Excel.

Utilizou-se melado comercial da marca Guimarães Industria e Comércio Ltda e o melaço utilizado possui procedência desconhecida.

#### **4.3.3 Cinética do pré-inóculo**

Para os experimentos de cinética de pré-inóculo foram realizadas diferentes metodologias. A primeira metodologia (Metodologia 1) consistiu no preparo de frascos de soro de volume útil de 20 mL, contendo 19 mL de meio de cultivo RCM, devidamente lacrados e esterilizados. A cada frasco foi transferido 1 mL de meio RCM crescido a 37°C

e 150 rpm por 24 horas. O inóculo foi crescido no dia anterior ao início do experimento. Foram realizados ensaios destrutivos em triplicata.

Na segunda metodologia, foi realizado o experimento de cinética de pré inóculo de maneira não destrutiva. Para isso, adaptou-se um dispositivo de amostragem como ilustrado na Figura 10. Foram preparados três frasco de penicilina de volume útil de 100 mL, contendo 90 mL de meio de cultivo RCM, devidamente lacrados e esterilizados. A cada frasco foi adicionado 5 mL de meio RCM crescido a 37°C e 150 rpm por 24 horas. Essa conformação de experimento foi realizada com pré-inóculo fresco (Metodologia 2), ou seja, inoculado 24 horas antes do experimento e com pré-inóculo armazenado na geladeira que passou por período de reativação de 30 minutos em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C (Metodologia 3).

Figura 10. Foto ilustrando dispositivo de amostragem para fermentação em frasco de penicilina de volume útil de 100 mL



A fim de avaliar a influência que alguns parâmetros exercem sob a produção final de butanol, selecionou-se o pH, a concentração inicial de substrato e o estado do pré-inóculo para estudo. O meio de cultivo utilizado para esses experimentos foi milhocina 25g.L<sup>-1</sup>, como fonte de nutrientes, e melado como fonte de sacarose.

#### **4.4 Influência de parâmetros iniciais**

##### **4.4.1 Concentração inicial substrato**

Para estudar a influência da concentração inicial de substrato, preparou-se o meio de cultivo contendo diferentes concentrações em sacarose e 25 g.L<sup>-1</sup> de milhocina. As seguintes concentrações em sacarose, proveniente do melado, foram estudadas: 10 g.L<sup>-1</sup>, 18 g.L<sup>-1</sup>, 25 g.L<sup>-1</sup> e 75 g.L<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados em frasco de penicilina contendo 45 mL de meio de cultivo, com pH inicial ajustado em 6,5 utilizando NaOH 2M. Os frascos foram devidamente lacrados e esterilizados. A cada frasco foi transferido 5 mL

de meio RCM crescido a 37°C e 150 rpm por 24 horas. Foram realizados ensaios destrutivos em triplicata, ou seja, para cada ponto de amostragem foram preparados três frascos distintos. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C por 48 horas.

#### **4.4.2 pH**

Para estudar a influência do pH, preparou-se o meio de cultivo contendo 25 g.L<sup>-1</sup> de milhocina e 25 g.L<sup>-1</sup> em sacarose proveniente do melado. O pH foi ajustado, anteriormente a etapa de autoclavagem, nos valores de 5,6, 6,5, 7,3 e 8,5 utilizando solução de NaOH 2M. Os ensaios foram realizados em frasco de penicilina contendo 45 mL de meio de cultivo, devidamente lacrados e esterilizados. A cada frasco foi transferido 5 mL de meio RCM crescido a 37°C e 150 rpm por 24 horas. Foram realizados ensaios destrutivos em triplicata. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C por 48 horas.

#### **4.4.3 Idade do pré inóculo**

Para estudar a influência da idade do pré-inóculo na produção final de butanol buscou-se estabelecer a densidade óptica do momento em que o crescimento celular em meio de cultivo RCM se encontrava na fase de aceleração, na fase exponencial de crescimento, na fase de desaceleração e na fase estacionária de crescimento.

Com base nos resultados obtidos nas cinéticas de pré-inóculo, estabeleceu-se a utilização do pré-inóculo contendo densidade óptica de aproximadamente 1,2 (D1), 2,0 (D2), 3,0 (D3) e após 24 horas de incubação (D4). Os ensaios foram realizados com meio de cultivo contendo 25 g.L<sup>-1</sup> de milhocina, como fonte de nutrientes, e melado, como fonte de sacarose a 10 g.L<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados em frasco de penicilina contendo 45 mL de meio de cultivo com pH ajustado em 6,5, utilizando NaOH 2M. A cada frasco foi transferido 5 mL de meio RCM crescido nas condições supracitadas. Foram realizados ensaios destrutivos em triplicata. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C por 24 horas.

#### **4.5 Estudo da toxicidade aguda causada por concentração de produto**

Visando compreender a influência da concentração do produto na viabilidade celular, estudou-se diferentes concentrações iniciais de butanol no meio de cultivo contendo 10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose proveniente do melado e 25 g.L<sup>-1</sup> de milhocina, como fonte de nutriente. Foram preparados frascos de soro contendo 45 mL de meio de cultivo contendo as seguintes concentrações iniciais de butanol: 4,5 g.L<sup>-1</sup>, 5,5 g.L<sup>-1</sup>, 7 g.L<sup>-1</sup> e

9 g.L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado em 6,5, utilizando NaOH 2M e os frascos foram devidamente lacrados e esterilizados. Foram realizados ensaios destrutivos em triplicata. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C por 24 horas.

#### 4.6 Ensaios em biorreator

Após estabelecidos os parâmetros iniciais a serem utilizados na fermentação, foram realizados experimentos em biorreator Tecnal modelo Tec-Bio-1,5. Inicialmente, testou-se a utilização do meio de cultivo complexo de Patakova et al. (2011), cuja composição está descrita na Tabela 8, utilizando glicose (Ensaio 1) e sacarose de melado (Ensaio 2), em experimentos distintos, como substrato para fermentação. O meio de cultivo do Ensaio 1 foi utilizado como controle da situação fisiológica ótima da célula, visto que se tratou de um meio complexo rico em nutrientes e uma fonte de carbono facilmente fermentável. O processo foi conduzido em batelada simples sem controle de pH.

Tabela 8. Composição do meio de cultivo de Patakova et al. (2011)

Composição	Concentração
Extrato de levedura	2 g.L <sup>-1</sup>
Triptona	6 g.L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3 g.L <sup>-1</sup>
Acetato de amônio	3 g.L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g.L <sup>-1</sup>
pH	6,5

Utilizando o meio de cultivo contendo 25 g.L<sup>-1</sup> de milhocina como fonte de nutrientes e aproximadamente 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose proveniente do melado como substrato foram realizadas diferentes estratégias de condução do processo: batelada simples sem controle de pH (Ensaio 3), batelada simples com controle de pH em 5,0 (Ensaio 4) e 6,0 (Ensaio 5). Para o ajuste do pH foi preparada uma solução de NaOH 10% p/v.

A montagem do reator foi realizada sempre da mesma maneira. Foram preparados 450 mL de solução contendo os nutrientes e 250 mL de solução contendo o substrato e, essas soluções foram esterilizadas separadamente. O meio de cultivo foi, então, transferido de maneira asséptica para o vaso reacional e foi adicionado N<sub>2</sub> por 20 minutos no sistema. Finalmente, o pH foi ajustado para 6,5 antes da adição do inóculo. Para os experimentos em biorreator, foi utilizado 100 mL do pré-inóculo contendo células

crescidas em RCM a 150 rpm e 37°C, durante as 24 horas anteriores ao início do experimento. Dessa maneira, o volume reacional final foi de 800 mL.

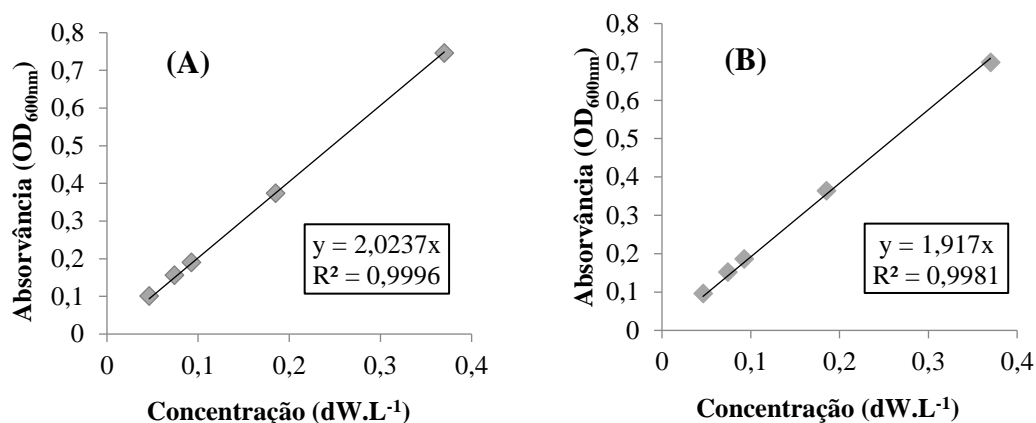
## 4.7 Métodos analíticos

### 4.7.1 Quantificação do crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado por meio da densidade óptica (O.D.) a 600 nm em espectrofotômetro modelos Bell SP 2000 UV e Shimadzu UV-1800. A concentração de células foi obtida utilizando fator de conversão para peso seco de célula por litro, a partir de elaboração da curva de calibração.

Para obter a curva de calibração de peso seco o conteúdo de dois frascos de soro foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e as células passaram por sucessivas lavagens com água destilada. Após lavadas, as células foram ressuspensas em solução 0,9 % (p/v) de NaCl. Essa suspensão foi diluída em 5 diferentes concentrações e suas respectivas absorvâncias foram medidas. Alíquotas de 15 mL dessa suspensão foram filtradas em membrana GS em éster de celulose de porosidade 0,22 µm e pesadas em balança de umidade modelo BEL i-THERMO 163L até peso constante. A massa de células foi calculada por gravimetria. A Figura 11 representa a curva obtida.

Figura 11. Curva de calibração de peso seco de célula por absorvância medida, para a bactéria *C. beijerinckii* NRRL B-598 em espectrofotômetro da marca (A) Shimadzu e (B) Bell



### 4.7.2 Análise quantitativa de substratos e produtos

As concentrações de substrato e produto presentes no meio de cultivo foram acompanhadas por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*, Shimadzu). Utilizou-se coluna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad Laboratories Ltd) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (Bio-Rad Laboratories Ltd), detector de índice de refração (Waters 2414), bomba

binária (Shimadzu), forno e módulo controlador de temperatura (Shimadzu) e *software* cromatográfico Breeze. A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM com vazão de 0,6mL/min, e a temperatura do forno mantida a 55 °C. As amostras foram filtradas em membrana (Shimadzu) com diâmetro de 0,22 µm e injetadas para a quantificação através do uso da curva padrão.

A metodologia analítica utilizada apresentou limitação na quantificação de acetona e ácido butírico, pois houve co-eluição desses dois produtos. Foi feita uma varredura de diferentes binômios vazão *versus* temperatura de operação a fim de identificar uma metodologia para quantificação desses dois metabólitos. No entanto, não foi possível obter uma boa resolução dos picos. Para fins de discussão de resultados, assumiu-se que os picos observados foram atribuídos à concentração de ácido butírico. Dessa forma, os resultados referentes a concentração de ácido butírico, no presente trabalho, estão superestimados.

#### **4.7.3 pH**

O pH foi quantificado utilizando pHmetro modelo Tecnal TEC-5, calibrado com tampões padrão 4,0 e 7,0 a temperatura ambiente (25 °C).

#### **4.7.4 Microscopia óptica de massa celular crescida**

Centrifugou-se 1 mL de meio de cultivo crescido por 10 minutos em centrífuga IKA mini G. O sobrenadante foi desprezado e a massa celular foi ressuspensa em água destilada. Uma gota de suspensão de células foi transferida para uma lâmina de microscópio e, posteriormente, espalhada. O material foi fixado com calor, utilizando chama.

Em seguida, foi realizado o método de coloração de Gram que consiste dos seguintes passos:

- Cobriu-se o material com gotas de solução de cristal violeta por 60 segundos e, em seguida, lavou-se com água destilada;
- Cobriu-se o material com gotas de solução de lugol por 60 segundos e, em seguida, lavou-se com água destilada;
- Inclinou-se a lâmina e gotejou-se solução de álcool:acetona (1:1) por 15 segundos e, rapidamente, lavou-se com água destilada;
- Cobriu-se o material com gotas de solução de fucsina por 30 segundos, e em seguida, lavou-se com água destilada, secando a lâmina com cuidado, em sequência.

Também foi realizado o método da coloração de Wirtz-Conklin, consiste dos seguintes passos:

- Cobriu-se o material seco com solução de corante verde malaquita e levou-se a aquecimento, sem que o corante entrasse em ebulição. Essa etapa foi repetida no mínimo 2 vezes;
- Lavou-se a lâmina com água destilada;
- Cobriu-se o material com solução de safranina por 60 segundos e, em seguida, lavou-se com água destilada.
- Secou-se a lâmina com cuidado para posterior visualização microscópica.

Utilizou-se o microscópio óptico modelo Eclipse E200 da marca NIKON e as fotos foram tiradas por uma câmera digital acoplada ao microscópio e ligada ao computador, por meio do *software* comercial Image-Pro 5.0 da *Media Cybernetics Inc.* Utilizou-se lente objetiva de imersão com aumento de 100x.

## 4.8 Cálculos

### 4.8.1 Parâmetros cinéticos

A partir dos dados de concentração de células, substratos e produtos foi possível calcular os parâmetros cinéticos em cada experimento. Foram calculados os rendimentos de substratos em células ( $Y_{X/S}$ ) e produtos ( $Y_{P/S}$ ), Equações 1 e 2 respectivamente, a produtividade volumétrica  $Q_P$  (Equação 3) e mássica  $Q'_P$  (Equação 4) e taxa específica de crescimento  $\mu$  (Equação 5). A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) foi calculada para a fase exponencial de crescimento.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (1)$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (2)$$

$$Q_P = \frac{\Delta P}{t} \quad (3)$$

$$Q'_P = \frac{\Delta P \times V}{t} \quad (4)$$

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t} \quad (5)$$

Todos os cálculos foram realizados com base volumétrica, ou seja, os valores de  $\Delta X$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta P$  correspondem a concentração em  $\text{g.L}^{-1}$  para um determinado intervalo de tempo.

### 4.8.2 Erro associado

Segundo Vuolo (1996), o desvio padrão calculado pela Equação 6 é a melhor estimativa experimental para o desvio padrão médio, considerando um conjunto determinado de medições, onde  $n$  é bem determinado e finito. A incerteza padrão é um parâmetro que indica quanto os resultados  $y_i$  se dispersam em relação ao valor médio  $\bar{y}$ , por causa de erros estatísticos. O desvio padrão é, portanto, a quantidade mais utilizada para caracterizar a dispersão de um conjunto de medições.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (6)$$

Quando uma grandeza é obtida a partir de outras grandezas experimentais, deve-se considerar as incertezas associadas a cada uma das grandezas para estimar a incerteza da grandeza calculada.

No caso de rendimentos e produtividades, os cálculos dependem dos valores obtidos de concentração de substrato, produto e biomassa, que possuem seus respectivos desvios. Utilizando o rendimento em produto para exemplificar (Equação 2), tem-se que a diferença entre as concentrações de produto nos tempos  $t=0$  e  $t$  (Equação 7) e a diferença entre as concentrações de substrato nos tempos  $t=0$  e  $t$  (Equação 8), já carregam uma incerteza associada calculada pela Equação 9 e 10. O rendimento é dado pelo quociente entre essas diferenças de concentração e sua incerteza pode ser calculada conforme a equação 11.

$$\Delta P = P_t - P_0 \quad (7)$$

$$\Delta S = -(S_t - S_0) \quad (8)$$

$$\sigma_{\Delta P} = \sqrt{(\sigma_{P_t})^2 + (\sigma_{P_0})^2} \quad (9)$$

$$\sigma_{\Delta S} = \sqrt{(\sigma_{S_t})^2 + (\sigma_{S_0})^2} \quad (10)$$

$$\frac{\sigma_{Y_{P/S}}}{\bar{Y}_{P/S}} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{\Delta P}}{\Delta P}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{\Delta S}}{\Delta S}\right)^2} \quad (11)$$

Os desvios padrão e propagação de incerteza foram calculados apenas para experimentos em triplicata, em que o grau de liberdade é maior que 1.



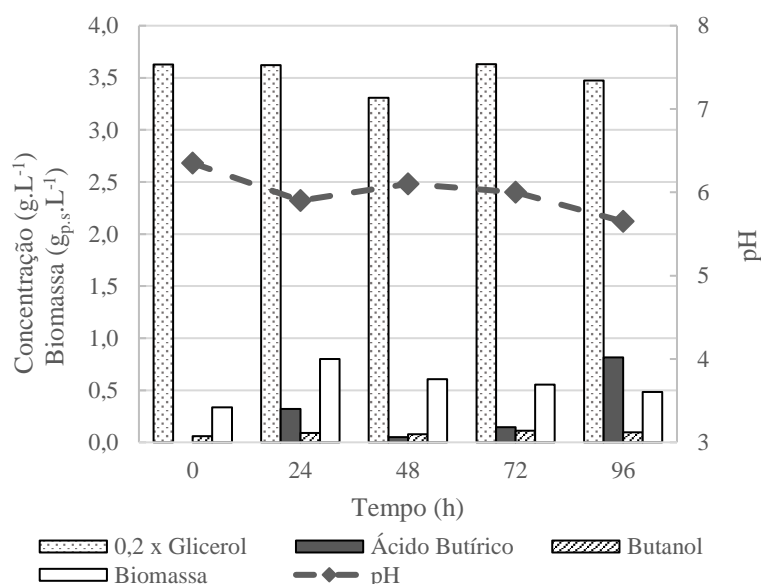
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção do microrganismo e do meio de cultivo

#### 5.1.1 *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 e Glicerol como substrato

Em sequência aos experimentos realizados por Ribeiro (2016), foi avaliada a utilização de 25 g.L<sup>-1</sup> de milhocina com 18 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e, também, a utilização de 25 g.L<sup>-1</sup> de milhocina com associação de substrato: 18 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 5 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Os resultados obtidos são observados na Figura 12 e na Figura 13. A concentração de glicerol apresentada nos gráficos corresponde à quinta parte da concentração real, para permitir a melhor visualização de escala.

Figura 12. Concentração de glicerol, ácido butírico, butanol, biomassa e valor de pH no ensaio glicerol em meio simples, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598

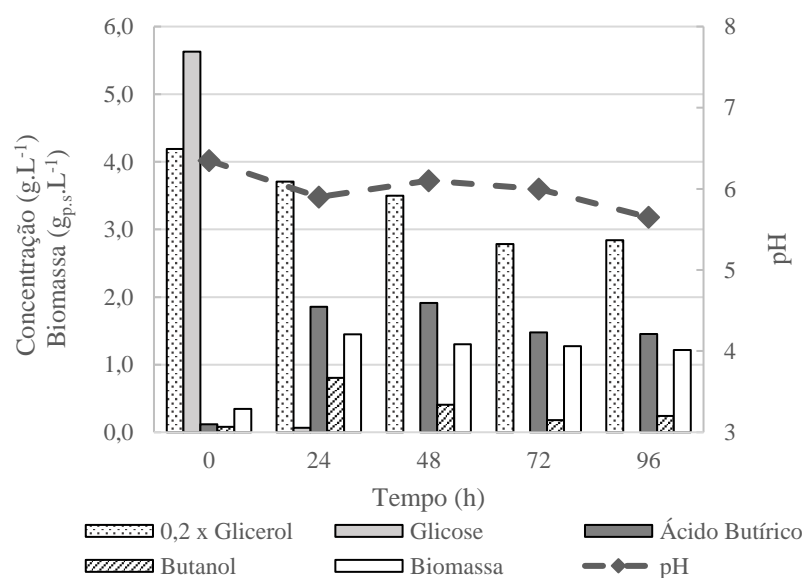


Na Figura 12 é possível observar que o glicerol não foi consumido durante as 96 horas de fermentação. No entanto, houve crescimento celular nas primeiras 24 horas de fermentação (0,80 g<sub>p.s.</sub>.L<sup>-1</sup>), seguida de diminuição na concentração de biomassa. Esse crescimento pode estar relacionado ao consumo de nutrientes presentes na milhocina que permitiram o anabolismo celular. A produção de butanol não foi significativa, porém houve produção pouco significativa de ácido butírico após 72 horas de fermentação. A concentração de ácido butírico observada em 96 horas foi de 0,81 g.L<sup>-1</sup> e sua produção pode estar relacionada com o fato de sua via metabólica permitir a formação de ATP,

necessária para manutenção da biomassa celular. O pH variou muito pouco e, a sua redução está relacionada a produção de ácido butírico.

Na Figura 13 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** é possível observar que a glicose foi completamente consumida durante as primeiras 24 horas de fermentação. Nesse período, foram observados concentrações de 1,86 g.L<sup>-1</sup> de ácido butírico, 1,45 g<sub>p.s.</sub>.L<sup>-1</sup> de biomassa e 0,80 g.L<sup>-1</sup> de butanol. A produtividade máxima em butanol foi de 0,03 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> em 24 horas de fermentação. Tanto a concentração celular, como a concentração de butanol e ácido butírico observadas foram maiores do que as concentrações obtidas no experimento anterior e, portanto, estão associadas a metabolização da glicose. É possível observar que houve uma diminuição do glicerol durante todo o período de fermentação, cerca de 6 g.L<sup>-1</sup>. No entanto, após 24 horas não houve produção de butanol, ácido butírico, 1,3-propanodiol ou biomassa, mostrando que possivelmente a diminuição de glicerol no meio extracelular não está relacionada à metabolização do glicerol pela célula.

Figura 13. Concentração de glicerol, glicose, ácido butírico, butanol, biomassa e valor de pH no ensaio contendo glicerol e glicose em meio complexo, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598



Patakova et al. (2011) reportaram que a estirpe *C. beijerinckii* NRRL B-598, antes *C. pasteurianum* NRRL B-598, não é capaz de utilizar glicerol como fonte de carbono. Sedlar et al. (2017), inclusive, menciona essa especificidade para suportar sua proposta de reclassificação dessa cepa.

