



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Produção de 1,3-propanodiol por fermentação de glicerol por diferentes cepas de *Clostridium*”

Beatriz da Cruz Mermejo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO -SP

2020



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Produção de 1,3-propanodiol por fermentação de glicerol por diferentes cepas de *Clostridium*”

Beatriz da Cruz Mermejo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Reginatto Spiller

Coorientadora: Profa. Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade.

RIBEIRÃO PRETO -SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Mermejo, Beatriz da Cruz

“Produção de 1,3-propanodiol por fermentação de glicerol por diferentes cepas de *Clostridium*”. Ribeirão Preto – SP, 2020.
83p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Reginatto Spiller

Coorientadora: Profa. Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade

1.*Clostridium beijerinckii* Br21. 2.*Clostridium pasteurianum*.
3.1,3-PDO. 4.Glicerol. 5. pH. 6.Via redutiva

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mermejo, Beatriz da Cruz

Título: Produção de 1,3-propanodiol por fermentação de glicerol por diferentes cepas de *Clostridium*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Reginatto Spiller

Coorientadora: Profa. Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade.

Aprovada em:

Banca examinadora:

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, principalmente minha mãe Eliana, minha madrinha Tânia e meus avós Maria e Orlando, por toda a dedicação e esforço que realizaram e que realizam para que eu sempre esteja em busca dos meus objetivos. Agradeço a eles por me educarem com muito amor e carinho e por estarem sempre ao meu lado e acreditarem em mim.

Agradeço ao meu namorado Heitor por todo o amor, companheirismo, compreensão e carinho em todos os momentos. Agradeço por sempre me incentivar a conquistar tudo o que desejo e também por me incentivar a ser uma pessoa melhor sempre.

Agradeço as minhas amigas Ana Luíza e Amanda que mesmo distantes se fazem presentes com palavras de conforto, carinho e incentivo. Agradeço, principalmente, por sempre acreditarem em mim. Sou muito grata pela amizade sincera.

Agradeço as minhas amigas de longa data Marcela, Mariana e Sabrina por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado durante todos esses anos. Agradeço a elas por me aguentarem nos meus mais diversos momentos e por toda a amizade.

Aos integrantes que fizeram e fazem parte do Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Energias Renováveis (LABIORE), por todos os momentos de estudo, de colaboração, de trabalho e descontração.

Agradeço por todas as amizades que fiz durante este período, principalmente, a Bruna, Emelin e Jonatã. Espero que essa nossa amizade possa perdurar por anos. Agradeço muito por todo o cuidado, carinho e companheirismo que vocês tiveram comigo durante esse período.

A minha orientadora, Valeria Reginatto Spiller, agradeço por todos os ensinamentos e orientação, e principalmente, por acreditar no meu potencial. Agradeço pela oportunidade que me foi dada de realizar este trabalho em um ambiente que zela pelo comprometimento e trabalho em equipe, e especialmente, pela oportunidade de trabalhar com você. Obrigada por toda sabedoria e serenidade, principalmente nos meus momentos de preocupação e de dificuldade.

A minha coorientadora, Adalgisa Rodrigues de Andrade, agradeço por todos os aprendizados, inclusive pela compreensão nas alterações que foram necessárias para que este trabalho fosse realizado e concluído.

Agradeço ao programa de pós-graduação do Departamento de Química – FFCLRP – Universidade de São Paulo por todo o suporte oferecido para a realização deste trabalho.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o mestrado, código de financiamento 001.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho.

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
RESUMO.....	15
ABSTRACT	17
1. Introdução	18
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo Geral	20
2.1.1. Objetivos Específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. O glicerol	21
3.1.1 O glicerol residual da indústria do biodiesel	21
3.2. O 1,3-propanodiol	25
3.2.1. Síntese biológica de 1,3- PDO por <i>Clostridium</i>	26
3.2.1.1. Via Oxidativa	29
3.2.1.2. Via Redutiva	33
3.2.1.3. Fatores que influenciam na formação de 1,3-PDO	35
4. Materiais e Métodos	39
4.1. Microrganismos utilizados	39
4.2. Composição e preparo dos meios de cultura	39
4.3. Preparo do inóculo	41
4.3.1. Preparo do inóculo	41
a. Ativação	41
b. Pré-inóculo	42
c. Inóculo	42
4.3.2. Inóculo e ensaios em biorreator de bancada	42
4.4. Ensaios de fermentação	43
4.4.1. Ensaios com diferentes pHs iniciais	43
4.4.2. Ensaios com diferentes composições de meio de cultura	43
4.4.3. Ensaios com diferentes concentrações iniciais de glicerol.....	43
4.4.4. Ensaios em biorreator de bancada com controle de pH	44
4.5. Determinação dos produtos de fermentação	44
4.7. Determinação dos parâmetros cinéticos	45
5. Resultados e Discussão	47
5.1. Influência do pH inicial na fermentação de glicerol	47
5.2. Influência de diferentes composições de meio de cultura na fermentação de glicerol.....	51

5.3. Influência da concentração inicial de glicerol para a obtenção de 1,3-PDO	
57	
5.4. Ensaio em biorreator com controle de pH	67
6. Conclusões	74
7. Referências bibliográficas	75
Anexo I	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma com as etapas realizadas na produção de biodiesel	22
Figura 2. Politereftalato de trimetileno	25
Figura 3. Vias metabólicas envolvidas na conversão do glicerol e glicose por <i>Clostridium pasteurianum</i>	28
Figura 4. Representação das fases de acidogênese e solventogênese para espécies de <i>Clostridium</i>	30
Figura 5. Inter-relação das vias oxidativa e redutiva do metabolismo do glicerol	34
Figura 6. Esquema representativo na preparação do inóculo para os ensaios fermentativos	41
Figura 7. A. Concentração celular de <i>C. beijerinckii</i> Br21. B. pH em função do tempo de fermentação utilizando os meios CH, TH, RCM, RCMmod e BL e glicerol 390 mM. .	52
Figura 8. Sobreposição dos cromatogramas inicial e após 40 horas obtidos na fermentação de glicerol 390 mM por <i>C. beijerinckii</i> Br21, utilizando o meio RCM original	52
Figura 9. Sobreposição dos cromatogramas inicial e após 40 horas obtidos na fermentação de glicerol 390 mM por <i>C. beijerinckii</i> Br21, utilizando o meio CH.....	55
Figura 10. A. Concentração celular. B. pH. Obtidos na fermentação de glicerol por <i>C. beijerinckii</i> Br21 utilizando meio CH. Dados em função do tempo (h).....	57
Figura 11. A. Concentração celular. B. pH. Obtidos na fermentação de glicerol por <i>C. pasteurianum</i> DSMZ 525 utilizando meio CH. Dados em função do tempo (h).	59
Figura 12. Cinéticas de formação de produtos a partir de diferentes concentrações de glicerol pelo <i>C. beijerinckii</i> Br21 em meio CH.....	60
Figura 13. Cinéticas de formação de produtos a partir de diferentes concentrações de glicerol pelo <i>C. pasteurianum</i> DSMZ 525 em meio CH	63
Figura 14. Variação da concentração de 1,3-PDO ao final das fermentações com diferentes concentrações de glicerol com o <i>C. beijerinckii</i> Br21 e <i>C. pasteurianum</i> DSMZ 525	65
Figura 15. Fermentador de bancada BioFlo®/CelliGen® 115 (New Brunswick).	67
Figura 16. Variação da concentração celular e pH referentes a fermentação de glicerol por <i>C. beijerinckii</i> Br21 e <i>C. pasteurianum</i> DSMZ 525, com e sem o controle de pH, utilizando o meio CH.....	68

Figura 17. Cinética do consumo de substrato e metabólitos obtidos pela fermentação do glicerol (390 mM) por <i>C. beijerinckii</i> Br21 utilizando o meio CH, com e sem o controle de pH.....	69
Figura 18. Cinética do consumo de substrato e metabólitos obtidos pela fermentação do glicerol (390 mM) por <i>C. pasteurianum</i> DSMZ 525 utilizando o meio CH, com e sem controle de pH, respectivamente.....	69
Figura 19. Cromatogramas inicial e final da fermentação de glicerol por <i>C. pasteurianum</i> DSMZ 525 utilizando o meio CH com e sem controle de pH.....	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Bioconversão de glicerol bruto em produtos de valor agregado usando diferentes microrganismos	24
Tabela 2. Componentes necessários em um meio de cultura sintético	37
Tabela 3. Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de fermentação.	40
Tabela 4. Glicerol consumido, hidrogênio, concentração de ácido butírico e 1,3-PDO, variação da concentração celular, fatores de conversão, produtividade e eficiência para a fermentação de glicerol (75 mM) por <i>C. beijerinckii</i> Br21	48
Tabela 5. Variação da concentração celular, variação de pH, pH final, glicerol consumido, metabólitos produzidos, fatores de conversão, produtividade e eficiência obtidos para a fermentação de glicerol 390 mM por <i>C. beijerinckii</i> Br21 em diferentes meios de cultura.	53
Tabela 6. Variação da concentração celular, variação de pH, pH final, glicerol consumido, metabólitos produzidos, fatores de conversão, produtividade e eficiência para os ensaios com o <i>C. beijerinckii</i> Br21 e o <i>C. pasteurianum</i> DSMZ 525 com glicerol em diferentes concentrações.....	62
Tabela 7. Variação da concentração celular, variação de pH, concentração de glicerol consumido, metabólitos produzidos, fatores de conversão, produtividade e eficiência para os ensaios em fermentador com o <i>C. beijerinckii</i> Br21 e o <i>C. pasteurianum</i> DSMZ 525.	71