O microrganismo modelo para fermentação ABE de glicerol é a cepa *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. As enzimas envolvidas diretamente no metabolismo do

glicerol são: dihidroxiacetona quinase (DHAK) e glicerol desidrogenase (GDH), na via oxidativa e glicerol desidratase (GHDt) e 1,3-PDO desidrogenase (PDDH), na via redutora. Ao comparar as duas cepas de *C. beijerinckii* NRRL B-598 e *C. pasteurianum* ATCC 6013 de acordo com sequência de RNA ribossomal 16S, sequência normalmente conservada dentro de uma mesma espécie de bactérias e archaeas, a identidade obtida foi de 92%. No entanto, ao comparar o genoma completo das duas cepas, foi obtido 79% de identidade. Foi realizada, portanto, uma busca no genoma da *C. beijerinckii* NRRL B 598 pelas quatro enzimas envolvidas no metabolismo de glicerol, já caracterizadas para *C. pasteurianum* ATCC 6013. O objetivo foi verificar se a cepa NRRL B 598 possui o maquinário enzimático necessário ao metabolismo do glicerol. Foi utilizado o programa NCBI BLASTp e concluiu-se que a enzima glicerol desidratase, responsável por converter glicerol em 3HPA e composta por 3 subunidades, não é codificada pelo genoma da *C. beijerinckii* NRRL B-598. Ao bloquear a via redutora, pela falta dessa enzima chave, o NADH produzido pela via oxidativa deixa de ser reciclado causando desbalanço redox na célula e indicando o motivo pelo qual a cepa NRRL B-598 não é capaz de metabolizar o glicerol.

Entretanto, as enzimas envolvidas na via oxidativa da cepa ATCC 6013 (DHAK e GDH) apresentam considerável identidade com enzimas da cepa NRRL B 598. Dessa maneira, é possível imaginar que uma pequena parte do glicerol segue por essa via até que o desbalanço redox se torne crítico a viabilidade celular.

Outra hipótese para explicar a diminuição da concentração de glicerol no meio de cultivo seria a internalização do glicerol para efeito de soluto compatível (DABROCK et al., 2016). Visto que o meio extracelular apresentou aumento na concentração de butanol, que por sua vez, tem potencial tóxico para célula causando desequilíbrio na membrana celular. A assimilação de glicerol como soluto compatível poderia restabelecer o equilíbrio do microrganismo, auxiliando a manutenção da viabilidade celular. Patakova et al. (2018) citaram que a bactéria *C. acetobutylicum* ATCC 824 tende a acumular glicerol no meio intracelular durante a fase de produção de butanol. Esse acúmulo pode ser explicado pela necessidade de manter o balanço osmótico e redox da célula, corroborando com a hipótese aqui discutida.

No entanto, a quantidade de glicerol que sai do meio extracelular é consideravelmente grande para ser internada apenas como soluto compatível. Dessa forma, também se considera a hipótese de que o glicerol pode estar sendo direcionado para outras vias metabólicas que não a de produção de ácidos e solventes. Um exemplo

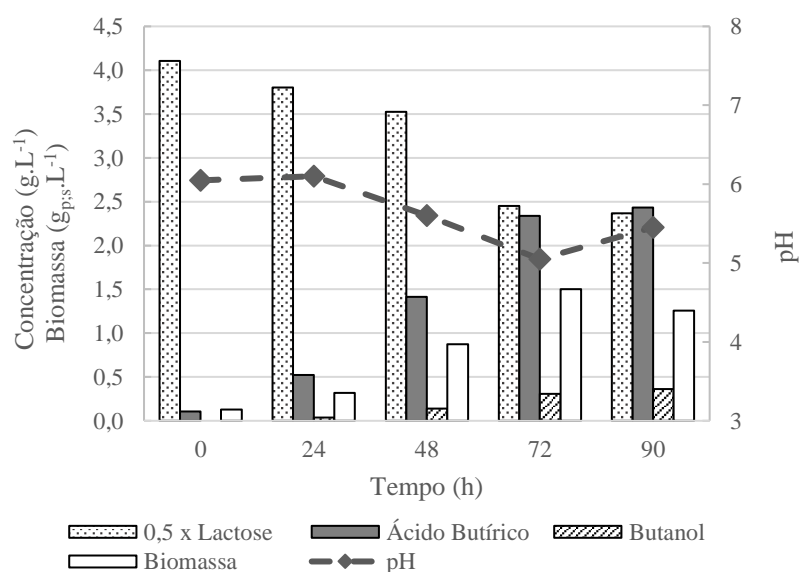
seria a utilização do glicerol na via de síntese de fosfolipídios de membrana, necessários para que manutenção da biomassa celular.

### 5.1.2 *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 e Lactose como substrato

Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 14 e 15. A concentração de lactose apresentada corresponde à metade da concentração real, para permitir a melhor visualização na escala do gráfico.

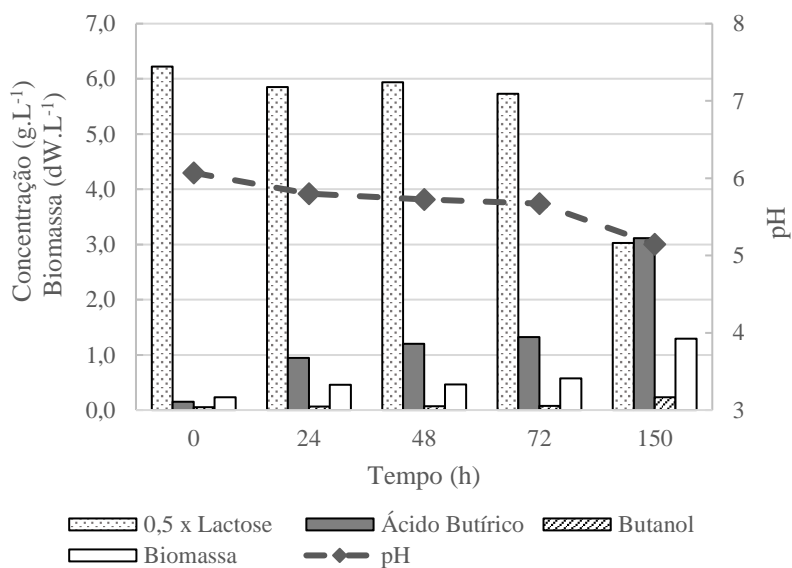
Na Figura 14 é possível observar que mesmo em 90 horas de fermentação a lactose não foi completamente consumida. O consumo total de substrato observado foi de  $3,47 \text{ g.L}^{-1}$ , mostrando que a utilização de lactose como fonte de carbono não é favorecida na condição estudada. A biomassa celular chegou a  $1,50 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$  em 72 horas e a houve produção significativa de ácido butírico ( $2,43 \text{ g.L}^{-1}$ ). A concentração de butanol ao final da fermentação foi  $0,36 \text{ g.L}^{-1}$  e, portanto, essa condição apresentou baixa produtividade em butanol, não sendo uma alternativa interessante para aplicação industrial.

Figura 14. Concentração de lactose, ácido butírico, butanol e biomassa e valores de pH no ensaio contendo lactose P.A. em meio complexo, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598



Na Figura 15 também é observado o consumo parcial da lactose, mesmo em 150 horas de fermentação. O consumo total de substrato foi  $6,39 \text{ g.L}^{-1}$  e a produção total de butanol foi  $0,23 \text{ g.L}^{-1}$ . O crescimento celular foi levemente menor do que o observado utilizando meio complexo,  $1,29 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$ . Por outro lado, a produção de ácido butírico observada foi maior do que no experimento anterior, de  $3,11 \text{ g.L}^{-1}$ .

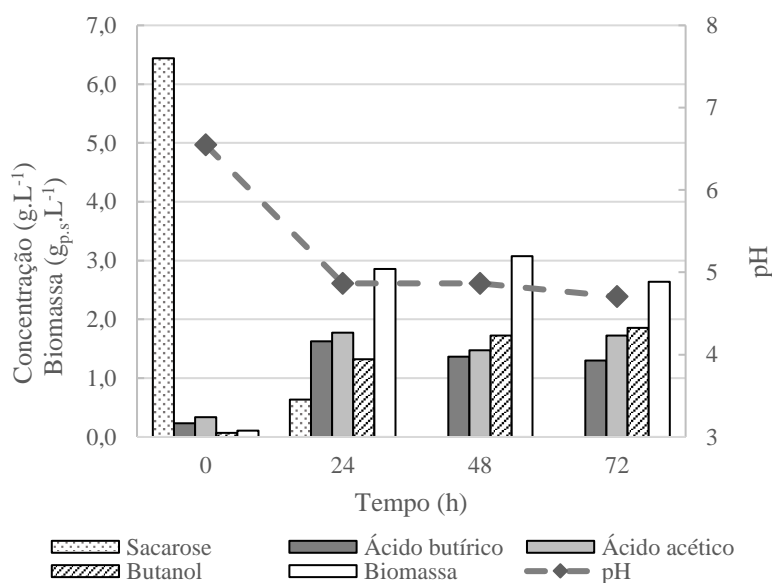
Figura 15. Concentração de lactose, ácido butírico, butanol e biomassa e valores de pH no ensaio contendo lactose P.A. em meio simples, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598



### 5.1.3 *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 e Sacarose como substrato

A Figura 16 mostra os produtos, substratos e pH do ensaio contendo aproximadamente 6,0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose em meio de cultivo como descrito na Tabela 6.

Figura 16. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol e biomassa e valores de pH no ensaio contendo sacarose P.A. em meio complexo, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598

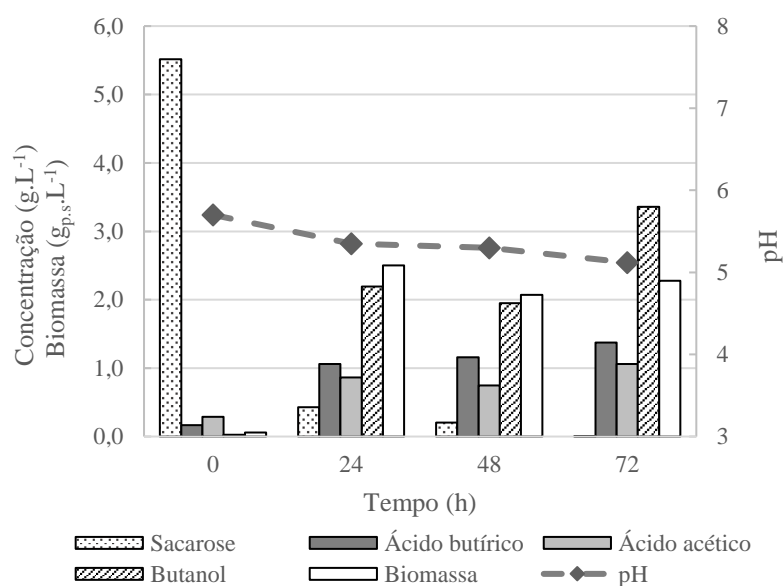


É possível observar que em 48 horas de fermentação a sacarose foi completamente consumida, momento no qual a biomassa apresentou 3,08 g<sub>p.s.</sub>.L<sup>-1</sup> de concentração. Em 24 horas de fermentação, os ácidos butírico e acético apresentaram concentrações de 1,63

e  $1,77 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. A queda de pH coincidiu com a produção de ácidos e foi mais acentuada em 24 horas, onde apresentou valor de 4,9. O butanol foi continuamente produzido e atingiu a concentração de  $1,86 \text{ g.L}^{-1}$  em 72 horas de fermentação.

Na Figura 17 é possível observar que a sacarose só foi completamente consumida em 72 horas de fermentação, levando mais tempo quando comparado ao experimento anterior. No entanto, a taxa de consumo de substrato foi maior nas primeiras 24 horas e, por consequência, o crescimento celular foi mais acentuado nesse período, atingindo uma concentração de  $2,50 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$ , menor que obtida no experimento anterior. Em 72 horas as concentrações de ácido butírico e acético foram  $1,37$  e  $1,06 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Em contrapartida, a queda de pH não foi acentuada como visto na Figura 16, uma vez que o pH inicial foi menor neste ensaio. No entanto, ambos experimentos tiveram seu respectivo pH ajustado a 6,5 anteriormente a autoclavagem. Essa diferença no pH inicial pode ser atribuída a complexidade da milhocina que, pode apresentar alto teor de ácido lático em sua composição.

Figura 17. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol e biomassa e valores de pH no ensaio contendo sacarose P.A. em meio simples, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598



A produção de butanol foi de  $3,36 \text{ g.L}^{-1}$ , 80% maior do que a produção de butanol observada no ensaio utilizando meio de cultivo complexo. Com base nesses resultados, é possível inferir que o meio contendo milhocina e sacarose favoreceu a produção de butanol em detrimento da produção dos ácidos orgânicos. Além disso, a maior produção de ácidos orgânicos fornece mais ATP e permite a maior duplicação celular, o que está de acordo com os resultados obtidos.

### 5.1.4 Parâmetros cinéticos para *C. beijerinckii* NRRL B-598

A Tabela 9 mostra os parâmetros cinéticos calculados nos ensaios utilizando sacarose ou lactose como fonte de carbono, nos dois diferentes meios de cultivo. Os parâmetros rendimento de substrato em butanol ( $Y_{P/S}$ ), rendimento de substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e produtividade de butanol ( $Q_P$ ) foram calculados para o tempo total de cada fermentação. Já  $Q_{Pmáx}$  foi a produtividade máxima observada no tempo  $t$ .

Tabela 9. Comparação de parâmetros cinéticos calculados dos experimentos

		$Y_{P/S}^*$	$Y_{X/S}^{**}$	$Q_P^{***}$	$Q_{Pmáx}^{***}$	$t$ (h)
Sacarose	Meio complexo	0,277	0,393	0,025	0,052	24
	Milhocina	0,603	0,403	0,046	0,089	24
Lactose	Meio complexo	0,105	0,324	0,004	0,004	72
	Milhocina	0,028	0,166	0,001	0,001	150

\*  $g_{butanol}/g_{substrato}$

\*\*  $g_{biomassa}/g_{substrato}$

\*\*\*  $g_{butanol}.L^{-1}.h^{-1}$

Observou-se que os rendimentos tanto em produto quanto em biomassa foram maiores quando sacarose foi utilizada como substrato. A maior produtividade máxima foi  $0,089 g.L^{-1}.h^{-1}$ , e ocorreu quando se utilizou sacarose e milhocina como únicas fontes de nutrientes. Ribeiro (2016) observou produtividade máxima em butanol de  $0,11 g.L^{-1}.h^{-1}$  utilizando a mesma cepa *C. pasteurianum* NRRL B-598 com meio de cultivo contendo  $10 g.L^{-1}$  de glicose e  $20 g.L^{-1}$  de milhocina.

Os experimentos utilizando lactose como fonte de carbono apresentaram baixa produtividade em butanol, tornando não viável a utilização desse substrato. Uma alternativa ao uso de lactose P.A. seria utilização de soro de leite, coproduto do processo de produção de queijos, que é um insumo rico em lactose.

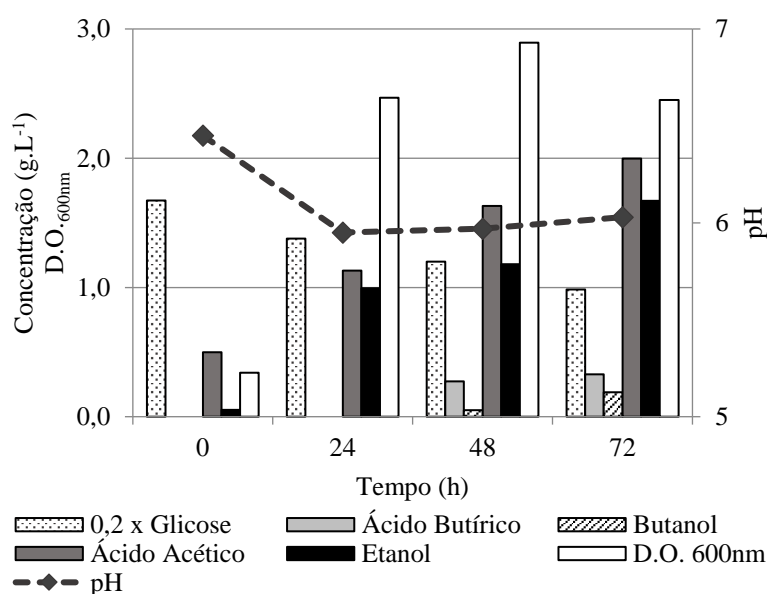
Qureshi e Maddox (2005) realizaram uma fermentação em batelada simples com *C. acetobutylicum* contendo  $48,4 g.L^{-1}$  de lactose inicial proveniente de soro de leite. Ao final de 96 horas foi produzido  $5,56 g.L^{-1}$  de butanol, resultando em uma produtividade de  $0,06 g.L^{-1}.h^{-1}$  e concentração residual de lactose de cerca de  $20 g.L^{-1}$ . Esses resultados mostram que a utilização de lactose como substrato para espécies de *Clostridium* não geneticamente modificadas produzem baixa concentração de butanol e baixa produtividade, corroborando com os resultados obtidos nesses experimentos.

### 5.1.5 *C. pasteurianum* ATCC 6013 e Glicose como substrato

Após adquirida a cepa *C. pasteurianum* ATCC 6013, foram realizados experimentos para avaliar a utilização de glicose, glicerol, lactose e sacarose como fonte de carbono.

Na Figura 18 é possível observar os resultados obtidos no experimento em que utilizou-se 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e meio de cultivo com composição descrita na Tabela 6. A concentração de glicose apresentada no gráfico corresponde à quinta parte da concentração real, para permitir a melhor visualização na escala. Além disso, os resultados de biomassa estão expressos em termos de densidade óptica a 600 nm, pois não foi realizada uma curva de calibração de peso seco de célula.

Figura 18. Concentração de glicose, ácido butírico, butanol, ácido acético, etanol, valor de pH e DO<sub>600nm</sub> no ensaio contendo glicose em meio complexo, utilizando *C. pasteurianum* ATCC 6013



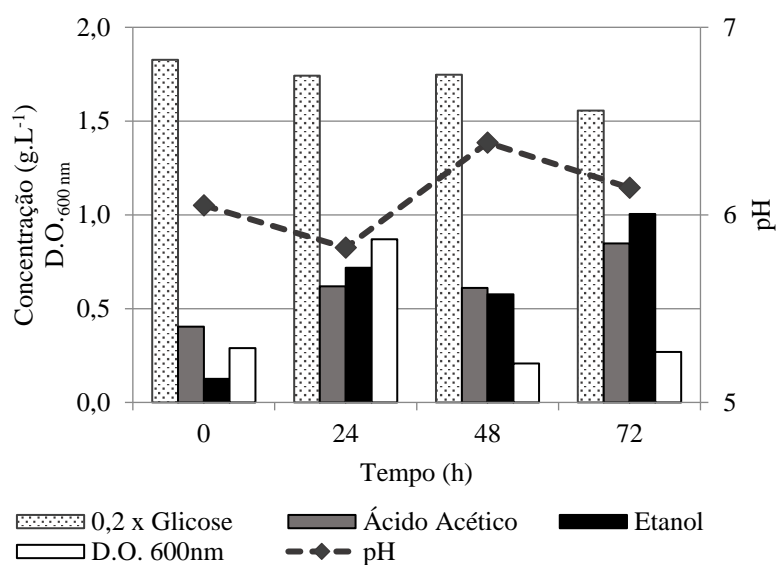
A glicose inicialmente presente no meio de cultivo foi parcialmente consumida em 72 horas. O consumo total correspondeu a 3,44 g.L<sup>-1</sup>, restando cerca de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de glicose no meio de cultivo. Além disso, a concentração celular apresentou seu maior valor de densidade óptica em 48 horas de fermentação. Foram produzidos majoritariamente ácido acético e etanol, atingindo em 72 horas a concentração de 2,00 e 1,67 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. No mesmo tempo, a produção de ácido butírico e butanol foi menos relevante, chegando à concentração de 0,33 e 0,19 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Na Figura 19 é possível observar os resultados relativos ao ensaio contendo 25 g.L<sup>-1</sup> de milhocina como única fonte de nutrientes. Nessas condições o consumo total



de glicose foi de  $1,36 \text{ g.L}^{-1}$  em 72 horas de fermentação. Adicionalmente ao baixo consumo de substrato foi produzida menor concentração de ácido acético e etanol, atingindo  $0,85$  e  $1,00 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, ao final de 72 horas. Não foi observada produção de ácido butírico ou butanol. O crescimento celular nesse ensaio foi menor quando comparado ao ensaio anterior e, apresentou valor máximo de densidade óptica de  $0,87$  em 24 horas de fermentação. Esse crescimento celular pode ser correlacionado ao carregamento de nutrientes do meio de cultivo do pré-inóculo de composição descrita na Tabela 5.

Figura 19. Concentração de glicose, ácido acético, etanol, valor de pH e  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  para ensaio contendo glicose em meio simples, utilizando *C. pasteurianum* ATCC 6013

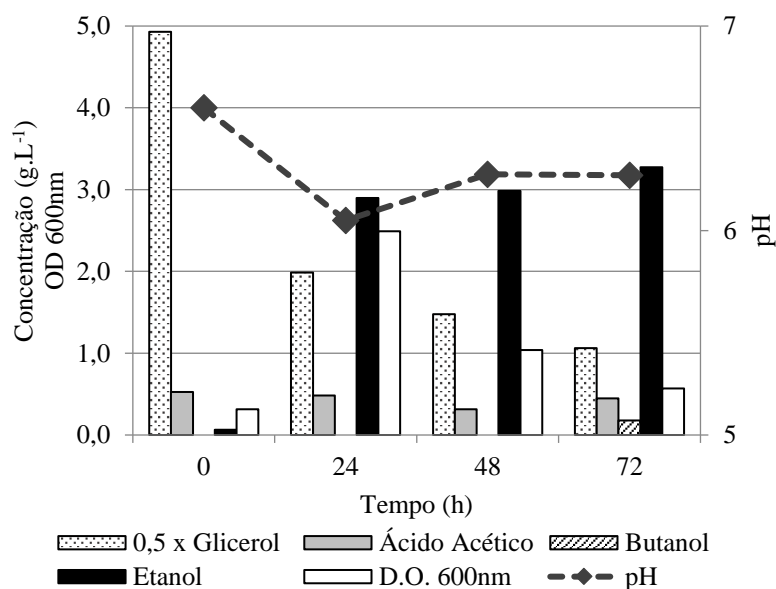


### 5.1.6 *C. pasteurianum* ATCC 6013 e Glicerol como substrato

Nas Figuras 20 e 21 observam-se os dados relativos aos ensaios em que foi utilizado glicerol como substrato. A concentração de glicerol apresentada nos gráficos corresponde à metade da concentração real, para permitir a melhor resolução de escala.

Analisando a Figura 20, em 72 horas de fermentação foi observado uma concentração residual de glicerol de  $2,12 \text{ g.L}^{-1}$ . O consumo total de glicerol foi de  $7,74 \text{ g.L}^{-1}$ . Não foi observada produção significativa de ácido butírico, butanol ou 1,3-propanodiol. A produção de etanol foi maior que a produção de ácido acético, chegando ao final das 72 horas em  $3,27 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol e  $0,45 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido acético. Com a menor produção do ácido orgânico, notou-se que o pH não chegou a atingir valores abaixo de  $6,0$  como visto nos experimentos anteriores.

Figura 20. Concentração de glicerol, ácido acético, etanol, valor de pH e  $DO_{600\text{ nm}}$  para ensaio glicerol em meio complexo, utilizando *C. pasteurianum* ATCC 6013

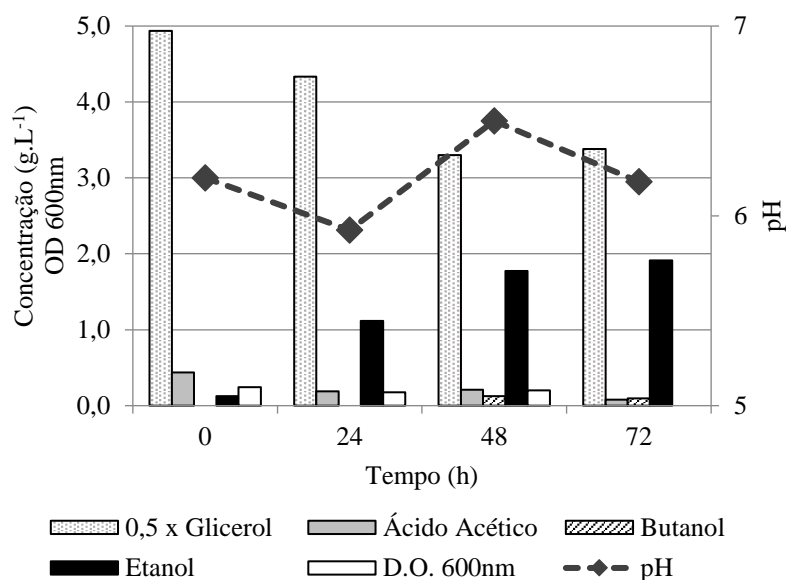


O crescimento celular teve seu maior valor de densidade óptica (2,50) em 24 horas. Comparando com o crescimento celular observado no ensaio contendo glicose no mesmo meio de cultivo, o crescimento celular em glicerol foi menor. Em contrapartida, a produção de etanol nesse experimento foi quase o dobro da observada no ensaio mencionado. Dessa forma, é possível inferir que a utilização de glicerol como substrato regula o fluxo metabólico de modo a priorizar a produção de etanol, enquanto na utilização de glicose como substrato, a via de geração de biomassa é preferida.

Na Figura 21 observa-se que o consumo de glicerol foi menor que no ensaio anterior, correspondendo à 3,11 g.L<sup>-1</sup> ao final das 72 horas de fermentação. Não foi observado crescimento celular e a densidade óptica se manteve constante durante 48 horas, seguida de morte celular em 72 horas de incubação.

No entanto, foi observada a produção de 1,91 g.L<sup>-1</sup> etanol, corroborando com a hipótese de que a utilização de glicerol regula o fluxo metabólico para produção de etanol e não para geração de biomassa. Todavia, a utilização de milhocina como única fonte de nutrientes para a cepa *C. pasteurianum* ATCC 6013 se mostrou menos eficiente em termos de geração de biomassa e produtos. Isso pode ser devido ao fato da milhocina, por ser uma matéria-prima bastante complexa, possuir compostos que sejam inibitórios ao maquinário enzimático.

Figura 21. Concentração de glicerol, ácido acético, etanol, valor de pH e  $DO_{600\text{nm}}$  para ensaio contendo glicerol em meio simples, utilizando *C. pasteurianum* ATCC 6013

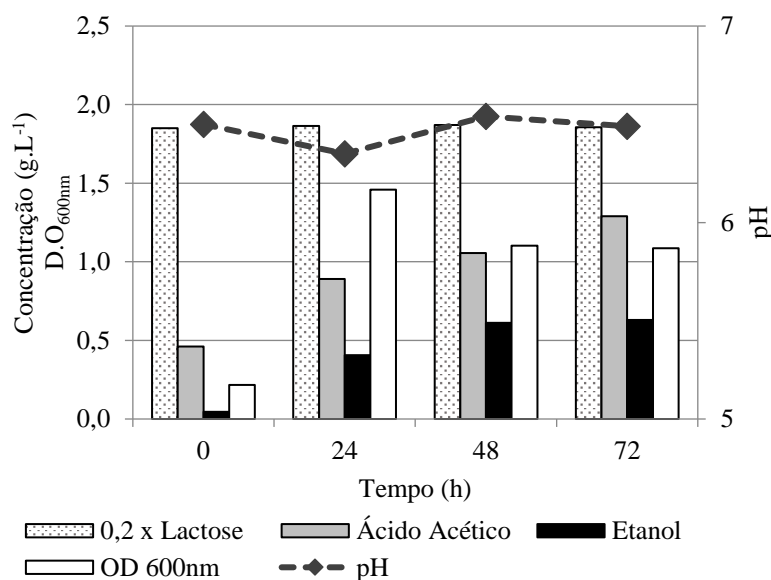


Primeiramente reportado por Dabrock et al. (1992), seguido de Biebl (2001), a cepa *C. pasteurianum* é vastamente descrita como produtora de butanol e 1,3-propanodiol a partir de glicerol. Krasnan et al. (2018) atingiu concentração de  $12,28 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol pela fermentação de glicerol P.A com *C. pasteurianum* DSM 525 em batelada simples com células em suspensão por 23 horas. A produtividade observada pelos autores foi de  $0,56 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

### 5.1.7 *C. pasteurianum* ATCC 6013 e Lactose como substrato

A Figura 22 mostra os resultados dos ensaios contendo lactose como substrato em meio de cultivo conforme descrito pela Tabela 6. A concentração de lactose apresentada nos gráficos corresponde à quinta parte da concentração real, para permitir a melhor resolução de escala.

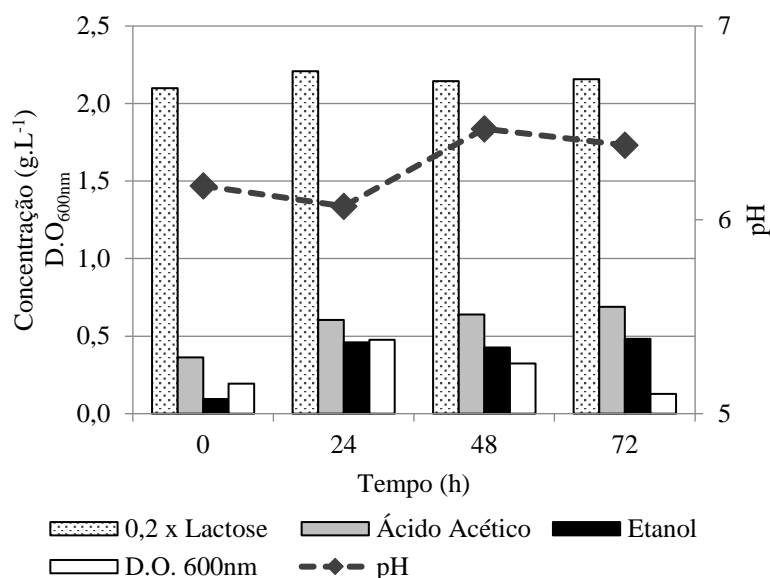
Figura 22. Concentração de lactose, ácido acético, etanol, valor de pH e  $DO_{600\text{ nm}}$  para ensaio contendo lactose P.A. em meio complexo, utilizando *C. pasteurianum* ATCC 6013



É possível observar que a lactose não foi consumida durante todo o período da fermentação. No entanto, foi verificado crescimento celular, produção de ácido acético e etanol. Nesse ensaio não houve produção de ácido butírico ou butanol. A biomassa celular apresentou maior valor de densidade óptica de 1,46 em 24 horas, seguida por morte celular, embora não tenha ocorrido consumo de substrato. Esse crescimento pode estar relacionado com o carregamento de nutrientes residuais do meio de cultivo do pré-inóculo. As concentrações finais de ácido acético e etanol foram 1,29 e 0,63 g.L<sup>-1</sup>.

Na Figura 23 também se observa que a lactose não foi consumida pela bactéria. No entanto, houve baixo crescimento celular e produção de ácido acético e etanol. A densidade óptica atingiu valor de 0,48 em 24 horas de fermentação, enquanto as concentrações de ácido acético e etanol foram 0,68 e 0,48 g.L<sup>-1</sup> ao fim das 72 horas de fermentação. As concentrações obtidas nesse ensaio foram menores que as obtidas no ensaio utilizando meio de cultivo adaptado de Yadav et al. (2014), o que corrobora com a hipótese de que a milhocina pode possuir efeito inibitório para o desenvolvimento celular.

Figura 23. Concentração de lactose, ácido acético, etanol, valor de pH e  $DO_{600\text{ nm}}$  para ensaio contendo lactose P.A. em meio simples, utilizando *C. pasteurianum* ATCC 6013



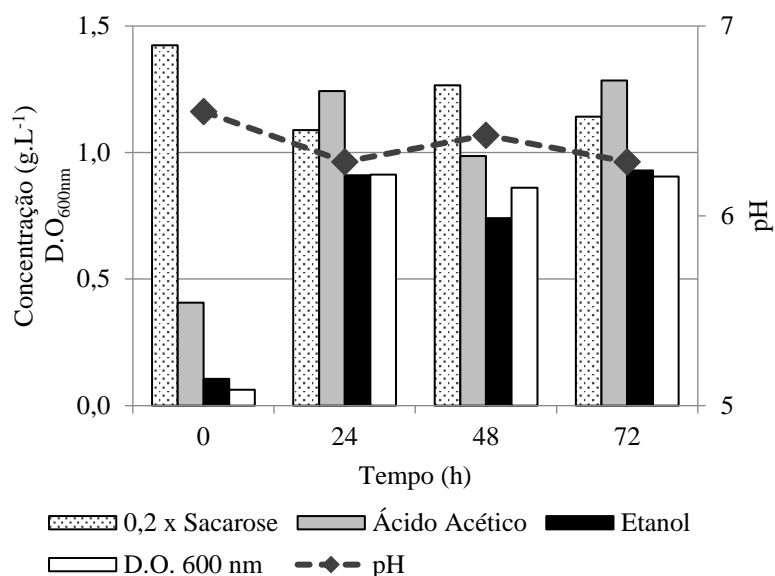
De posse dos resultados dos dois ensaios anteriores, conclui-se que a lactose não é um substrato metabolizado pela cepa *C. pasteurianum* ATCC 6013 e, portanto, não é elegível para produção de butanol utilizando essa cepa.

#### 5.1.8 *C. pasteurianum* ATCC 6013 e Sacarose como substrato

As Figuras 24 e 25 mostram os resultados dos experimentos contendo sacarose como substrato. As concentrações de sacarose apresentadas nos gráficos correspondem à quinta parte da concentração real, para permitir a melhor resolução de escala. Quando utilizado meio de cultivo conforme composição descrito na Tabela 6 foi possível observar produção de ácido acético, etanol e crescimento celular. Em contrapartida, não foi observada produção de butanol e ácido butírico.

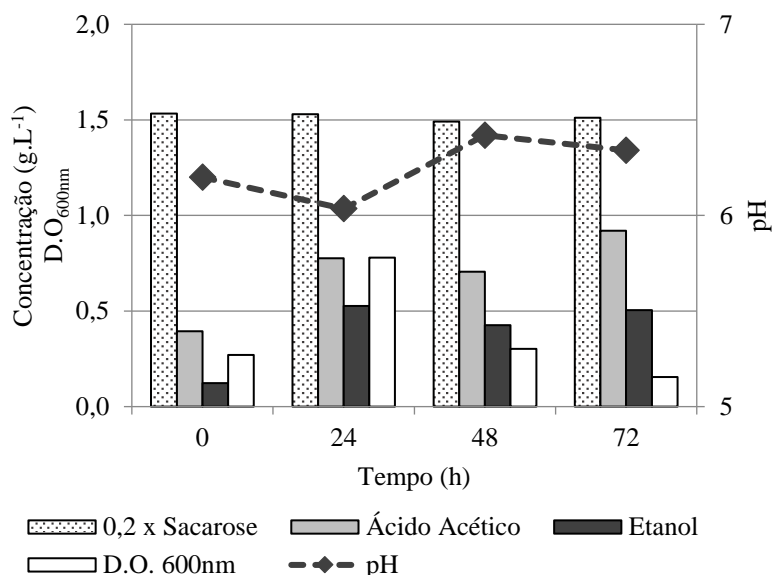
Foi consumido um total de 1,41 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, cerca de 5,78 g.L<sup>-1</sup> de sacarose residual ao final da fermentação. A taxa de crescimento celular foi maior em 24 horas e, o valor de densidade óptica observada foi de 0,91, que se manteve constante nos tempos seguintes. Em 72 horas, a concentração de ácido acético e etanol foi 1,28 e 0,93 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Figura 24. Concentração de sacarose, ácido acético, etanol, valor de pH e  $DO_{600\text{ nm}}$  para ensaio contendo sacarose P.A. em meio complexo, utilizando *C. pasteurianum* ATCC 6013



Na Figura 25, observou-se que não houve consumo de sacarose. No entanto, houve aumento da biomassa celular em 24 horas de fermentação, que atingiu uma densidade óptica de 0,78 seguida de decréscimo. Foi produzido 0,93 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético e 0,52 g.L<sup>-1</sup> de etanol, em 72 horas de fermentação.

Figura 25. Concentração de sacarose, ácido acético, etanol, valor de pH e  $DO_{600\text{ nm}}$  para ensaio contendo sacarose P.A. em meio simples, utilizando *C. pasteurianum* ATCC 6013



Os resultados obtidos neste trabalho diferem da literatura, uma vez que não há trabalhos que citem maior produção de etanol em detrimento ao butanol pela cepa *C. pasteurianum* ATCC 6013. Além disso, nos experimentos realizados utilizando glicerol como substrato não foi observada a produção de 1,3-propanodiol. Esses resultados

levantaram a hipótese de a cepa adquirida do banco de células não ser de fato a cepa desejada. Dessa maneira, foi enviada amostra celular para sequenciamento no Laboratório BPI Biotecnologia. O laudo da análise mostrou que por alinhamento através da ferramenta Blast com base no banco de dados GenBank, a cepa em questão possui maior identidade com a espécie *Clostridium sporogenes*.

Kaushal et al. (2017) testou a utilização de diferentes substratos e fontes de nitrogênio na produção de álcoois orgânicos por *Clostridium sporogenes* NCIM 2918. Os autores observaram que o perfil de produção de álcoois utilizando glicerol foi diferenciado. A cepa produziu cerca de  $6,0 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol e  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol utilizando apenas glicerol como substrato enquanto no ensaio utilizando glicose foi produzido aproximadamente  $3,8 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol e  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol. Os autores levantaram a hipótese de o uso de glicerol como fonte de carbono causar supregulação das enzimas envolvidas especificamente na via de síntese do etanol.

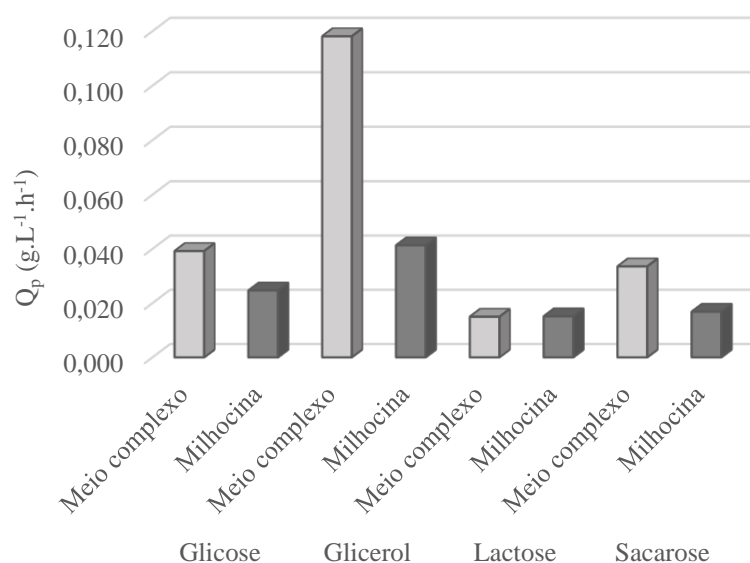
Os resultados observados por Kaushal et al. (2017) podem indicar que a cepa utilizada no presente estudo é da espécie *C. sporogenes* ou espécie de metabolismo similar.

#### **5.1.9 Parâmetros cinéticos para *C. pasteurianum* ATTC 6013**

A Figura 26 mostra as produtividades máximas em etanol, calculadas em cada um dos experimentos discutidos anteriormente. As produtividades alcançaram valor máximo em 24 horas de fermentação, independente do substrato ou do meio de cultivo utilizado. A concentração de butanol produzida nos ensaios foi muito baixa ou nula. Por isso, a comparação das produtividades foi feita em relação ao etanol.

É possível observar que, de modo geral, o meio de cultivo adaptado de Yadav et al. (2014) permitiu maior produção de etanol em todos os substratos estudados. Os dados obtidos no ensaio contendo lactose como substrato mostram a menor produtividade em etanol tanto em meio de cultivo contendo apenas milhocina como em meio de cultivo complexo. O glicerol foi o substrato que apresentou maior produtividade em etanol, alcançando uma produtividade máxima de  $0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 24 horas de fermentação em meio complexo. Em meio contendo apenas milhocina, a produtividade foi de  $0,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  de etanol, sendo a segunda maior produtividade observada nos experimentos realizados.

Figura 26. Produtividade máxima em etanol para experimentos utilizando *C. pasteurianum* ATCC 6013 em diferentes composições de meio de cultivo



No estado da arte, a produção de etanol por bactéria do gênero *Clostridium* é comumente baseada na fermentação de gás de síntese por *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei* ou *C. carboxidivorans*. Acharya et al. (2019) estudaram a produção de etanol por *C. ljungdahlii* a partir de gás de síntese e obtiveram concentração máxima de 3,75 g.L<sup>-1</sup>. Embora a produtividade não tenha sido determinada no estudo mencionado, a dificuldade da fermentação de substrato gasoso e o tempo necessário para etapa de crescimento celular e produção tornam a fermentação de substrato líquido mais vantajosa. Dessa forma, a utilização de glicerol para a produção de bioetanol por espécies de *Clostridium*, pode se tornar uma possibilidade para o desenvolvimento de novas tecnologias.

## 5.2 Cinética do pré-inóculo

A partir dos resultados obtidos na etapa de seleção do microrganismo, decidiu-se seguir os experimentos utilizando a cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598. Para entender melhor o comportamento do crescimento celular e o perfil de produção dos metabólitos em meio de cultivo *RCM* (conforme descrito na Tabela 5) foram realizadas diferentes cinéticas, cujas metodologias já foram descritas.

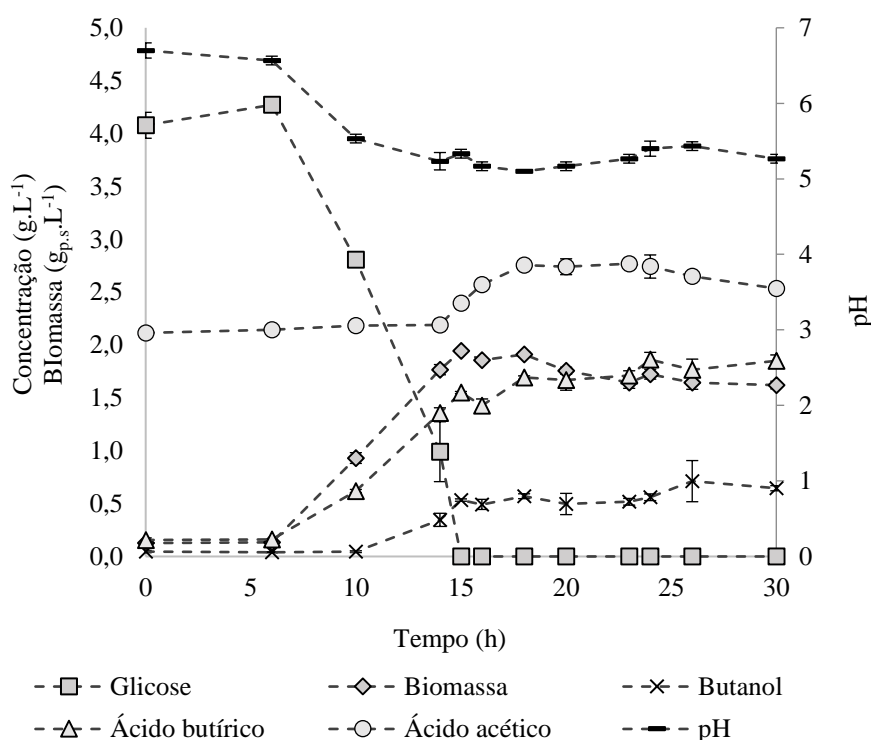
A Figura 27 mostra os resultados obtidos na Metodologia 1 durante 30 horas de incubação. É possível observar que a célula inicia a fase exponencial de crescimento entre 5 e 10 horas de incubação. Em 15 horas de experimento, a glicose é completamente consumida e a biomassa celular atinge sua concentração máxima. Já o pH apresenta queda de 6,8 para 5,3 e, permanece relativamente constante até o fim das 30 horas de incubação. A concentração máxima de célula obtida foi de 1,94 g<sub>p.s.</sub>.L<sup>-1</sup>, após 15 horas de incubação.



Calculou-se a taxa de crescimento específico ( $\mu_x$ ) para esse experimento utilizando os pontos de 5 a 14 horas. O valor obtido foi de  $0,26 \text{ h}^{-1}$ .

A concentração de ácido acético passa a aumentar a partir de 15 horas após a incubação, enquanto o início da produção de butanol e ácido butírico coincide com o período de crescimento celular exponencial. Embora a biomassa pare de aumentar após 18 horas de incubação, o ácido butírico continua sendo produzido.