LISTA DE ABRECIÇÕES

<i>adc</i>	Gene codificante da enzima acetoacetato descarboxilase
atm.....	Atmosfera
ATP.....	Adenosina Trifosfato
ADP.....	Adenosina Difosfato
cDNA.....	DNA complementar
C _T	<i>Cycle threshold</i>
DHA (dha).....	Dihidroxiacetona
<i>dhaB</i>	Gene codificante da enzima glicerol desidratase
<i>dhaC</i>	Gene codificante da enzima glicerol desidratase
<i>dhaE</i>	Gene codificante da enzima glicerol desidratase
DNA.....	ácido desoxirribonucleico
dNTPs.....	Nucleosídeos trifosfatados
D.O.....	Densidade Óptica
DSM.....	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen</i>
DSMZ.....	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
GDH.....	Glicerol desidrogenase
GDHt.....	Glicerol desidratase
M.....	Concentração molar
mg.....	Miligrama
mL.....	Mililitro
mM.....	Concentração milimolar
mmol.....	Milimol
mRNA.....	RNA mensageiro
m ³	metros cúbicos
NAD.....	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)
NADH.....	Nicotinamida adenina dinucleotídeo estado (reduzido)
NADH ₂	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Nm.....	Nanômetro
P.A.....	Padrão analítico
PFOR.....	Piruvato-ferredoxina oxireductase
pH.....	Potencial hidrogeniônico
pKa.....	Cologarítimo da constante de acidez

RPM.....	Rotação por minuto
UV.....	Radiação ultravioleta
X.....	Concentração de biomassa (mg L^{-1})
$Y_{X/S}$	Conversão de substrato em biomassa (mmol mmol^{-1})
$Y_{P/S}$	Conversão de substrato em produto (mmol mmol^{-1})
1,3-PDO.....	1,3-propanodiol
3-HPA.....	3-hidroxi-propionaldeído
ΔX	Varição da concentração celular (mg L^{-1})
ΔpH	Varição do potencial hidrogeniônico
%.....	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius

Mermejo, Beatriz da Cruz. **Produção de 1,3-propanodiol por fermentação de glicerol por diferentes cepas de *Clostridium***. 2020. 83p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

RESUMO

Na reação de transesterificação para produção de biodiesel é gerado como resíduo a glicerina (glicerol), em torno de 10% (m/v). Nos anos de 2017 e 2018, cerca de 375 e 441 mil m³, respectivamente, de glicerol residual foi computado decorrente da produção de biodiesel. Devido a crescente produção deste biocombustível, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para encontrar aplicações para o glicerol residual. Neste sentido, o glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono para a sua conversão em 1,3-propanodiol por meio de processos fermentativos catalisados por microrganismos do gênero *Clostridium*. O 1,3 propanodiol (1,3-PDO) é empregado principalmente na produção de polímeros. A utilização do glicerol pelo *Clostridium* pode ocorrer por duas vias, a oxidativa com ganho de energia e coenzimas reduzidas e a redutiva, na qual o glicerol é convertido a 3-hidroxi propionaldeído, sendo posteriormente reduzido a 1,3-PDO pela enzima 1,3 propanodiol oxirredutase. Neste trabalho foram avaliados os fatores que podem afetar a fermentação de glicerol pelo *Clostridium beijerinckii* Br21, tais como composição do meio de cultura, concentração de glicerol, pH inicial e controle de pH. Os resultados obtidos foram comparados com a cepa *Clostridium pasteurianum* DSMZ 525. O *C. beijerinckii* Br21 é capaz de produzir 1,3-PDO em diferentes concentrações de glicerol, sendo as concentrações 170 e 390 mM as mais favoráveis, apresentando $Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$ (mM mM⁻¹), 0,66 e 0,47, respectivamente. Enquanto o *C. pasteurianum* independente da concentração estudada o fator de conversão foi em torno de 0,4 mM 1,3-PDO mM⁻¹ glicerol. Valores de pH próximos a neutralidade favorecem, tanto o crescimento microbiano quanto a produção de 1,3-PDO. Quando o pH foi controlado em 7, a concentração de 1,3-PDO gerada foi consideravelmente maior do que quando este não foi controlado, independente da cepa estudada, sendo, 63,8 e 123,4 mM 1,3-PDO para *C. beijerinckii* e *C. pasteurianum*, respectivamente. A cepa *C. beijerinckii* Br21 se mostrou uma alternativa, tanto para a obtenção de 1,3-PDO, quanto para ácido butírico. Estudos futuros de otimização na conversão de glicerol em 1,3-PDO possivelmente tornarão esta

cepa uma opção para aplicações do glicerol residual do biodiesel em produtos de valor agregado, tais como 1,3-PDO e ácido butírico.