Figura 27. Perfil cinético da cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo RCM de acordo com a Metodologia 1

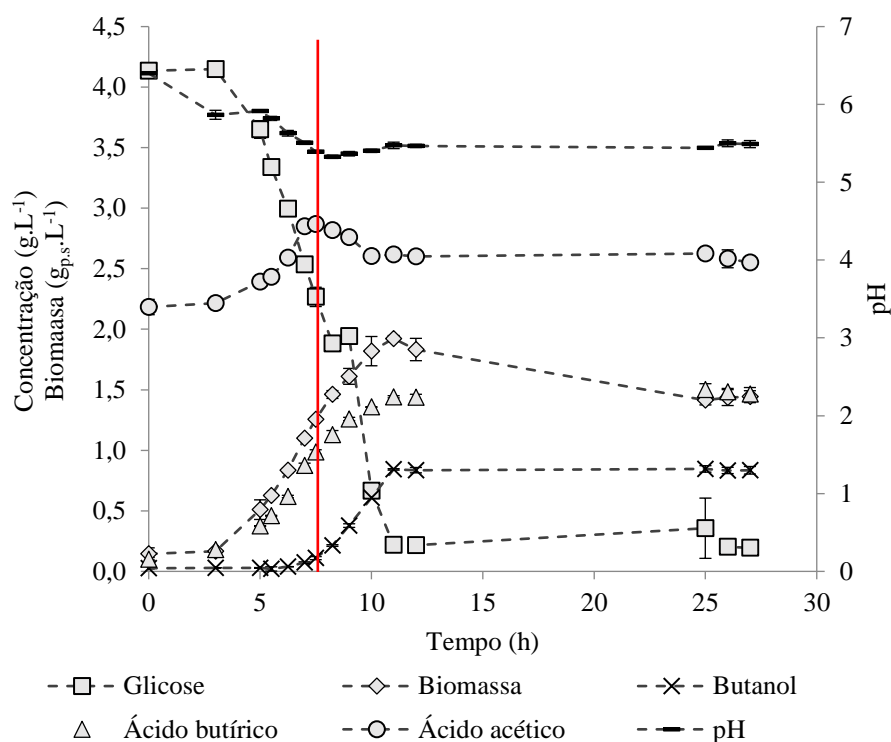


A Figura 28 mostra os resultados obtidos na Metodologia 2. É possível observar que o crescimento exponencial ocorreu entre 5 e 7,5 horas. A concentração máxima de células atingida foi de  $1,92 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$  após 11 horas de incubação. Notou-se que entre 7,5 e 11 horas de incubação, a célula continuou a se duplicar, no entanto, esse período corresponde a fase de desaceleração do crescimento. A taxa de crescimento específico ( $\mu_x$ ) calculada foi de  $0,36 \text{ h}^{-1}$ . Como existe um gap na amostragem entre os tempos de 12 a 25 horas não é possível inferir em que momento a célula atingiu o estado estacionário.

A queda mais acentuada do pH coincide com o fim fase de crescimento exponencial. Em 7,5 horas o pH atingiu valor de 5,3 e se manteve constante até o fim das 30 horas de incubação. A glicose foi praticamente toda consumida em 11 horas, momento em que se observou a maior concentração de butanol ( $0,84 \text{ g.L}^{-1}$ ) e ácido butírico ( $1,92 \text{ g.L}^{-1}$ ). É possível inferir que a produção dos ácidos butírico e acético coincide com o

crescimento celular. Por outro lado, a maior produção de butanol acontece durante a fase de desaceleração do crescimento exponencial. O início de sua produção é atrasado quando comparado com o ácido butírico. Perfil de ácido acético diverge do observado na Figura 27, no qual o ácido acético se manteve constante até o fim da fase exponencial, sugerindo que nesse experimento o ácido acético pode ter sido consumido pela célula.

Figura 28. Perfil cinético da cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo RCM de acordo com a Metodologia 2



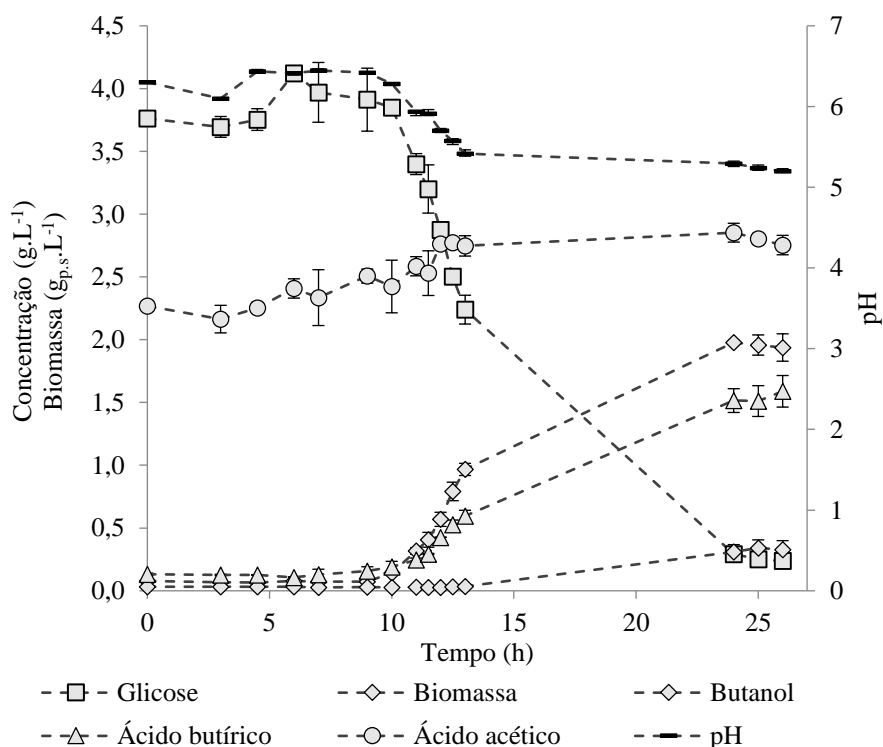
Adicionalmente, observou-se que quando o pH atingiu seu valor mínimo (caracterizado pela linha vermelha no gráfico), a produção de butanol estava começando a acelerar. Ainda, a partir desse momento observa-se que o crescimento celular entra na fase de desaceleração.

Branska et al. (2018) observaram que a produção de solventes pela bactéria *C. beijerinckii* NRRL B-598 é associada ao crescimento celular, em desacordo com a fermentação ABE típica. Todavia, a taxa de crescimento passa a diminuir pouco depois do pH da cultura atingir seu valor mínimo. Na Figura 28 é possível observar o mesmo comportamento. Vale ressaltar que ao iniciar a fase solventogênica a célula cessa a fase acidogênica. Observa-se que a produção de ácido acético, de fato, cessa no tempo de menor valor de pH. No entanto, a produção de ácido butírico continua a acontecer. Isso pode ser explicado pelo fato de o método analítico superestimar o valor de ácido butírico, visto que não é possível separar quantitativamente as concentrações de acetona e ácido

butírico. Com isso, o aumento de ácido butírico mostrado pode ser referente a produção de acetona, sendo possível que a produção de ácido butírico tenha, de fato, cessado nesse momento da fermentação.

A Figura 29 mostra os resultados obtidos na Metodologia 3. Nesse ensaio observou-se que a fase *lag* foi aumentada. A fase exponencial de crescimento começou a ser observada a partir de 9 horas de incubação. Como houve um intervalo entre 13 e 24 horas em que não foram retiradas amostras, não é possível inferir intervalo de tempo equivalente à fase exponencial de crescimento. Foi calculada a taxa de crescimento específico entre 9 e 13 horas e o valor obtido foi de  $0,66 \text{ h}^{-1}$ . Como esse intervalo, provavelmente, corresponde à fase de aceleração do crescimento celular, o ajuste pode não corresponder à taxa de crescimento específico real. Outro ponto que pode ter influenciado na diferença significativa em relação às taxas de crescimento específico obtidas anteriormente é que a concentração inicial de células na Metodologia 3 foi aproximadamente a metade das Metodologias 1 e 2. Isso pode ser relacionado ao fato de que às células crescidas armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  podem consumir suas reservas ou até mesmo sofrer morte celular, o que diminuiria a concentração celular presente no frasco no momento do inóculo.

Figura 29. Perfil cinético da cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo RCM de acordo com a Metodologia 3



Embora a concentração inicial de célula tenha sido menor nesse ensaio, a concentração celular máxima obtida foi similar aos experimentos anteriores, de  $1,94 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$ . O perfil de produção de ácido butírico e de butanol coincidiu com os experimentos anteriores, no entanto, as concentrações finais obtidas ( $1,59$  e  $0,33 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram as menores dentre os resultados discutidos.

Em suma, os resultados observados nas três metodologias estudadas mostram que o pré inóculo fresco permite crescimento celular mais rápido, isto é, fase *lag* mais encurtada. Além disso, observou-se que a concentração celular final foi praticamente a mesma para os três diferentes procedimentos realizados, ou seja, mesmo com perfis cinéticos diferentes, os experimentos concordam com as concentrações celulares em períodos específicos. No início da fase exponencial, a concentração celular se encontra entre  $0,5$  e  $1,0 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$ . Na fase de taxa máxima de crescimento, a concentração celular se encontra entre  $1,0$  e  $1,5 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$ . Ao fim da fase de crescimento celular, a concentração se encontra em torno de  $2,0 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$ . Já durante a fase estacionária, a concentração celular se mantém em torno de  $1,5 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$ .

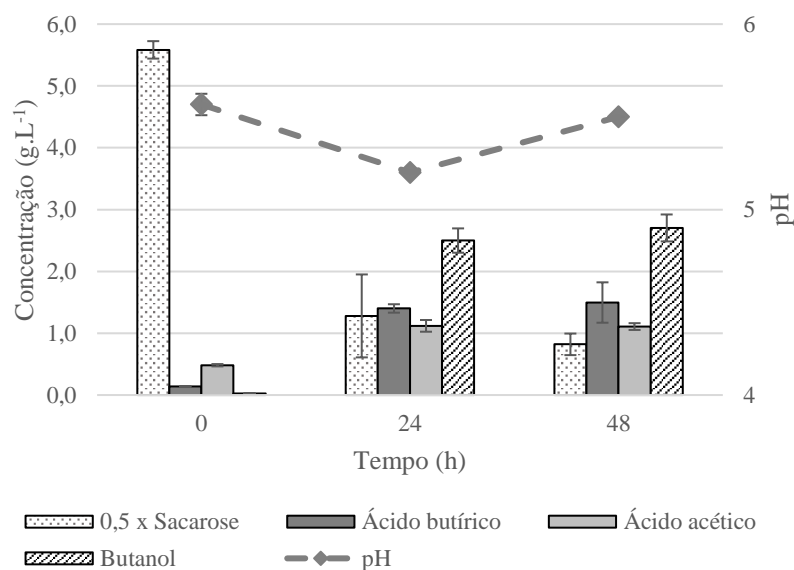
### 5.3 Seleção da matéria-prima

A partir dos resultados obtidos na etapa de seleção do microrganismo, decidiu-se seguir os experimentos utilizando a cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 e sacarose como substrato. Considerando matérias-primas de baixo valor e ricas em sacarose, optou-se por testar a utilização de melaço e melado de cana-de-açúcar.

A Figura 30 mostra os dados obtidos pela fermentação do melaço em meio de cultivo contendo  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de milho-cina. Observou-se que a sacarose não foi completamente consumida em 48 horas. O consumo total foi de  $9,52 \text{ g.L}^{-1}$  e a concentração de sacarose residual foi de  $1,64 \text{ g.L}^{-1}$ .

É possível observar que a lactose não foi consumida durante todo o período da fermentação. No entanto, foi verificado crescimento celular, produção de ácido acético e etanol. Nesse ensaio não houve produção de ácido butírico ou butanol. A biomassa celular apresentou maior valor de densidade óptica de  $1,46$  em 24 horas, seguida por morte celular, embora não tenha ocorrido consumo de substrato. Esse crescimento pode estar relacionado com o carregamento de nutrientes residuais do meio de cultivo do pré-inóculo. As concentrações finais de ácido acético e etanol foram  $1,29$  e  $0,63 \text{ g.L}^{-1}$ .

Figura 30. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e valores de pH utilizando meio de cultivo contendo melão e milho, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598

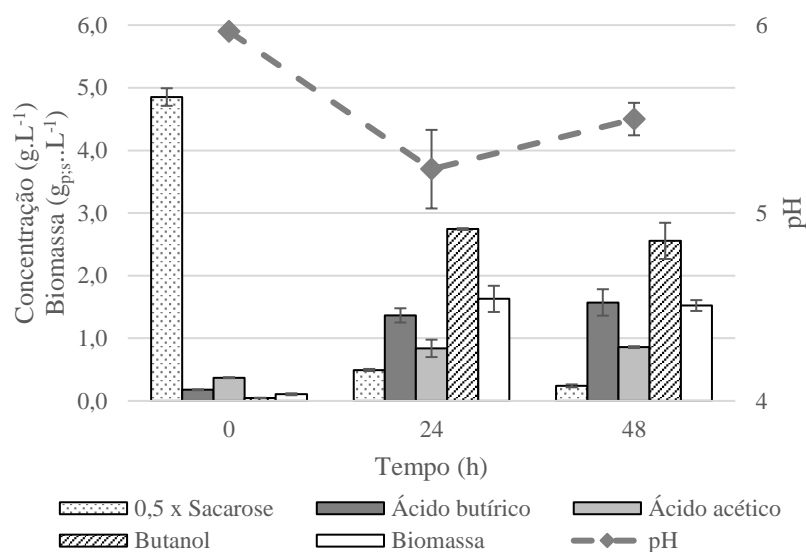


A concentração final de butanol, ácido butírico e ácido acético foi de 2,70, 1,50 e 1,11 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Não houve produção significativa desses produtos nas últimas 24 horas de fermentação. Dessa maneira, a produtividade de butanol em 24 horas foi de 0,10 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

É importante salientar que a biomassa não pode ser quantificada devido à grande quantidade de impurezas em suspensão presentes na matéria-prima, que impossibilitou a análise espectrofotométrica.

A Figura 31 mostra os resultados obtidos no ensaio utilizando melado como fonte de substrato. Observou-se que o consumo total de sacarose foi de 9,22 g.L<sup>-1</sup>. Foi produzido 2,55 g.L<sup>-1</sup> de butanol, 1,57 g.L<sup>-1</sup> de ácido butírico e 0,86 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético. A concentração celular apresentou aumento significativo nas primeiras 24 horas de fermentação, permanecendo constante nas 24 horas seguintes. A produtividade máxima de butanol também foi observada em 24 horas e apresentou valor de 0,11 g.L<sup>-1</sup>.

Figura 31. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e valores de pH utilizando meio de cultivo contendo melado e milhocina, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598



Ao comparar estes dados com os resultados obtidos nos ensaios utilizando sacarose P.A. (Figura 17), a concentração final de butanol obtida foi significativamente menor, visto que foi observado  $3,36 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol no ensaio contendo sacarose pura. No entanto, essa concentração foi observada em 72 horas de fermentação. Ao comparar as produtividades dos ensaios (Tabela 10), o ensaio contendo sacarose pura apresentou produtividade similar aos experimentos contendo melado ou melaço. Isso sugere que as impurezas presentes nessas matérias-primas não apresentam influência negativa sob a produção de butanol. Dessa maneira, a utilização de melaço ou melado de cana de açúcar é uma opção de menor custo para produção de butanol pela fermentação ABE.

Tabela 10. Concentração de butanol ( $C_{\text{butanol}}$ ), produtividade máxima de butanol ( $Q_{\text{Pmáx}}$ ) e tempo (t) em ensaios contendo diferente matérias-primas

	$C_{\text{butanol}}$ $\text{g.L}^{-1}$	$Q_{\text{Pmáx}}$ $(\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$	$t_{\text{máx}}$ (h)
Sacarose	2,20	0,09	24
Melaço	2,50	0,10	24
Melado	2,75	0,11	24

A fim de comparar os resultados obtidos utilizando melado e melaço entre si, foi realizada análise de variância (ANOVA) de fator único considerando isoladamente a produção de butanol e a produtividade. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Análise de variância de fator único (ANOVA) para produção de butanol e produtividade em butanol, realizada com a ferramenta análise de dados do Excel

ANOVA: $\Delta P$						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,2797E-07	1	3,28E-07	2,38E-06	<b>0,998842</b>	7,708647
Dentro dos grupos	0,55033611	4	0,137584			
Total	0,55033643	5				

ANOVA: $Q_p$						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	5,694E-10	1	5,69E-10	2,38E-06	<b>0,998842</b>	7,708647
Dentro dos grupos	0,00095544	4	0,000239			
Total	0,00095545	5				

Observou-se que não houve diferença significativa entre as médias obtidas. Isso quer dizer que considerando a produção de butanol ambas matérias-primas poderiam ser utilizadas. O ideal seria optar pela matéria-prima de menor valor, que seria o melaço. No entanto, não havia quantidade suficiente de melaço para realizar os experimentos posteriores e, se tratava de uma época entre safras e não foi possível conseguir um novo lote a tempo de dar prosseguindo ao desenvolvimento do trabalho. Por esse motivo, optou-se por realizar os próximos passos utilizando melado, com o intuito de extrapolar, grosseiramente, os resultados obtidos para possíveis resultados com melaço, uma vez que como visto na Tabela 11, os dois tratamentos não possuem diferença estatisticamente significativa.

#### 5.4 Influência de parâmetros iniciais

Algumas variáveis do cultivo têm influência no perfil de produção de metabólitos e crescimento do microrganismo. Parâmetros iniciais como pH, concentração inicial de substrato e a idade do pré-inóculo foram estudados.

##### 5.4.1 pH

O pH foi ajustado a 5,6, 6,5, 7,3 e 8,5 anteriormente a etapa de autoclavagem. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 32.

A Figura 32A mostra os resultados relativos ao pH ajustado em 5,6. Observou-se que o consumo total de sacarose foi, em média, 8,62 g.L<sup>-1</sup>. O crescimento celular, a produção de ácido butírico e de butanol atingiram seus valores mais altos em 48 horas, sendo cerca de 2,57 g.L<sup>-1</sup>, 0,49 g.L<sup>-1</sup> e 2,46 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A Figura 32B, relativa ao pH ajustado em 6,5, mostra consumo total de sacarose de, em média, 10,29 g.L<sup>-1</sup>. Diferentemente do obtido para pH 5,6, a concentração celular apresentou valor mais alto em 24 horas (3,32 g.L<sup>-1</sup>) e decresceu nas 24 horas seguintes. Por outro lado, o ácido butírico e o butanol foram produzidos continuamente no tempo estudado, chegando à concentração de cerca de 0,88 g.L<sup>-1</sup> e 3,55 g.L<sup>-1</sup> em 48 horas.

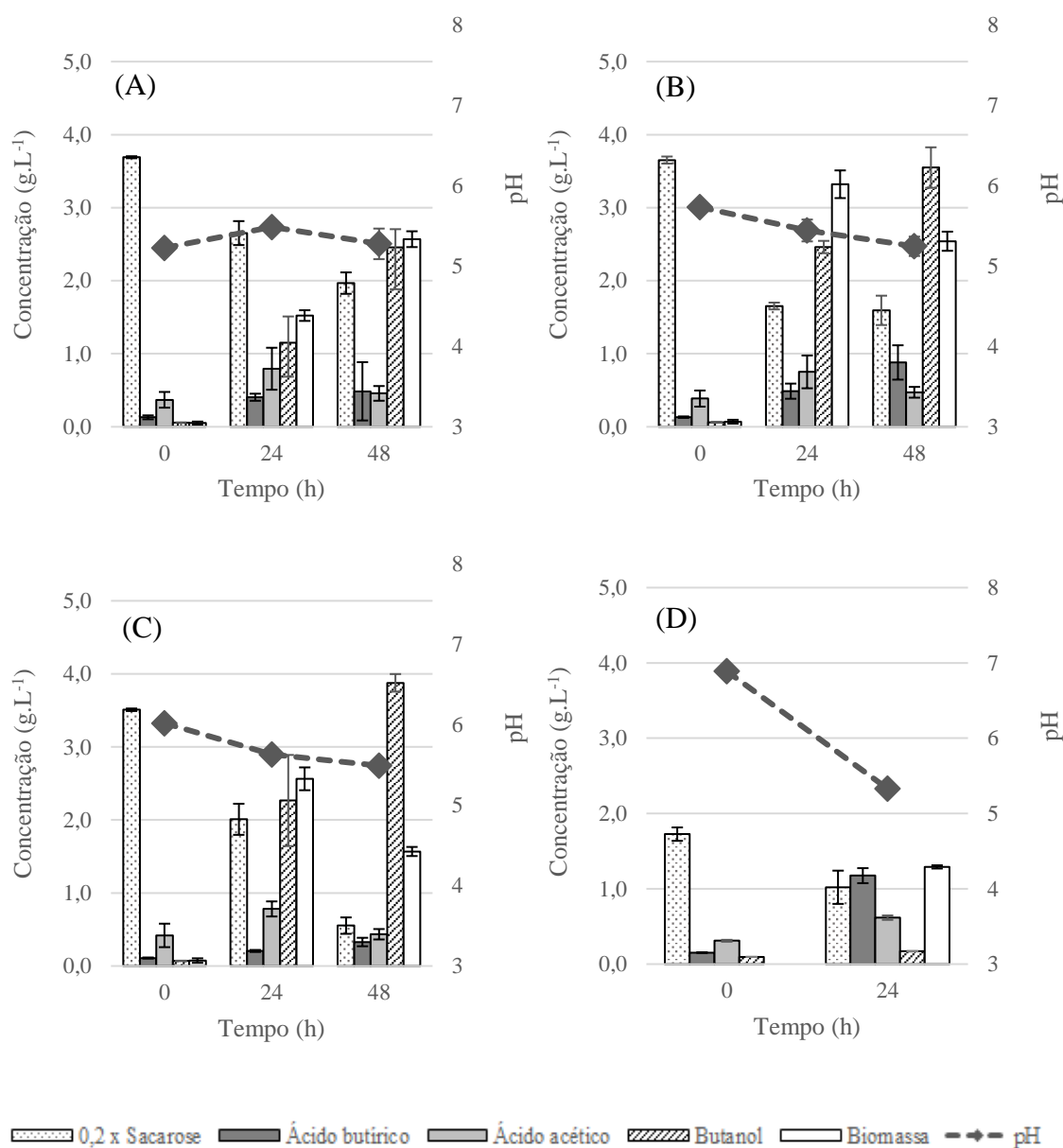
A Figura 32C mostra os resultados obtidos quando o pH inicial foi ajustado para 7,3. É possível observar que houve maior consumo de substrato dentre as condições estudadas. Em 48 horas de fermentação cerca de 14,78 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foi consumida. Assim como os resultados para pH ajustado de 6,5, a biomassa obteve seu valor mais alto em 24 horas (2,56 g.L<sup>-1</sup>) e decresceu nas 24 horas seguintes. A produção de ácido butírico e butanol também foi maior em 24 horas de fermentação e apresentou valor de 0,33 g.L<sup>-1</sup> e 3,88 g.L<sup>-1</sup>. A máxima concentração de butanol foi, portanto, obtida nessa condição.

A produção de ácido acético apresentou o mesmo perfil nas três condições acima descritas. Em 24 horas de fermentação, a concentração desse ácido atingiu aproximadamente 0,75 g.L<sup>-1</sup> e apresentou queda no tempo seguinte. Isso sugere que o pH inicial não tem influência direta na produção de ácido acético, no meio de cultivo estudado. É possível notar, ainda, que a concentração celular máxima obtida para pH ajustado em 5,6 e 7,3 foi similar (aproximadamente 2,5 g.L<sup>-1</sup>), enquanto a concentração celular na condição onde o pH foi ajustado em 6,5 foi cerca de 30% maior.

Além disso, notou-se que embora o pH tenha sido ajustado para 7,3, no tempo zero, ou seja, após autoclavagem e inóculo, o pH observado foi de aproximadamente 6,0. Por outro lado, quando o pH foi ajustado para 6,5, no tempo zero o pH apresentou valor de aproximadamente 5,7. Isso quer dizer que a diferença de 0,8 unidade no ajuste inicial não permaneceu a mesma após autoclavagem e inóculo. Ao comparar o pH no tempo zero das duas condições, a diferença foi de 0,3 unidade. Dessa forma, embora a condição na qual o pH foi ajustado para 7,3 tenha apresentado maior consumo de substrato e maior produção de butanol, o pH no início da fermentação não foi maior que 6,0.



Figura 32. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e pH utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milho-cina com pH ajustado antes da etapa de esterilização em: (A) 5,6 ; (B) 6,5 ; (C) 7,3 e (D) 8,5



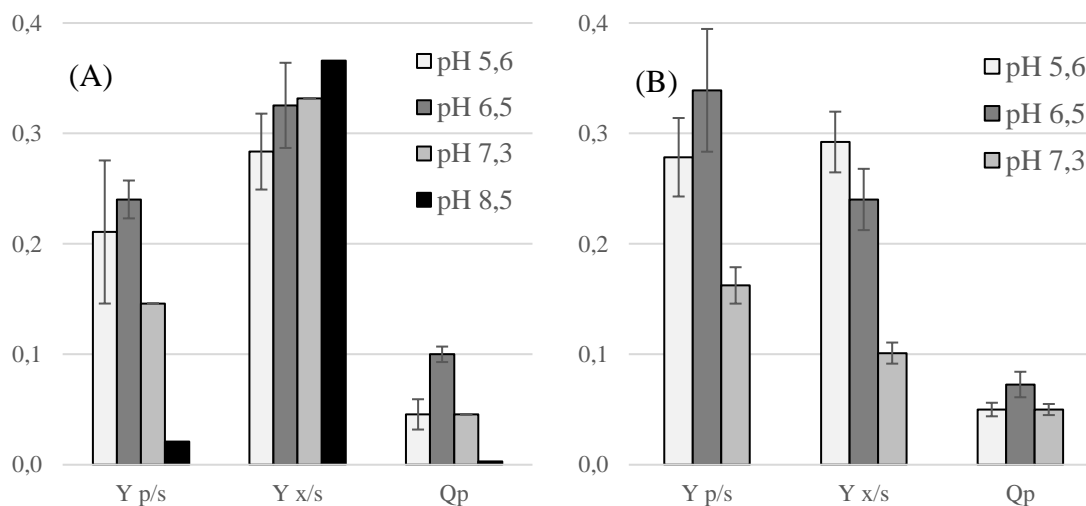
A Figura 32D mostra os resultados para pH inicial ajustado em 8,5. É possível observar que o consumo de substrato, a produção dos metabólitos e o crescimento celular foram significativamente menores. O total de sacarose consumida foi, em média, 3,53 g.L<sup>-1</sup>, enquanto o crescimento celular foi de 1,29 g.L<sup>-1</sup>, menos que a metade da biomassa observada nas demais condições estudadas. A concentração de ácido butírico e ácido acético em 24 horas de fermentação foi de 1,17 g.L<sup>-1</sup> e 0,62 g.L<sup>-1</sup> e, a produção de butanol não foi significativa. O pH no tempo zero foi de 6,9 e, é possível concluir que o pH próximo a 7,0 não é favorável para a produção de butanol e para o crescimento celular.

Além disso, ao ajustar o pH para 8,5 observou-se que o meio de cultivo adquiriu coloração escura e houve formação de precipitado, impossibilitando, inclusive, a medida da densidade óptica no tempo zero.

Visioli et al. (2015) avaliaram a influência do pH inicial na produção de butanol por *C. beijerinckii* NRRL B-592. Quando o pH inicial da fermentação foi ajustado a 7,0 e 8,0, não foi observada produção de butanol, o que está de acordo com o presente estudo, visto que quando o pH foi ajustado a 8,5, mas passou a 6,9 no tempo zero da fermentação, não houve produção significativa de butanol.

A Figura 33 mostra os parâmetros calculados para 24h (A) e 48h (B) de fermentação nas condições estudadas. Nas primeiras 24 horas, é possível observar que as condições cujo pH foi ajustado para 5,6 e 6,5 apresentaram maiores rendimentos em produto ( $Y_{p/s}$ ). Todavia, o rendimento em célula ( $Y_{x/s}$ ) foi maior conforme o aumento do pH inicial ajustado. Isso mostra que os valores mais baixos de pH favoreceram a produção de butanol, enquanto os valores mais altos de pH favoreceram a produção de biomassa. Analisando a produtividade, é possível observar que a maior produtividade obtida foi de  $0,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para condição cujo pH foi ajustado a 6,5 antes da autoclavação.

Figura 33. Rendimento em butanol ( $Y_{p/s}$ ), rendimento em célula ( $Y_{x/s}$ ) e produtividade ( $Q_p$ ) utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milhocina com pH ajustado antes da etapa de esterilização em: (A) 24 horas e (B) 48 horas de fermentação.  $Y_{p/s}$  em  $\text{g}_{\text{butanol}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ ;  $Y_{x/s}$  em  $\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$  e  $Q_p$  em  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$



Considerando 48 horas de fermentação observou-se que o maior rendimento em produto ( $Y_{p/s}$ ) foi observado para pH inicial ajustado a 6,5 e, foi ainda maior que o valor obtido nas primeiras 24 horas. Em contrapartida, o rendimento em célula decresceu conforme o pH inicial aumentou, uma vez que, salvo a condição de pH inicial ajustado a 5,6, a concentração celular diminuiu nas últimas 24 horas. A produtividade em butanol

apresentou o mesmo perfil que nas primeiras 24 horas e, a condição de pH inicial ajustado em 6,5 atingiu  $0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Sheng et al. (2019) estudaram a otimização de parâmetros iniciais na produção de butanol por *C. beijerinckii* F-6, uma espécie de alta tolerância a butanol. O pH inicial ótimo estimado em seu planejamento experimental foi 7,0 e, os autores obtiveram concentração de butanol final de  $7,88 \text{ g.L}^{-1}$  e uma produtividade de  $0,24 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Todavia, o ensaio também contou com a adição de  $1,23 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido butírico, que também influenciou a alta produtividade de butanol obtida.

#### 5.4.2 Concentração da matéria-prima

Também foi estudada a influência da concentração da matéria-prima fonte de substrato, no caso o melado, no metabolismo celular. Como o melado não é composto apenas de sacarose, isto é, carrega compostos presentes na cana-de-açúcar como minerais e vitaminas, é importante avaliar o impacto na produção de butanol devido a presença desses compostos no meio de cultivo. Dessa forma, estudou-se meios de cultivo contendo aproximadamente,  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $18 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $26 \text{ g.L}^{-1}$  e  $76 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose proveniente do melado.

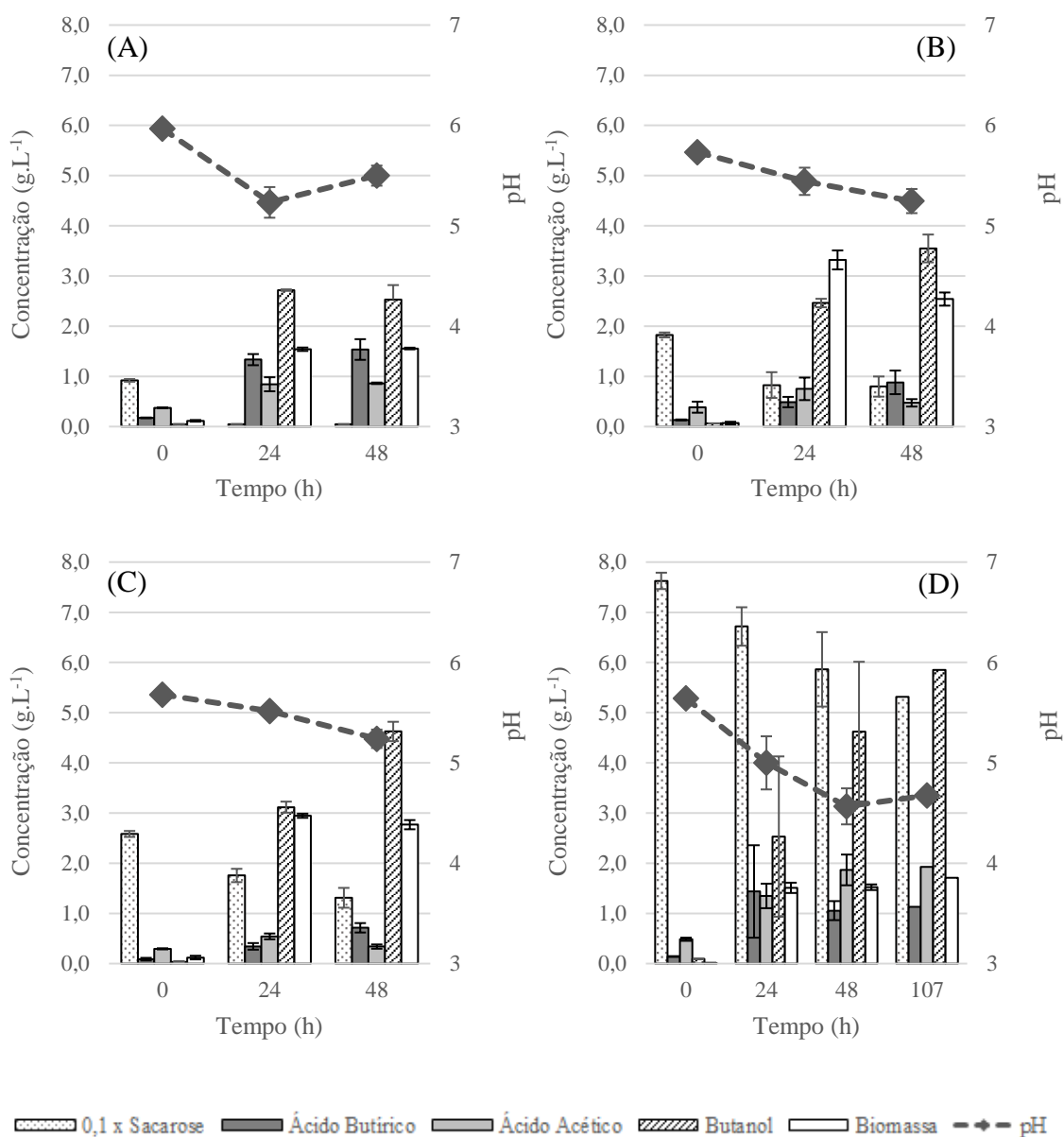
As Figura 34A, 34B, 34C e 34D apresentam os resultados obtidos nos experimentos contendo  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $18 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $26 \text{ g.L}^{-1}$  e  $76 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, respectivamente. As concentrações de sacarose estão representadas como a décima parte da concentração real para permitir melhor visualização de escala.

Na Figura 34A é possível observar que a sacarose foi totalmente consumida em 24 horas de fermentação, produzindo  $0,86 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido acético,  $1,54 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido butírico e  $2,53 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol. A concentração celular atingiu  $1,54 \text{ g.L}^{-1}$  em 24 horas e se manteve constante durante as últimas 24 horas de fermentação.

Na Figura 34B observou-se que o consumo de sacarose ocorreu nas primeiras 24 horas, totalizando  $10,29 \text{ g.L}^{-1}$  e, se manteve constante no período seguinte. A concentração de biomassa atingiu  $3,32 \text{ g.L}^{-1}$  em 24 horas e, sem seguida, decresceu. Todavia, tanto ácido butírico quanto butanol foram produzidos continuamente e, alcançaram concentração de  $0,88$  e  $3,55 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, em 48 horas.

A Figura 34C mostra que houve consumo de substrato durante 48 horas de fermentação, totalizando  $12,72 \text{ g.L}^{-1}$ . A concentração celular atingiu seu máximo em 24 horas ( $2,95 \text{ g.L}^{-1}$ ) e, se manteve praticamente constante nas 24 horas seguintes. Em 48 horas de fermentação observou-se  $0,71 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido butírico e  $4,62 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol.

Figura 34. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e valores de pH utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo contendo 25 g.L<sup>-1</sup> de milhocina e: (A) 10 g.L<sup>-1</sup>; (B) 18 g.L<sup>-1</sup>; (C) 26 g.L<sup>-1</sup> e (D) 76 g.L<sup>-1</sup> de sacarose proveniente do melado.



Na Figura 34D, é possível observar que a concentração sacarose residual foi alta, embora o consumo total tenha sido maior que o observado nas outras condições (aproximadamente 23 g.L<sup>-1</sup>). A concentração celular atingiu 1,51 g.L<sup>-1</sup> em 24 horas e se manteve constante nas horas seguintes. Embora o consumo de substrato tenha sido maior em relação as outras condições, a concentração de biomassa observada foi similar a condição contendo 10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Em contrapartida, os outros metabólitos apresentaram maior concentração dentre as condições estudadas. A produção de butanol ocorreu continuamente, chegando a 5,85 g.L<sup>-1</sup> em 107 horas de fermentação. No entanto, em 48 horas de fermentação, a concentração de butanol (4,62 g.L<sup>-1</sup>) foi similar a

concentração obtida na condição anterior. Dessa forma, a produtividade obtida em 48 horas de fermentação foi a mesma para essas duas condições, de  $0,095 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . A concentração de ácido butírico teve seu maior valor ( $1,44 \text{ g.L}^{-1}$ ) em 24 horas, enquanto a concentração de ácido acético atingiu  $1,93 \text{ g.L}^{-1}$  em 48 horas e se manteve praticamente constante no período subsequente.

De maneira geral, pode-se concluir que quanto maior o consumo de sacarose maior foi a produção de butanol. Por outro lado, ao aumentar a concentração de substrato acima de  $26 \text{ g.L}^{-1}$  não ocorreu aumento do crescimento celular. Levanta-se a hipótese que a partir de determinada concentração de melado, o acúmulo de outros componentes presentes na matéria-prima ou, ainda, o aumento da pressão osmótica do meio de cultivo possa ter influenciado negativamente no crescimento celular, embora tenha favorecido a produção de butanol. Além disso, como os ensaios foram realizados em frascos de soro, a geometria do fermentador pode ter limitado o crescimento celular.

A maior produtividade obtida nesses experimentos foi de  $0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 24 horas de fermentação, na condição contendo  $26 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose proveniente do melado. No contexto geral, as produtividades em 24 horas de fermentação foram bastante próximas, em torno de  $0,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , como pode ser observado na Tabela 12. Isso pode ser explicado pelo fato de que o consumo de substrato nas primeiras 24 horas foi em torno de  $9,0 \text{ g.L}^{-1}$ , independente da concentração inicial utilizada. Além disso, a produção de butanol nesse período foi em torno de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  para todas as condições estudadas, exceto para concentração inicial de  $26 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose proveniente do melado, em que foi cerca de  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ , o que explica a produtividade para essa condição ter sido um pouco maior. Portanto, concluiu-se que até  $76 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose proveniente do melado, não houve inibição na produção de butanol por *C. beijerinckii* NRRL B-598.

Tabela 12. Produtividade em butanol, em  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , em diferentes concentrações iniciais de sacarose proveniente do melado

	Sacarose			
	$10 \text{ g.L}^{-1}$	$18 \text{ g.L}^{-1}$	$26 \text{ g.L}^{-1}$	$76 \text{ g.L}^{-1}$
<b>24 h</b>	0,111	0,100	<b>0,128</b>	0,102
<b>48 h</b>	0,052	0,073	0,096	0,094

LI et al. (2013) buscaram avaliar a influência da concentração inicial de açúcares no crescimento celular e produção de metabólitos por uma cepa mutante de *Clostridium beijerinckii*. Os autores utilizaram melaço tratado previamente com solução ácida como fonte de substrato para a célula. Os meios de cultivo foram preparados de forma a conter 40, 50, 60, 70 e  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares totais em sua composição. Foi observado que o

principal produto foi o butanol e, que a produção de butanol aumentou com o aumento da concentração inicial de açúcares, até  $60 \text{ g.L}^{-1}$ . A partir dessa concentração inicial de açúcar, o rendimento e o total de butanol produzido diminuíram. Os autores atribuíram essa diminuição aos efeitos tóxicos do acúmulo de substrato, bem como ao aumento dos efeitos osmóticos em decorrência da alta concentração de açúcares.

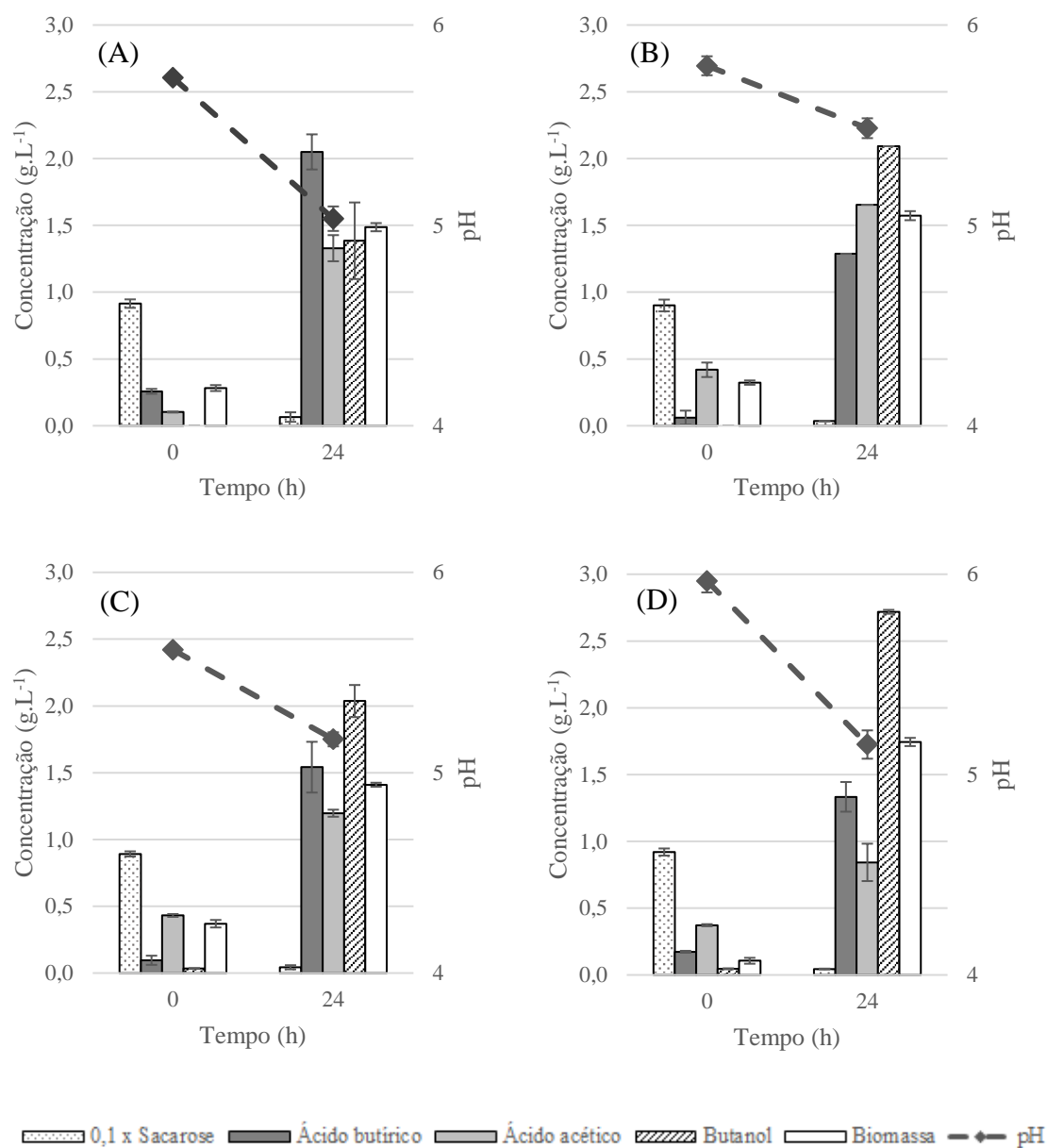
Contudo, foi observado no presente estudo que a concentração inicial de  $76 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose proveniente do melado não teve efeito inibitório na produção de butanol, mas sim no crescimento celular. Isso pode sugerir que a cepa utilizada, *C. beijerinckii* NRRL B-598, pode apresentar maior tolerância aos efeitos osmóticos bem como os efeitos tóxicos cumulativos de componentes presentes na matéria-prima.

#### **5.4.3 Idade do pré-inóculo**

Estudou-se a influência da idade do pré-inóculo na produção de butanol. De acordo com as conclusões obtidas nos experimentos de cinética em meio de cultivo RCM estabeleceu-se que na fase de aceleração, a densidade óptica se encontrava em aproximadamente 1,2 (Condição D1), na fase exponencial de crescimento a densidade óptica se encontrava em aproximadamente 2,0 (Condição D2), na fase de desaceleração do crescimento a densidade óptica se encontrava em aproximadamente 3,0 (Condição D3). Estudou-se, ainda, a fase estacionária de crescimento, após 24 horas de incubação (Condição D4). As Figuras 35A, 35B, 35C e 35D apresentam os resultados dos experimentos correspondentes as condições D1, D2, D3 e D4, respectivamente.

Observou-se que em todas as condições estudadas a sacarose foi completamente consumida em 24 horas. Na Figura 35A, a produção de ácido acético, ácido butírico e butanol foi de  $1,33 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $2,05 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,39 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Já o crescimento celular em 24 horas foi de  $1,48 \text{ g.L}^{-1}$ . Como a produção de ácido butírico foi elevada, o pH chegou a 5,0 ao final da fermentação. Na Figura 35B, a concentração celular e a produção de ácido acético foram pouco maiores que na condição anterior,  $1,57 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,60 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. No entanto, a produção de ácido butírico foi significativamente menor ( $1,29 \text{ g.L}^{-1}$ ) enquanto a produção de butanol foi mais acentuada, chegando a  $2,10 \text{ g.L}^{-1}$ . Como a produção de ácido butírico foi menor, a queda do pH não foi tão intensa e, em 24 horas o pH observado foi 5,5.

Figura 35. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e valores de pH utilizando meio de cultivo contendo melado e milho-cina, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598 proveniente de pré-inóculo em diferentes estágios: (A) D1; (B) D2; (C) D3 e (D) D4.



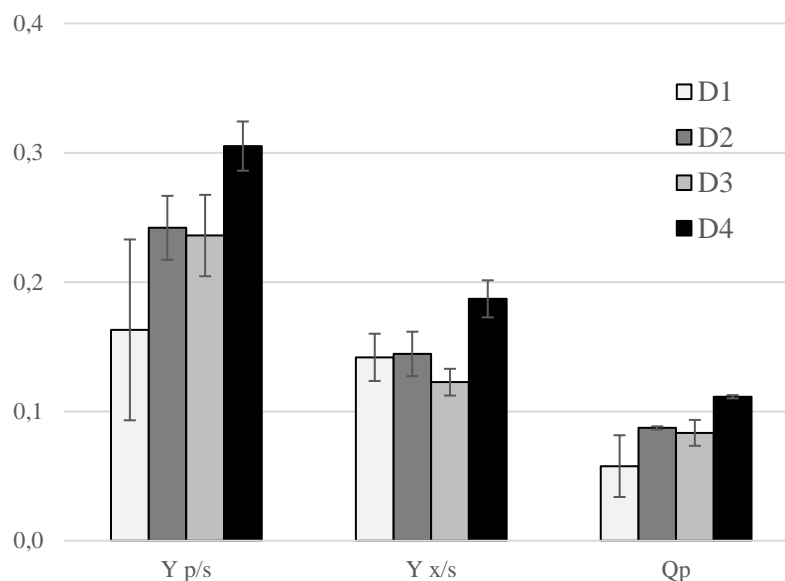
A Figura 35C mostra que a concentração celular alcançada foi de 1,41 g.L<sup>-1</sup> e, a produção de ácido acético, ácido butírico e butanol foi 1,20, 1,54 e 2,04 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Como a produção de ácido butírico nessa condição foi maior que na discutida anteriormente, a queda do pH foi mais pronunciada, chegando a 5,2 em 24 horas. Considerando o desvio padrão, a produção de butanol foi similar nas condições D2 e D3.

Já na Figura 35D, observou-se maior crescimento celular, alcançando uma concentração de células de 1,74 g.L<sup>-1</sup> em 24 horas. A produção de ácido acético, ácido

butírico e butanol foram de  $0,84 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $1,33 \text{ g.L}^{-1}$  e  $2,72 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Portanto, essa condição permitiu a maior produção de butanol, bem como o maior crescimento celular.

A Figura 36 compara os parâmetros calculados nas condições acima descritas.

Figura 36. Rendimento em butanol ( $Y_{p/s}$ ), rendimento em célula ( $Y_{x/s}$ ) e produtividade ( $Q_p$ ) utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milhocina em diferentes condições de pré-inóculo.  $Y_{p/s}$  em  $\text{g}_{\text{butanol}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ ;  $Y_{x/s}$  em  $\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$  e  $Q_p$  em  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$



É possível observar que a condição D4 permitiu maior rendimento em produto e em célula, bem como a maior produtividade em butanol. Dessa maneira, optou-se por utilizar células crescidas em RCM por 24 horas como pré-inóculo para experimentos futuros.

#### 5.4.4 Toxicidade aguda provocada por concentração inicial de butanol

Para determinar a concentração de butanol a partir da qual o metabolismo celular sofre inibição, adicionou-se quatro diferentes concentrações de butanol no meio de cultivo contendo melado e milhocina. Foram adicionados  $4,5 \text{ g.L}^{-1}$  (C4,5),  $5,5 \text{ g.L}^{-1}$  (C5,5),  $7,0 \text{ g.L}^{-1}$  (C7) e  $9,0 \text{ g.L}^{-1}$  (C9) de butanol. As Figuras 37A, 37B, 37C e 37D apresentam os resultados dos experimentos correspondentes as condições C4,5, C5,5, C7 e C9, respectivamente.

Em nenhuma das condições estudadas o consumo de sacarose foi total. Ainda, observou-se que quanto maior a concentração de butanol no meio, menor foi o consumo de substrato e o crescimento celular, confirmando a toxicidade causada pela presença de butanol. Nas condições C4,5 e C5,5, a concentração de butanol aumentou em  $1,29 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,61 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, sugerindo que até  $5,5 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol a célula ainda se



encontra metabolicamente ativa, visto que essa diferença de concentração corresponde a produção de butanol em sua respectiva condição. Dessa maneira, ao comparar a condição C4,5 com os resultados obtidos na condição D4, na qual a concentração inicial de substrato e o pH inicial foram iguais, observou-se que a produção de butanol foi menor em C4,5, embora a concentração celular tenha atingido maior valor. Essa diferença na concentração de biomassa pode ser devido ao fato que as células em presença de butanol tendem a acumular reservas e iniciar o processo de esporulação, causando o aumento do seu peso seco. Por outro lado, como a produção de butanol foi menor na condição C4,5 que na condição D4, pode-se estabelecer que a presença de concentração inicial de butanol influencia negativamente a produção desse solvente.

Nas condições C7 e C9, a diferença entre a concentração de butanol nos dois pontos de amostragem foi pouco significativa, assim como o consumo de substrato. Isso sugere que concentrações iniciais de butanol próximas ou superiores a  $7,0 \text{ g.L}^{-1}$  possuem efeito inibitório para a cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598. Entretanto, não foi observada diminuição significativa da biomassa celular nessas condições, o que indica que as células presentes no meio de cultivo não entraram em fase de morte celular e, possivelmente estariam no processo de esporulação.

Além disso, observou-se que nas condições C4,5 e C5,5, o ácido acético proveniente do pré-inóculo foi totalmente consumido em 24 horas, ao passo que ácido butírico foi produzido, levando a diminuição do pH. Nas condições C7 e C9 não houve consumo significativo de ácido acético nem mesmo produção significativa de ácido butírico. Por essa razão, a diminuição do valor de pH não foi acentuada.

Analisando os parâmetros de rendimento em butanol ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade em butanol ( $Q_p$ ), nas condições em que houve produção de butanol (Figura 38), observou-se que ao aumentar a concentração inicial de butanol no meio de cultivo, diminui-se a produção de butanol, como consequência da toxicidade desse produto ao metabolismo celular.

Figura 37. Concentração de sacarose, ácido butírico, ácido acético, butanol, biomassa e valores de pH utilizando meio de cultivo contendo melado e milho-cina, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598 em diferentes concentrações iniciais de butanol: (A) 4,5 g.L<sup>-1</sup>; (B) 5,5 g.L<sup>-1</sup>; (C) 7,0 g.L<sup>-1</sup> e (D) 9,0 g.L<sup>-1</sup>

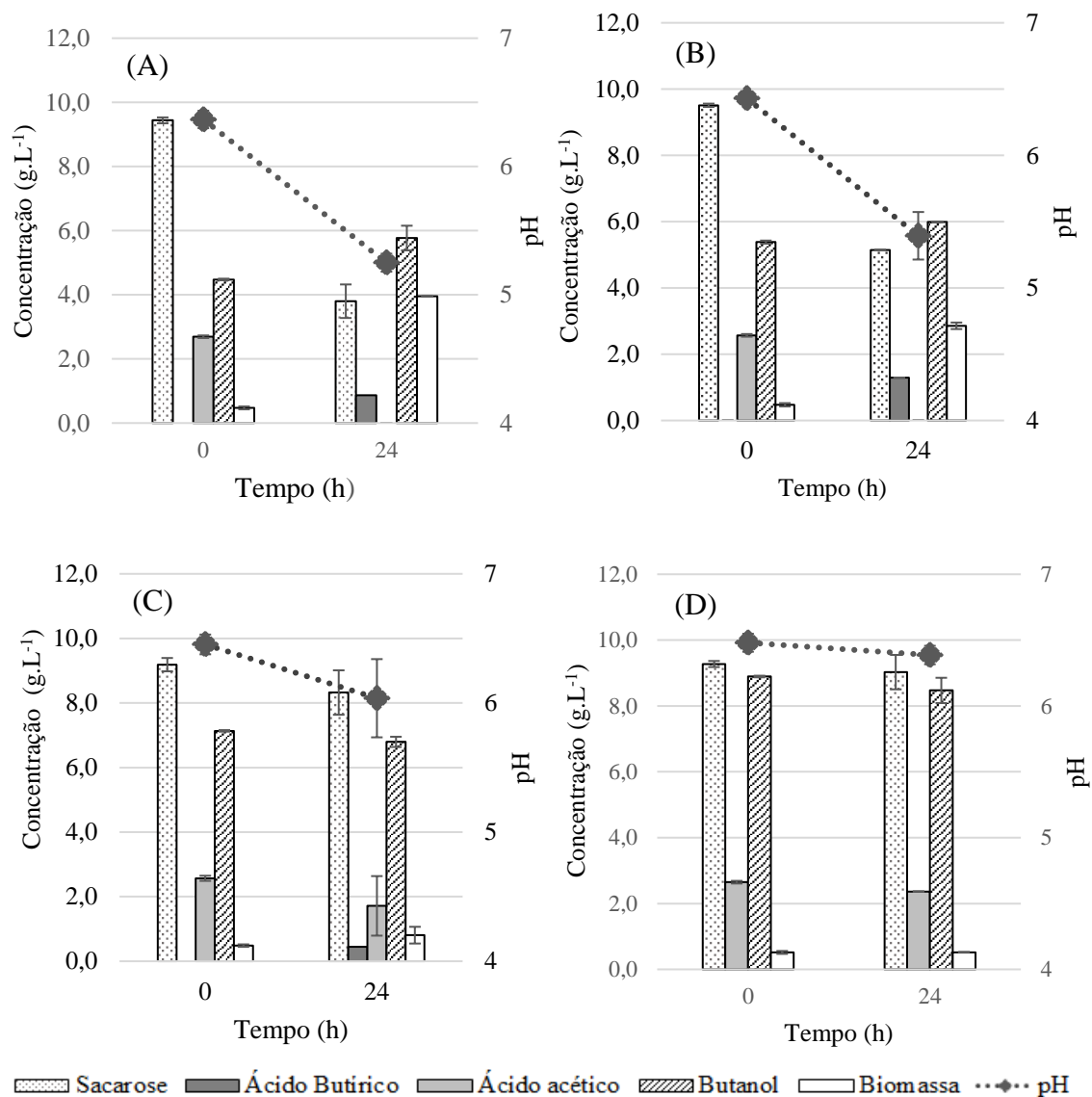
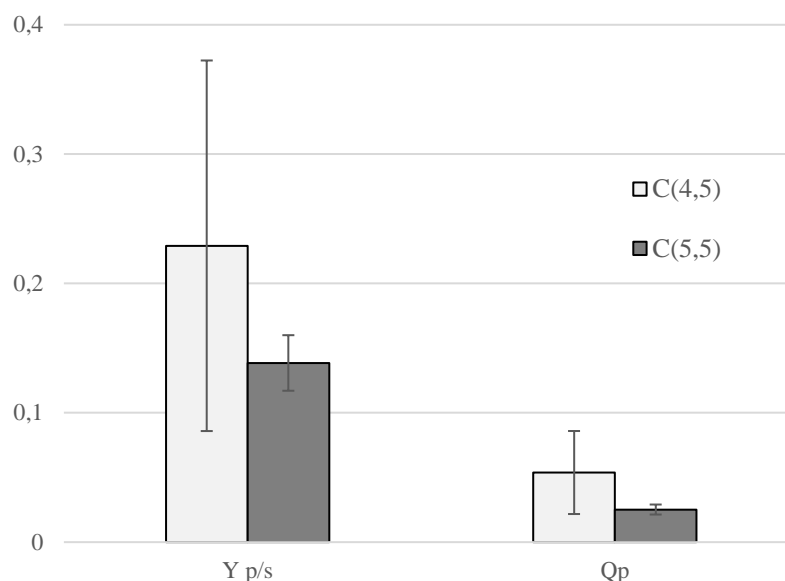


Figura 38. Rendimento em butanol ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade em butanol ( $Q_p$ ) nas condições contendo 4,5 e 5,5 g.L<sup>-1</sup> de butanol no meio de cultivo contendo melado e milhocina, utilizando *C. beijerinckii* NRRL B-598



Branska et al. (2018) estudaram a influência da concentração inicial de butanol na viabilidade celular. O experimento contou com a adição de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de butanol ao meio de cultivo. Os autores observaram que o crescimento celular foi mais lento e a concentração celular atingida foi menor do que no experimento controle. Além disso, a célula foi capaz de produzir cerca de 3,0 g.L<sup>-1</sup> de butanol e a análise da população celular mostrou que no estágio inicial da fermentação o número de células em seu estado ativo foi tão alto quanto no experimento controle.

É reportado na literatura que, normalmente, concentração de butanol próxima a 1% (p/v) pode provocar aumento de 20 a 30% da fluidez da membrana, que acarreta efeitos metabólicos negativos para a célula na maioria das espécies selvagens de *Clostridium*. Espécies mutantes, por sua vez, podem tolerar até 2% (p/v) de butanol no meio de cultivo (PATAKOVA et al., 2018; ZULETA CORREA, 2018).

No presente estudo, na concentração inicial de 4,5 g.L<sup>-1</sup> de butanol a cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 foi capaz de crescer e, atingiu uma concentração celular próxima do observado em experimentos na ausência de butanol inicial. Todavia, a célula foi capaz de produzir cerca de 1,3 g.L<sup>-1</sup> de butanol, que é consideravelmente menor que o reportado por Branska et al. (2018). Isso quer dizer que a célula é capaz de tolerar e se adaptar a exposição dessa concentração de butanol. Contudo, ao aumentar a concentração inicial de butanol em valores acima de 7,0 g.L<sup>-1</sup>, foi observada influência negativa na viabilidade e no crescimento celular, em concordância com o observado pelos mesmos autores.

A Figura 39 mostra as imagens microscópicas da população celular após 24 horas de crescimento sob as condições anteriormente descritas.

É possível observar que em cada condição estudada a morfologia celular foi distinta. Na Figura 39A, a maior parte da população se apresenta em seu estágio clostridial, em que as células se encontram mais inchadas e começam a acumular granulose e desenvolver esporos subterminais. Essa característica morfológica está muito ligada a fase solventogênica, visto que a esporulação e produção de solventes dividem mecanismos de regulação gênica. Como a produção de butanol foi maior nessa condição, espera-se que a maior parte das células se encontrem no estágio clostridial, como observado.

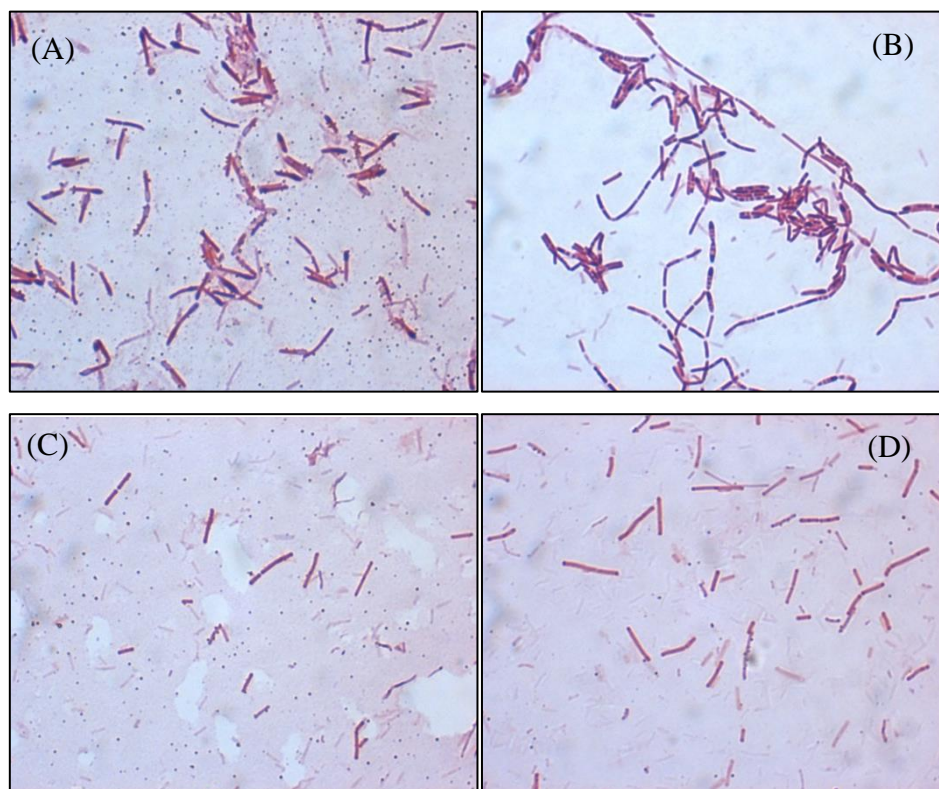
Na Figura 39B observou-se que as células se encontram mais agrupadas, formando uma cadeia de células septadas. Parte das células se encontra no estágio clostridial enquanto a outra parte se encontra no estágio vegetativo, ou seja, realizando divisão celular. Possivelmente, parte da população ainda se encontra em fase de crescimento exponencial e, caso o experimento fosse mantido por mais tempo seria observado maior consumo de sacarose e, conseqüentemente, maior produção de butanol. Como a produção de butanol nessa condição foi menor que na condição anterior, é esperado que uma menor quantidade de célula se encontre no estágio clostridial, como observado.

Nas Figuras 39C e 39D é possível observar que um menor número de células. Em relação a morfologia celular, observou-se que as células se encontram em seu estágio vegetativo, no entanto, não se observa conformação de células em cadeia sugerindo divisão celular como na condição C5,5. Essas características estão de acordo com o observado na Figura 37, que mostra que o crescimento celular não foi significativo, para essas condições. Ainda, não foram observadas células no estágio clostridial, corroborando com os resultados apresentados na Figura 37, nos quais não foi observada produção de butanol.

Um detalhe importante é que as células nas condições C7 e C9, não retiveram o corante cristal violeta na mesma proporção que nas condições de menor concentração inicial de butanol, apresentando coloração mais avermelhada. Isso pode ser devido ao fato de que o efeito tóxico do butanol pode levar a perda de camadas de peptidoglicano que compõem a parede celular dessa bactéria, característica de células velhas. Bergey (2009) classifica as bactérias da espécie *Clostridium beijerinckii* como Gram positivas, no entanto pontua que culturas mais antigas podem corar como Gram negativas, como observado nas Figuras 39C e 39D. Conclui-se, portanto, que a concentração inicial de

butanol próxima ou superior a  $7 \text{ g.L}^{-1}$  tem, de fato, influência na fisiologia celular e em sua morfologia.

Figura 39. Micrografias do centrifugado celular de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 em 24 horas de crescimento em meio de cultivo contendo melado e milhocina em diferentes concentrações iniciais de butanol: (A)  $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ ; (B)  $5,5 \text{ g.L}^{-1}$ ; (C)  $7,0 \text{ g.L}^{-1}$  e (D)  $9,0 \text{ g.L}^{-1}$ .



Branska et al. (2018) concluíram que a cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 é capaz de tolerar e se adaptar a uma concentração de butanol que é subletal para outras estirpes. Ainda, os autores perceberam que o pH possui um papel mais importante na atenuação da viabilidade celular durante a fase clostridial do ciclo celular. Assim, eles levantam uma suposição interessante de que a concentração de butanol não é, de fato, o fator responsável pelo declínio da viabilidade celular e sim a diminuição do pH somada ao acúmulo de ácido butírico. Na visão dos autores, a produção de solventes se torna uma alternativa para transpor a condição ácida desfavorável.

## 5.5 Ensaios em biorreator

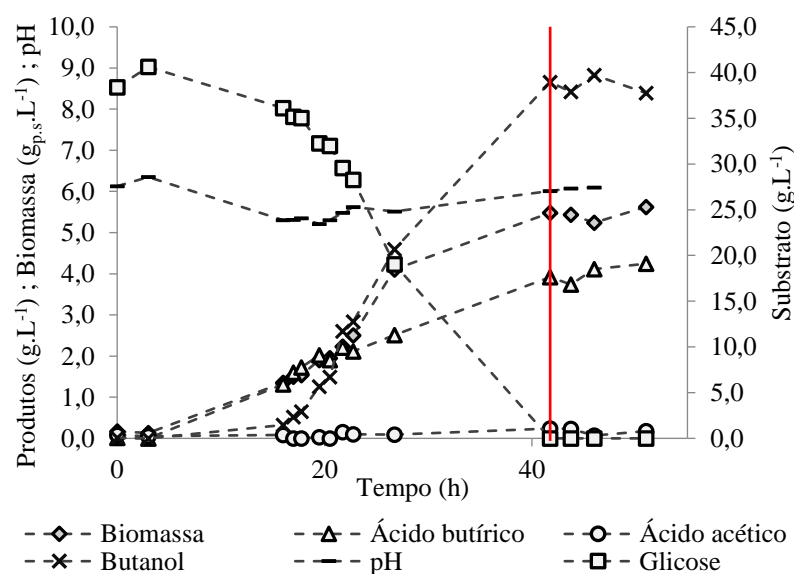
### 5.5.1 Ensaio 1

A Figura 40 mostra os resultados obtidos na fermentação de glicose no meio de cultivo cuja composição está descrita na Tabela 8. Em 42 horas de fermentação a glicose ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ) já havia sido totalmente consumida e foi produzido  $8,4 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol e

5,4  $\text{g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$  de biomassa celular. A concentração máxima de ácido butírico obtida foi de 4,2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e a produção de ácido acético não foi relevante. O pH diminuiu para 5,3 em 16 horas de fermentação e apresentou aumento pouco acentuado nos tempos seguintes. A queda do pH coincide com a produção mais acentuada de ácido butírico que aconteceu, também, em 16 horas de fermentação. Nota-se que o início da produção de butanol ocorreu em 16 horas, quando o pH atingiu seu valor mínimo. No entanto, observou-se que a célula se encontrava na fase de aceleração do crescimento, contrariando o proposto por Branska et al. (2018), conforme discutido anteriormente. Isso pode ser devido a diferente composição do meio de cultivo. As inferências feitas por Branska et al. (2018) foram relativas ao meio de cultivo TYA, de composição diferente do meio de cultivo utilizado no presente ensaio.

Contudo, Patakova et al. (2011) também observou que a produção de butanol ocorreu concomitante ao crescimento celular, sendo a produtividade volumétrica maior durante a fase exponencial de crescimento. A concentração máxima de butanol obtida foi de 7,3  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  em 32 horas de fermentação revelando, por consequência, uma produtividade de 0,23  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . A partir desse período a concentração de butanol se manteve constante.

Figura 40. Perfil cinético da cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo de composição descrita por Patakova et al. (2011) (Ensaio 1). A linha vertical indica o tempo no qual a concentração de butanol foi máxima.



No presente estudo, a concentração máxima de butanol foi cerca de 8,4  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  obtida em 44 horas de fermentação. A produtividade volumétrica no tempo de concentração máxima foi, portanto, 0,21  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , bastante próximo ao valor obtido por Patakova et al. (2011). Notou-se que a fase estacionária de crescimento se deu entre 16 e 26 horas de fermentação e a taxa de crescimento específico máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) foi de 0,10  $\text{h}^{-1}$ .

Durante a fase de crescimento exponencial, a produtividade volumétrica de butanol foi  $0,40 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , enquanto durante a fase estacionária o valor obtido foi  $0,16 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Isso mostra que a taxa de produção de butanol foi maior durante a fase de crescimento da célula. O rendimento em produto obtido foi de  $0,21 \text{ g}_{\text{butanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ .

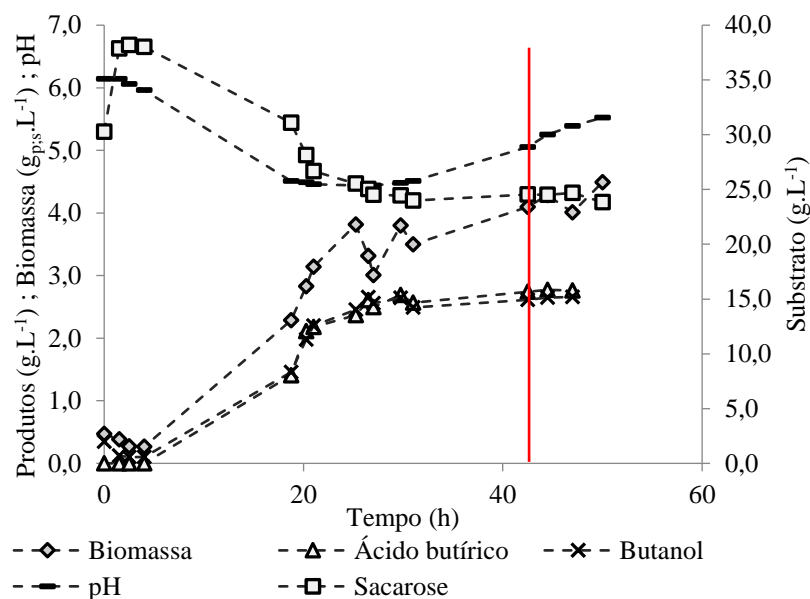
### 5.5.2 Ensaio 2

A Figura 41 mostra os resultados obtidos na fermentação de sacarose proveniente do melado nas mesmas condições do Ensaio 1. É possível observar que o substrato não foi completamente consumido, como visto anteriormente. O consumo total de sacarose foi  $14,22 \text{ g.L}^{-1}$  e a produção de butanol foi de  $2,61 \text{ g.L}^{-1}$ , atingindo seu valor máximo em 45 horas de fermentação. Nesse mesmo tempo, a concentração de biomassa celular foi de  $4,28 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$ . A produção de ácido butírico foi similar a produção de butanol e, apresentou concentração máxima de  $2,74 \text{ g.L}^{-1}$ , no mesmo período de fermentação. A queda de pH foi acentuada, chegando a 4,7 em 27 horas de fermentação, coincidindo com a maior produção de ácido butírico. Não foi observada produção de ácido acético nesse ensaio.

Em comparação com o ensaio anterior, tanto a produção de butanol como o crescimento celular foram menores, mostrando que a glicose é substrato preferencial para essa célula. De fato, para que haja metabolização da sacarose é necessário expressar invertase extracelular para que esse dissacarídeo seja quebrado em glicose e frutose e, então, esses monossacarídeos podem ser internalizados. Isso adiciona uma etapa enzimática a fermentação da sacarose, tornando o uso desse substrato mais dispendioso energeticamente para a célula.

Ainda, notou-se que a produção de butanol não foi priorizada em relação a produção de ácido butírico como observado no ensaio anterior. A produção de ácido e a consequente queda de pH, coincide com a diminuição na assimilação do substrato. Em 27 horas de fermentação, quando o pH apresenta seu valor mínimo, a taxa de consumo de substrato é praticamente zero. Isso pode ser devido ao fato de que o pH do meio está fora da faixa de trabalho da enzima invertase. Looten et al. (1987) caracterizaram a invertase de uma estirpe de *C. acetobutylicum* cuja faixa de pH ótimo é de 5,0 a 6,5, sendo que em pH 5,0 a atividade obtida foi de 35% da atividade máxima.

Figura 41. Perfil cinético da cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e de composição descrita por Patakova et al. (2011) (Ensaio 2). A linha vertical indica o tempo no qual a concentração de butanol foi máxima.



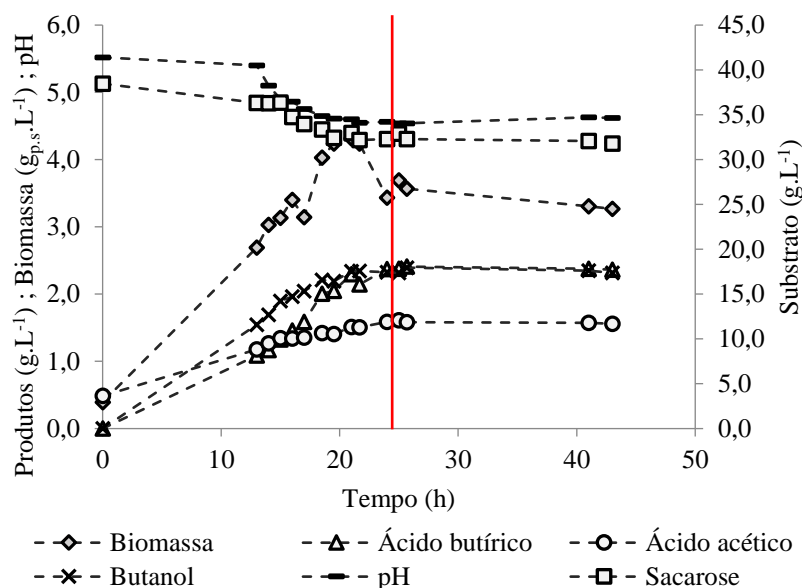
Considerando os pontos de amostragem desse ensaio, observou-se que a fase exponencial de crescimento ocorreu entre 4 e 21 horas, atingindo um  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,14 \text{ h}^{-1}$ , próximo ao observado no ensaio anterior. A produtividade em butanol durante a fase estacionária foi de  $0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , enquanto a produtividade observada no tempo de concentração máxima de butanol (42 horas) foi de  $0,06 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Mais uma vez, observa-se que a taxa de produção de butanol é maior durante a fase de crescimento exponencial. No entanto, a produtividade obtida neste ensaio foi menor do que a obtida no ensaio anterior. Além disso, o rendimento em produto também foi menor e o valor obtido foi de  $0,16 \text{ g}_{\text{butanol}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ .

### 5.5.3 Ensaio 3

A Figura 42 mostra os resultados obtidos na fermentação de sacarose proveniente do melado em meio de cultivo contendo  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de milhocina como única fonte de nutriente. É possível observar, novamente, que o substrato não foi completamente consumido. O consumo total de sacarose foi de  $5,50 \text{ g.L}^{-1}$ , ainda menor que o consumo observado no Ensaio 2. O pH atingiu seu menor valor 4,5 em 22 horas de fermentação e, mais uma vez, o perfil de queda do pH acompanhou a diminuição da taxa de consumo de substrato indicando uma possível correlação entre esses parâmetros.



Figura 42. Perfil cinético da cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milhoцина (Ensaio 3). A linha vertical indica o tempo no qual a concentração de butanol foi máxima.



Em 25,7 horas de fermentação a concentração de butanol foi  $2,39 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto a concentração de ácido butírico e ácido acético foi  $2,41$  e  $1,59 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. A produtividade obtida foi de  $0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Para o mesmo período, o rendimento em produto obtido foi de  $0,39 \text{ g}_{\text{butanol}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ , consideravelmente maior que os rendimentos obtidos nos ensaios anteriores. Portanto, embora a célula não tenha assimilado toda fonte de carbono presente no meio de cultivo, a conversão do substrato em produto de interesse foi bastante efetiva. Como o consumo de substrato foi menor nesse ensaio e, a produção de butanol foi similar, a célula direcionou o fluxo de carbono proveniente da metabolização do substrato para produção do butanol. Em 22 horas de fermentação a célula já se encontrava em fase estacionária e apresentou concentração de aproximadamente  $4,3 \text{ g}_{\text{p.s.}}\text{L}^{-1}$ , valor similar ao observado no Ensaio 2. Vale salientar que a amostragem desse ensaio não permitiu acompanhar com precisão a fase estacionária de crescimento da célula.

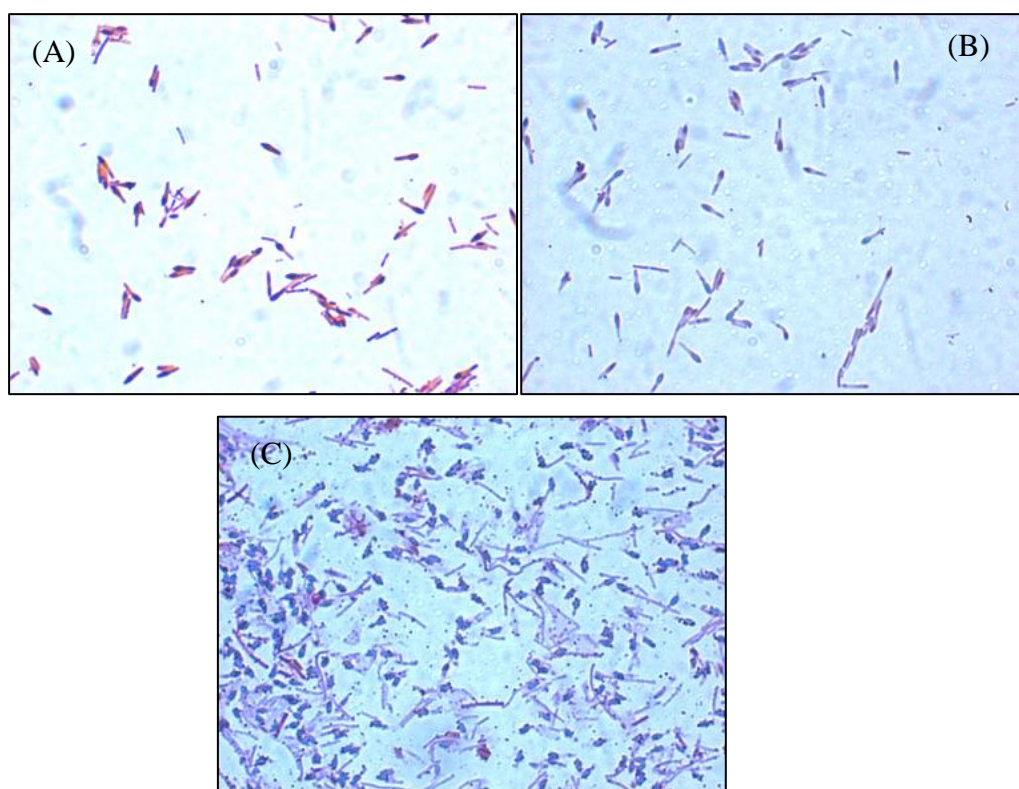
Wechgama et al. (2017) estudaram a utilização de melaço como fonte de substrato na fermentação ABE com *C. beijerinckii* TISTR 1461. Ao utilizar apenas o melaço como meio de cultivo, os autores obtiveram uma concentração de  $7,45 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol e produtividade de  $0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , mostrando que o melaço utilizado já provia os nutrientes necessários ao metabolismo celular. Também foi analisado a adição de extrato de levedura, como fonte complementar de nutrientes e, obtiveram  $10,25 \text{ g.L}^{-1}$  de butanol e

uma produtividade de  $0,21 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . As concentrações finais de butanol obtidas pelos autores foi consideravelmente maior do que a obtida no presente trabalho. No entanto, a composição do melado, que é uma matéria-prima proveniente da cana-de-açúcar, depende diretamente de fatores ambientais não previsíveis e cada lote possui características singulares. Além disso, a estirpe utilizada por Wechgama et al. (2017) não foi a mesma que a utilizada no presente trabalho, embora pertençam a mesma espécie.

Os resultados obtidos no Ensaio 3 não foram equiparáveis aos encontrados na literatura. No entanto, diferentes estratégias de condução do processo fermentativos podem causar o aumento da produção de butanol, como por exemplo controle de pH e condução do processo em batelada alimentada.

A Figura 43 mostra as imagens microscópicas de determinados tempos de amostragem do Ensaio 3. É possível observar que em 13 e 15 horas de fermentação (Figura 43A e 43B, respectivamente) a morfologia da população é bastante similar e a maior parte da população se encontra em estágio clostridial com os endósporos subterminais bem marcados. Nos períodos indicados a célula ainda está produzindo butanol e ácidos orgânicos e, portanto, ainda se encontra metabolicamente ativa. Mais uma vez, a prevalência do estado clostridial está correlacionada a produção de butanol.

Figura 43. Micrografias do centrifugado celular de *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milho-cina em diferentes tempos de fermentação: (A) 13 horas; (B) 15 horas e (C) 41 horas.



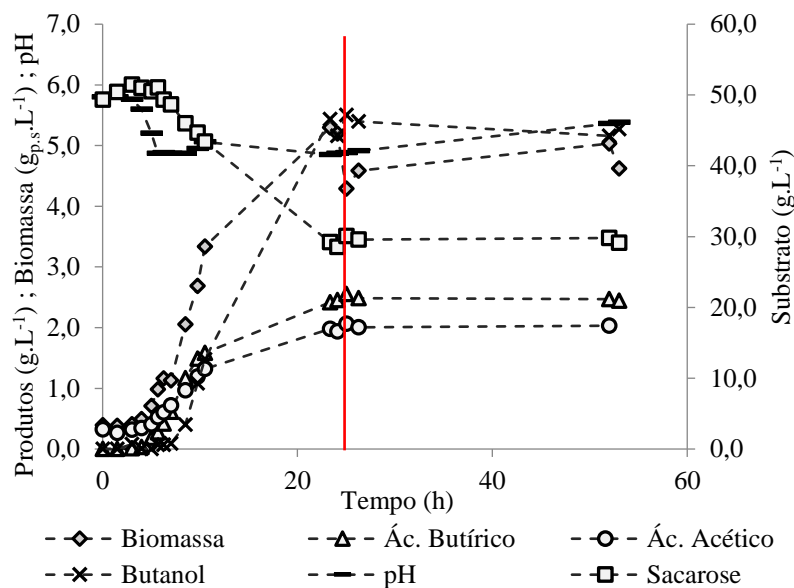
A Figura 43C representa a morfologia celular observada em 41 horas de fermentação. As células foram coradas pelo método de Wirtz-Conklin, para visualização de esporos (corados em verde). É possível observar elevada predominância de esporos no centrifugado celular, que correspondem a células metabolicamente inativas. Em contrapartida, visualiza-se poucas células em seu estágio vegetativo, ou seja, maiores em comprimento e de menor espessura. Como visto na Figura 42, em 41 horas de fermentação a biomassa celular já havia apresentado decréscimo, provavelmente em decorrência da lise celular e liberação dos endósporos, em concordância com o observado na Figura 43C.

#### **5.5.4 Ensaio 4**

A Figura 44 mostra os resultados obtidos para experimento nas mesmas condições do ensaio anterior com pH sendo controlado em 5,0. O pH foi ajustado a 6,5 antes do inóculo e, após atingir pH menor ou igual a 5,0 a malha de controle foi ativada.

É possível observar que o consumo total de sacarose foi  $20,17 \text{ g.L}^{-1}$ , resultando em uma concentração residual de aproximadamente  $30 \text{ g.L}^{-1}$ . Em 23 horas de fermentação a concentração de butanol foi máxima, apresentando valor de  $5,4 \text{ g.L}^{-1}$ . É possível observar que nesse período a célula já se encontrava na fase estacionária de crescimento e a biomassa celular observado foi de  $5,3 \text{ g}_{p.s}.\text{L}^{-1}$ . A fase exponencial de crescimento foi observada entre 3 e 10,5 horas de fermentação. A taxa de crescimento específico máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) foi de  $0,28 \text{ h}^{-1}$ . Observou-se, ainda, que a concentração atingida em biomassa foi equivalente a concentração do Ensaio 1.

Figura 44. Perfil cinético da cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milho-cina (Ensaio 4). A linha vertical indica o tempo no qual a concentração de butanol foi máxima



Entre 10,5 e 23 horas de fermentação não foi realizada amostragem, no entanto, a maior taxa de produção de butanol provavelmente ocorreu nesse período, visto que a produtividade na fase exponencial foi  $0,19 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  enquanto a produtividade no tempo de concentração máxima foi de  $0,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Ainda em 23 horas, a concentração de ácido butírico e acético foi de  $2,42 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,98 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Nota-se que a produção de butanol e dos ácidos ocorreu concomitante ao crescimento exponencial. O rendimento em produto foi de  $0,27 \text{ g}_{\text{butanol}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ .

Ao comparar o Ensaio 4 com o Ensaio 3, verifica-se que o controle de pH em 5,0 permitiu o maior consumo de substrato, bem como maior produção de butanol. Consequentemente, a produtividade obtida no Ensaio 4 foi mais satisfatória, indicando que o controle de pH é uma ferramenta eficaz para melhorar a produtividade do processo.

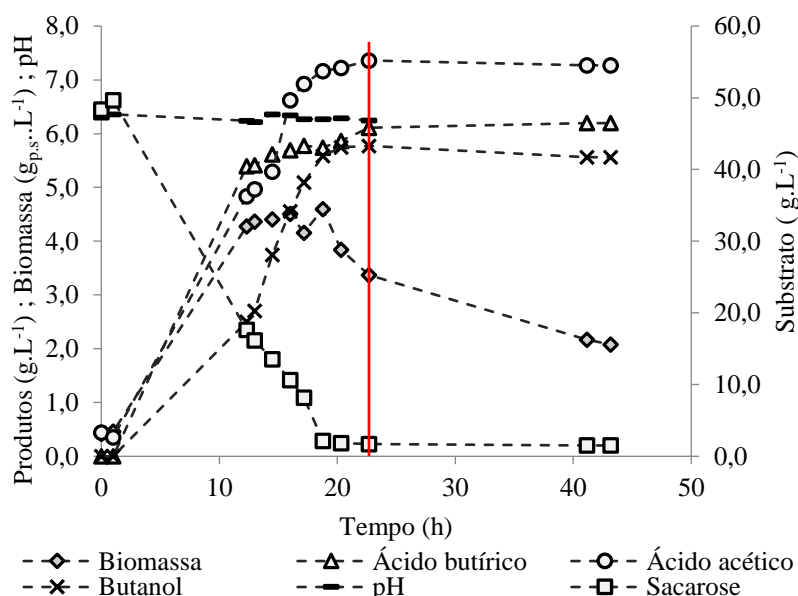
### 5.5.5 Ensaio 5

A Figura 45 mostra os resultados obtidos para experimento com pH sendo controlado em 6,0. É possível observar que nessa condição o substrato foi praticamente todo consumido em 19 horas de fermentação. Ainda em 19 horas, foi observada a concentração celular máxima de  $4,60 \text{ g}_{\text{p.s.}}.\text{L}^{-1}$ . A amostragem realizada nesse experimento não permitiu acompanhar a fase exponencial de crescimento. Em 12 horas de fermentação a célula já se encontrava ao final da fase exponencial. Nota-se que ao atingir concentração de biomassa máxima a célula não entrou na fase estacionária de crescimento e, sim em fase de morte.

As concentrações de butanol, ácido butírico e ácido acético foram máximas em aproximadamente 23 horas de fermentação, alcançando os valores de  $5,77 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $6,11 \text{ g.L}^{-1}$  e  $7,36 \text{ g.L}^{-1}$ . A produção de ácidos foi muito superior aos ensaios anteriores, sendo inclusive maior do que a produção de butanol. Isso indica que ao manter o pH próximo a 6,0 a célula tende a estimular a produção de ácidos.

Branska et al. (2018), em seus experimentos, mostraram que o acúmulo de ácidos carboxílicos e solventes causam um efeito combinado negativo no equilíbrio da membrana celular e no balanço energético da célula. Esse efeito combinado causa o colapso das funções celulares. Os autores demonstraram que a concentração de butanol, até  $5 \text{ g.L}^{-1}$ , representa menor impacto na viabilidade celular que a presença de ácidos. No entanto, o acúmulo dos ácidos butírico e acético e o baixo pH, podem aumentar o efeito tóxico do butanol.

Figura 45. Perfil cinético da cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 em meio de cultivo contendo melado e milho-cina (Ensaio 5). A linha vertical delimita o tempo no qual a concentração de butanol foi máxima.



No Ensaio 5, possivelmente o acúmulo dos ácidos orgânicos estimularam a esporulação e a produção de autolisinas. Jones e Woods (1986) mencionaram o fato de que mesmo quando o crescimento celular cessa, provocado por estresse no meio extracelular, os valores de D.O. e peso seco de célula podem continuar aumentando devido ao acúmulo de granulose e as mudanças na morfologia celular. Portanto, ao esgotar a fonte de carbono do meio de cultivo a população celular que se encontrava em estágio clostridial passou a sofrer lise celular provocada por enzimas chamadas autolisinas, em concordância com a diminuição da concentração de biomassa observada.

Por outro lado, o consumo de sacarose foi praticamente total, diferentemente do observado nos outros ensaios. Esse fato corrobora com a hipótese do consumo estar relacionado ao pH do meio extracelular, visto que o pH ótimo da enzima invertase caracterizada por LOOTEN et al. (1987) foi 5,9. Dessa forma, ao controlar o pH próximo a 6,0 a enzima invertase estaria apresentando seu máximo de atividade, permitindo o consumo completo de sacarose do meio de cultivo.

A produtividade volumétrica de butanol observada foi de  $0,28 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , enquanto o rendimento foi de  $0,12 \text{ g}_{\text{butanol}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ . Embora a produtividade obtida tenha sido a maior observada no presente trabalho, o rendimento em butanol foi baixo, em comparação com os outros ensaios. No entanto, o consumo completo de substrato é uma vantagem ao avaliar o custo do processo de *downstream*. Parâmetros cinéticos dos ensaios em biorreator

A Tabela 13 compara os resultados obtidos nos ensaios em biorreator. A maior concentração de butanol obtida foi no Ensaio 1. Visto que a glicose é a fonte de carbono mais facilmente assimilada espécie *C. beijerinckii*, é esperado que o experimento contendo essa fonte de carbono seja o que apresente melhor resultado, uma vez que a sacarose é um substrato mais complexo de ser metabolizado e depende de uma etapa adicional de hidrólise.

Os ensaios em batelada simples sem controle de pH, utilizando melado como fonte de substrato, apresentaram menor produção de butanol e menores produtividades quando comparados com os ensaios em que houve controle de pH. Interessante ressaltar que o Ensaio 3, em que o meio de cultivo contém  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de milhocina e sacarose proveniente do melado, apresentou produtividade similar a observada nos experimentos em frascos agitados com mesma composição de meio. Isso mostra que, mesmo com o aumento do volume reacional a célula manteve seu perfil de produção de butanol, quando o processo foi conduzido em batelada simples sem controle de pH.

Os ensaios nos quais o pH foi controlado apresentaram as maiores produtividades dentre os experimentos utilizando melado. Especificamente quando o controle de pH foi 6,0, a produtividade foi a máxima obtida no presente trabalho. Esses resultados mostram que o pH é um parâmetro muito importante para a produção de butanol por fermentação ABE. O fato de o pH não ter atingindo valor mínimo menor que 5,0, nesses ensaios mostra que o *breakpoint* foi evitado e a célula produziu butanol a uma taxa considerável.

Tabela 13. Comparação entre os parâmetros cinéticos calculados a partir dos resultados obtidos nos ensaios em biorreator.  $C_{m\acute{a}x}$  é a concentração máxima de butanol obtida no tempo  $t$ ,  $Q_{p\acute{m}a}x$  é a produtividade máxima em butanol obtida no tempo  $t$  e  $Y_{p/s}$  é o rendimento de substrato em butanol

Ensaio	pH	t (h)	$C_{m\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Q_{p\acute{m}a}x$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Y_{p/s}$ (gbutanol/g <sub>sacarose</sub> )
1	sem controle	44	8,47	0,21	0,21
2	sem controle	42	2,61	0,06	0,16
3	sem controle	26	2,39	0,11	0,39
4	5,0	23	5,43	0,23	0,27
5	6,0	22	5,77	0,28	0,12

Li et al. (2013) utilizaram uma espécie selvagem de *C. beijerinckii* em meio de cultivo contendo melação pré-tratado com 60 g.L<sup>-1</sup> em açúcares totais, extrato de levedura e ácido esteárico. A concentração máxima de butanol obtida foi de 11,2 g.L<sup>-1</sup> e a produtividade de 0,18 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Nota-se que, embora a concentração de butanol tenha sido o dobro da obtida no presente trabalho, a produtividade obtida pelos autores foi menor do que a obtida no Ensaio 5. Além disso, a matéria-prima utilizada pelos autores passou por pré-tratamento, aumentando o custo geral do processo. Ainda, o extrato de levedura utilizado como fonte de nitrogênio é consideravelmente mais caro que a milhocina. Em vista disso, o presente estudo mostra uma alternativa mais barata ao meio de cultivo para a produção de butanol via fermentação ABE por *Clostridium beijerinckii*.

## 5.6 Análise final dos resultados

A Tabela 14 resume as etapas realizadas, com a cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598, no presente trabalho e seus respectivos resultados em termos de concentração de butanol ( $C_{butanol}$ ), produtividade em butanol ( $Q_{butanol}$ ) e tempo de fermentação equivalente ( $t$ ). A sacarose se mostrou uma boa alternativa de substrato fermentável e, por isso, optou-se por utilizar o melado de cana de açúcar como matéria-prima para as etapas seguintes. Ao analisar o pH inicial ajustado verificou-se que o pH ajustado em 6,5 apresentou a melhor produtividade dentre as condições estudadas sendo, portanto, o pH inicial ajustado escolhido para os experimentos subsequentes. Ainda, concluiu-se que o pré-inóculo em fase estacionária de crescimento resulta em melhor produtividade em butanol.

Estudando a influência da concentração inicial de substrato na produção de butanol observou-se que ao aumentar a concentração inicial de sacarose aumenta-se a

produção de butanol. No entanto, a produtividade máxima permanece similar em todas as condições.

Dos ensaios em biorreator, a condição com controle de pH 6,0 foi a que apresentou melhor resultado de produtividade dentre as condições que continham melado como matéria-prima fonte de substrato. A produtividade em butanol obtida neste ensaio foi, ainda, a maior observada em todo o presente trabalho.



Tabela 14. Resultados obtidos para a cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 em cada etapa realizada no presente trabalho

Etapa	Condição		C <sub>butanol</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	t* (h)	Q <sub>butanol</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	
Seleção substrato e meio de cultivo	Lactose	Meio Yadav et al.	0,36	72	0,00	
		Milhocina	0,23	150	0,00	
	Sacarose	Meio Yadav et al.	1,86	24	0,06	
		<b>Milhocina</b>	<b>2,17</b>	<b>24</b>	<b>0,09</b>	
pH inicial ajustado	5,6		2,46	48	0,05	
	<b>6,5</b>		<b>3,55</b>	<b>24</b>	<b>0,10</b>	
	7,3		3,88	48	0,07	
	8,5		0,17	24	0,00	
Idade do pré-inóculo	Fase de aceleração do crescimento exponencial		1,39	24	0,06	
	Fase exponencial de crescimento		2,10	24	0,09	
	Fase de desaceleração do crescimento exponencial		2,04	24	0,08	
	Fase estacionária		<b>2,72</b>	<b>24</b>	<b>0,11</b>	
Concentração inicial de sacarose	10 g.L <sup>-1</sup>		2,53	24	0,11	
	18 g.L <sup>-1</sup>		3,35	24	0,10	
	26 g.L <sup>-1</sup>		4,62	48	0,10	
	76 g.L <sup>-1</sup>		4,62	48	0,10	
Biorreator	sem controle de pH	Meio Patakova et al.	Glicose	8,47	44	0,21
			Melado	2,61	42	0,06
	com controle de pH	Milhocina	Melado	2,39	26	0,11
		Milhocina/Melado	pH 5,0	5,43	23	0,23
	Milhocina/Melado	pH 6,0	<b>5,77</b>	<b>22</b>	<b>0,28</b>	

\*tempo em que foi alcançada a produtividade máxima

A Tabela 15 compara os resultados obtidos no presente trabalho com os resultados da literatura para cepas de *Clostridia* solventogênica. A maior produtividade observada no estado da arte utilizando sacarose como substrato foi de 0,52 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> obtida por Sandoval-Espinola (2013) que utilizou a cepa *C. beijerinckii* NCIMB 8052. Dentre os resultados observados quando o melaço é utilizado como fonte de substrato, Ni et al. (2012) obtiveram uma produtividade em butanol de 0,33 g.L<sup>-1</sup> ao utilizar uma cepa de *C. saccharobutylicum* DSM 13864. Embora na literatura as concentrações em butanol

alcançadas sejam maiores que a maior concentração obtida no presente trabalho, a produtividade aqui obtida foi de 0,28 g.L<sup>-1</sup>, sendo comparável com as produtividades expostas na Tabela 16. Isso torna os resultados obtidos para a cepa *C. beijerinckii* NRRL B-598 promissores para estabelecer uma alternativa biotecnológica para a produção de butanol.

Tabela 15. Comparação entre os resultados de concentração e produtividade em butanol obtidos no presente trabalho e diversas cepas de *Clostridia* solventogênica.

Matéria-prima	Microrganismo	C <sub>butanol</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Q <sub>butanol</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Referência
Sacarose	<i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	14,8	0,52	Sandoval-Espinola, (2013)
	<i>C. beijerinckii</i> SA1 (mutação adaptativa)	10,33	0,2	Sandoval-Espinola, (2013)
	<i>C. tirobutyricum</i> (geneticamente modificada)	16,00	0,33	Zhang et al. (2017)
	<i>C. acetobutylicum</i> JB 200 (mutação adaptativa)	15,00	0,25	Jiang et al. (2014)
	<i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598	3,36	0,09	Este trabalho
Caldo de cana de açúcar	<i>C. tirobutyricum</i> (geneticamente modificada)	15,00	0,3	Zhang et al. (2017)
	<i>C. acetobutylicum</i> JB 200 (mutação adaptativa)	18,5	0,26	Jiang et al. (2014)
	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	14,00	0,11*	Kittithanesuan e Phisalaphong (2015)
Melaço	<i>C. saccharobutylicum</i> DSM 13864	11,86	0,33	Ni et al. (2012)
	<i>C. beijerinckii</i> TISTR 1462	12,55	0,26	Wechgama et al. (2017)
	<i>C. beijerinckii</i> MUT3 (mutação adaptativa)	15,10	0,21*	Li et al. (2013)
	<i>C. beijerinckii</i> L175	11,20	0,16*	Li et al. (2013)
	<i>C. beijerinckii optinoii</i>	7,57	0,15*	Moon et al. (2015)
	<i>C. beijerinckii</i> NRRL B-598	5,77	0,28	Este trabalho

\*produtividade calculada baseadas nos resultados apresentados

## 6 CONCLUSÕES

Dentre as cepas estudadas, a bactéria *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 apresentou maior capacidade de produzir butanol a partir de sacarose. A utilização de milhocina na concentração de 25 g.L<sup>-1</sup>, como fonte de nutrientes e, de melão e melado de cana-de-açúcar, como matéria-prima fonte de sacarose, se mostraram viáveis para a fermentação ABE utilizando essa estirpe.

Ao analisar os parâmetros iniciais como pH inicial ajustado, concentração de substrato e idade do pré-inóculo estabeleceu-se que o pH inicial do meio de cultivo ajustado em 6,5 e o pré-inóculo em fase estacionária de crescimento permitem maior produtividade em butanol. Adicionalmente, concluiu-se que maior concentração inicial de sacarose proveniente do melado estudada (76 g.L<sup>-1</sup>) favorece a produção de butanol devido ao maior consumo do substrato.

No estudo de tolerância a presença de butanol concluiu-se que a célula de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 é capaz de se adaptar e produzir butanol em concentrações iniciais de até 5,5 g.L<sup>-1</sup> desse solvente. Em concentrações iniciais de butanol de 7 g.L<sup>-1</sup> o metabolismo celular é reduzido e o consumo de substrato, bem como o crescimento celular são prejudicados.

Os ensaios em biorreator mostraram que o controle de pH no processo fermentativo tem bastante influência na produção de butanol e consumo de substrato. A maior produtividade em butanol obtida foi de 0,28 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> em batelada simples com controle de pH 6,0, obtendo 5,77 g.L<sup>-1</sup> de butanol, em meio de cultivo contendo apenas milhocina como fonte de nutrientes e melado como fonte de substrato. Considerando que o meio de cultivo é composto de coprodutos da agroindústria, ou seja, componentes de baixo valor agregado e que a bactéria utilizada é uma cepa selvagem, sem melhoramentos genéticos, os resultados se mostram promissores como uma alternativa para a produção biotecnológica de butanol.

## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Realizar batelada alimentada iniciando a alimentação durante a fase exponencial de crescimento;
- Avaliar a utilização de melação de cana de açúcar como fonte de substrato, na melhor estratégia estabelecida de condução de processo;
- Estudar a morfologia celular utilizando ferramentas de processamento digital de imagem;
- Relacionar a predominância de estágios de morfologia celular com a produção de butanol, por meio de desenvolvimento de modelo matemático;
- Estudar a recuperação de produtos *in situ* como forma de diminuir seus efeitos tóxicos e aumentar a produtividade do processo.

## 8 BIBLIOGRAFIA

ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias de Milho. 2018. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 15 de setembro de 2018.

ACHARYA, B.; DUTTA, A.; BASU, P. Ethanol production by syngas fermentation in a continuous stirred tank bioreactor using *Clostridium ljungdahlii*. **Biofuels**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 221–237, 2019.

AL-HINAI, M. A.; JONES, S. W.; PAPOUTSAKIS, E. T. The *Clostridium* Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 1, p. 19–37, 2015.

ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*: Culture stability and low-grade glycerol utilisation. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 2, p. 121–125, 2003.

BERGEY, D. H. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 3: The Firmicutes**, 2009.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*--batch and continuous culture studies. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18–26, 2001.

BRANSKA, B. et al. Flow cytometry analysis of *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 populations exhibiting different phenotypes induced by changes in cultivation conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2018.

CARDOSO, W. S. et al. **Indústria do Milho**, 2010.

COMEXSTAT. Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. Governo Federal. 2018. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>>. Acesso em 16 de setembro de 2018.

DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1233–1239, 1992.

DOBSON, R.; GRAY, V.; RUMBOLD, K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 217–226, 2012.

DOS SANTOS, M. F. R. F. **Elaboração do Technology Roadmap para Biorrefinaria de Produtos da Lignina no Brasil**. 2011. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

DÜRRE, P. Biobutanol : An attractive biofuel. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1525–1534, 2007.

DÜRRE, P. Physiology and Sporulation in *Clostridium*. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 4, p. TBS-0010-2012, 2014.

ELEKEIROZ. Elekeiroz S.A. 2018. Disponível em: <<https://www.elekeiroz.com.br>>. Acesso em 15 de setembro de 2018.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS. 2019. Disponível em <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_102\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_102_22122006154841.html)>. Acesso em 19 de janeiro de 2019

GARCÍA, V. et al. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 2, p. 964–980, 2011.

GHESHLAGHI, R. et al. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 764–781, 2009.

GREEN, E. M. Fermentative production of butanol-the industrial perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 337–343, 2011.

HAMERSKI, F. **Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar caldo de cana-de-açúcar**. 2009. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2009.

HARRIS, L. M.; WELKER, N. E.; PAPOUTSAKIS, E. T. Northern , Morphological , and Fermentation Analysis of spo0A Inactivation and Overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, v. 184, n. 13, p. 3586–3597, 2002.

IKRAM-UL, H.; ALI, S. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses, v. 93, p. 125–130, 2004.

JIANG, L. et al. Bioresource Technology Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3403–3409, 2009.

JIANG, W. et al. Stable high-titer n-butanol production from sucrose and sugarcane juice by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in repeated batch fermentations. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 172–179, 2014.

JIN, C. et al. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 8, p. 4080–4106, 2011.

JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-butanol fermentation revisited. **Microbiological reviews**, v. 50, n. 4, p. 484–524, 1986.

KAUSHAL, M. et al. Substrate dependent modulation of butanol to ethanol ratio in non-acetone forming *Clostridium sporogenes* NCIM 2918. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 349–358, 2017.

KIM, B. H.; GADD, G. M. **Bacterial Physiology and Metabolism**. [s.l.] : Cambridge University Press, 2008.

KITTITHANESUAN, N.; PHISALAPHONG, M. Enhanced acetone-butanol production from sugarcane juice by immobilized *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) on thin-shell silk cocoons. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 3, p. 599–607, 2015.

KOLEK, J. et al. Changes in membrane plasmalogens of *Clostridium pasteurianum* during butanol fermentation as determined by lipidomic analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2015.

- KÖPKE, M.; DÜRRE, P. **Biochemical production of biobutanol**. Woodhead Publishing Limited, 2011.
- KRASŇAN, V. et al. Intensified crude glycerol conversion to butanol by immobilized *Clostridium pasteurianum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 134, p. 114–119, 2018.
- LEE, S. H. et al. Biomass, strain engineering, and fermentation processes for butanol production by solventogenic clostridia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 19, p. 8255–8271, 2016.
- LEE, S. Y. et al. Fermentative butanol production by clostridia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 209–228, 2008.
- LI, H. G. et al. Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined low-energy ion beam implantation and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine induction. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 254–260, 2013.
- LI, S. Y. et al. Bioreactors and in situ product recovery techniques for acetone-butanol-ethanol fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 13, p. 1–7, 2016.
- LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriological reviews**, v. 12, n. 4, p. 297–311, 1998.
- LIPOVSKY, J. et al. Butanol production by *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 in continuous culture compared to batch and fed-batch systems. **Fuel Processing Technology**, v. 144, p. 139–144, 2016.
- LIU, X. et al. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using corn steep liquor as a source of organic nitrogen and vitamins. **Industrial Crops & Products**, v. 78, p. 154–160, 2015.
- LOOTEN, P.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE, J. P. The b-fructofuranosidase activities of a strain of *Clostridium acetobutylicum* grown on inulin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 419–425, 1987.
- MACHADO, S. S. **Tecnologia da Fabricação do Açúcar**. 2012. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, 2012.
- MAITI, S. et al. A re-look at the biochemical strategies to enhance butanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 94, p. 187–200, 2016.
- MANSUR, M. C. et al. ABE fermentation of sugar in Brazil. **Pumps**, 2010.
- MASCAL, M. Chemicals from biobutanol: technologies and markets. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 483–493, 2012.
- MEZAROBA, S.; MENEGUETTI, C. C.; GROFF, A. Ma. Processos de produção do açúcar de cana e os possíveis reaproveitamentos dos subprodutos e resíduos resultantes do sistema, v. 1, p. 1–10, 2010.
- MILLAT, T.; WINZER, K. Mathematical modelling of clostridial acetone-butanol-ethanol fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2251–2271, 2017.

MOON, H. G. et al. One hundred years of clostridial butanol fermentation. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 3, 2016.

MOON, Y. H. et al. Enhanced production of butanol and isopropanol from sugarcane molasses using *Clostridium beijerinckii* optinoii. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 5, p. 871–877, 2015.

NATALENSE, J.; ZOUAIN, D. Technology roadmapping for renewable fuels: Case of biobutanol in Brazil. **Journal of Technology Management and Innovation**, v. 8, n. 4, p. 143–152, 2013.

NI, Y.; WANG, Y.; SUN, Z. Butanol production from cane molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: Batch and semicontinuous fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 8, p. 1896–1907, 2012.

OXITENO. Oxiteno S/A. 2018. Disponível em: <<http://www.oxiteno.com.br/agroquimicos/>>. Acesso em: 15 de setembro de 2018.

PAREKH, M.; FORMANEK, J.; BLASCHEK, H. P. Development of a cost-effective glucose-corn steep medium for production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 4–5, p. 187–191, 1998.

PATAKOVA, P. et al. Continuous production of butanol by bacteria of genus *Clostridium*. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 5, p. 121–128, 2011. a.

PATAKOVA, P. et al. Perspectives of Biobutanol Production and Use. **Biofuel's Engineering Process Technology**, p. 243–266, 2011. b.

PATAKOVA, P. et al. Novel and neglected issues of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by clostridia: *Clostridium* metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 1, p. 58–67, 2013.

PATAKOVA, P. et al. Comparative analysis of high butanol tolerance and production in clostridia. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 3, p. 721–738, 2018.

PUBCHEM. U.S National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 de setembro de 2018

QURESHI, N.; MADDOX, I. S. Reduction in butanol inhibition by perstraction: Utilization of concentrated lactose/whey permeate by *Clostridium acetobutylicum* to enhance butanol fermentation economics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 83, n. 1 C, p. 43–52, 2005.

RESEARCHANDMARKETS. 2018. Disponível em < <https://www.researchandmarkets.com/reports/4576459/global-n-butanol-market-analysis-and-trends>>. Acesso em: 16 de setembro.

RIBEIRO, L. C. P. Produção de butanol por *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 Projeto Final de Curso, 2016.

SAAB, V. da S. MINIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE



1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICERINA BRUTA POR *Clostridium butyricum*, 2016.

SANDOVAL-ESPINOLA, W. J. Butanol from sweet sorghum juice by *Clostridium beijerinckii* SA-1 / ATCC 35702, a butanol hyper-producing strain, p. 78, 2013.

SAXENA, J.; TANNER, R. S. Optimization of a corn steep medium for production of ethanol from synthesis gas fermentation by *Clostridium ragsdalei*, p. 1553–1561, 2012.

SEDLAR, K. et al. Reclassification of non-type strain *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 as *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598. **Journal of Biotechnology**, v. 244, p. 1–3, 2017.

SHARMA, A.; VIVEKANAND, V.; SINGH, R. P. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support, v. 99, p. 3444–3450, 2008.

SHENG, Y. et al. Optimization of culture conditions for enhanced butanol production by a high butanol tolerant *Clostridium beijerinckii* F-6. **Energy Procedia**, v. 158, p. 471–476, 2019.

SREEKUMAR, S. et al. Production of an acetone-butanol-ethanol mixture from *Clostridium acetobutylicum* and its conversion to high-value biofuels. **Nature Protocols**, v. 10, n. 3, p. 528–537, 2015.

SWANA, J. et al. An analysis of net energy production and feedstock availability for biobutanol and bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 2112–2117, 2011.

TACONI, K. A.; VENKATARAMANAN, K. P.; JOHNSON, D. T. Growth and Solvent Production by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 Utilizing Biodiesel-Derived Crude Glycerol as the Sole Carbon Source. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 28, n. 1, p. 100–110, 2009.

TRACY, B. P. et al. Clostridia: The importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 364–381, 2012.

VAN DER MERWE, A. B. Evaluation of Different Process Designs for Biobutanol Production from Sugarcane Molasses, n. March, p. 159, 2010.

VENKATARAMANAN, K. P. et al. Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1325–1335, 2012.

VISIOLI, L. J. et al. Evaluation of biobutanol production by *Clostridium beijerinckii* NRRL B-592 using sweet sorghum as carbon source. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1707–1712, 2015.

VUOLO, J. H. **Fundamentos da Teoria de Erros**, 1996.

WECHGAMA, K.; LAOPAIBOON, L.; LAOPAIBOON, P. Enhancement of batch butanol production from sugarcane molasses using nitrogen supplementation integrated with gas stripping for product recovery. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 216–226, 2017.

WISCHRAL, D. et al. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 100–110, 2016.

YADAV, S. et al. A novel approach for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum* using glycerol: A low cost substrate. **Renewable Energy**, v. 71, p. 37–42, 2014.

ZHANG, J. et al. n-Butanol production from sucrose and sugarcane juice by engineered *Clostridium tyrobutyricum* overexpressing sucrose catabolism genes and adhE2. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 51–57, 2017.

ZHANG, J.; JIA, B. Enhanced butanol production using *Clostridium beijerinckii* SE-2 from the waste of corn processing. **Biomass and Bioenergy**, v. 115, n. May, p. 260–266, 2018.

ZULETA CORREA, A. **Value-added bioproducts from high starch sweetpotatoes**. 2018. Graduate Faculty of North Carolina State University, 2018.