Palavras chaves: 1,3-propanodiol, biodiesel, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium pasteurianum*, ácido butírico.

ABSTRACT

In the transesterification reaction for biodiesel production, glycerin (glycerol) is generated as a residue, around 10% (m/v). In the years 2017 and 2018, about 375 and 441 thousand m³, respectively, of residual glycerol was computed due to the production of biodiesel. Due to the growing production of this biofuel, many studies have been developed to find applications for residual glycerol. In this sense, glycerol can be used as a carbon source for its conversion into 1,3-propanediol through fermentative processes catalyzed by microorganisms of the genus *Clostridium*. 1,3 propanediol (1,3-PDO) is mainly used in the production of polymers. The use of glycerol by *Clostridium* can occur in two ways, the oxidative with energy gain and reduced coenzymes and the reductive, in which the glycerol is converted to 3-hydroxypropionaldehyde, being subsequently reduced to 1,3-PDO by the 1,3 enzyme propanediol oxidoreductase. In this work, factors that may affect the fermentation of glycerol by *Clostridium beijerinckii* Br21 were evaluated, such as composition of the culture medium, concentration of glycerol, initial pH and pH control. The results obtained were compared with the strain *Clostridium pasteurianum* DSMZ 525. *C. beijerinckii* Br21 is capable of producing 1,3-PDO in different concentrations of glycerol, with the concentrations 170 and 390 mM being the most favorable, presenting $Y_{1,3\text{-PDO/GLYCEROL}}$ (mM mM⁻¹), 0.66 and 0.47, respectively. While the *C. pasteurianum*, regardless of the concentration studied, the conversion factor was near 0.4 mM 1,3-PDO mM⁻¹ glycerol. PH values close to neutrality favor both microbial growth and the production of 1,3-PDO. When the pH was controlled at 7, the generated 1,3-PDO concentration was considerably higher than when it was not controlled, regardless of the strain studied, being 63.8 and 123.4 mM 1,3-PDO for *C. beijerinckii* and *C. pasteurianum*, respectively. The strain *C. beijerinckii* Br21 proved to be an alternative, both for obtaining 1,3-PDO and for butyric acid. Future optimization studies on the conversion of glycerol to 1,3-PDO will possibly make this strain an option for applications of residual biodiesel glycerol in value-added products, such as 1,3-PDO and butyric acid.

Keywords: 1,3-propanediol, biodiesel, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium pasteurianum*, butyric acid.

1. Introdução

Um dos grandes objetivos das pesquisas científicas atuais é sobre a necessidade em se buscar alternativas que possam substituir os derivados de matérias primas fósseis por fontes renováveis nos mais diversos processos industriais. Este fato se deve aos inúmeros problemas ambientais e, conseqüentemente, econômicos que os materiais oriundos do petróleo podem causar, como, por exemplo, a poluição marítima, a baixa biodegradabilidade e a energia gasta nas inúmeras etapas de refino do petróleo que precisam ser realizadas.

O Brasil é referência mundial na substituição de matéria prima fóssil por renovável, principalmente, no que se refere aos biocombustíveis. Os principais biocombustíveis produzidos e consumidos no Brasil são o etanol de cana-de-açúcar e o biodiesel que é obtido a partir de óleos vegetais e/ou gorduras animais. De acordo com o Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2019) foram produzidos cerca de 4,3 e 5,4 milhões m³ de biodiesel e 28,9 e 33,1 milhões de m³ de etanol, para os anos de 2017 e 2018, respectivamente (ANP, 2019).

No intervalo de quase 10 anos (2009-2018) a produção de biodiesel aumentou de 1,6 para 5,4 milhões de m³. Estima-se que a produção de biodiesel para os próximos anos cresça ainda mais, devido ao contínuo aumento da porcentagem que deve ser adicionada ao diesel. Por exemplo, em Janeiro de 2008 era de apenas 2%, em Março de 2018 essa porcentagem aumentou para 10%. Além disso, tem-se a nova Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) instituída pela Lei nº 13.576/2017. O RenovaBio tem por objetivo principal estimular a expansão do mercado de biocombustíveis no Brasil, assegurando a redução na emissão dos gases relacionados ao efeito estufa (acordo de descarbonização) (ANP, 2019).

O biodiesel é obtido a partir da reação de transesterificação que ocorre entre os triglicerídeos que estão presentes, tanto nos óleos vegetais quanto em gordura animal, com álcool, que podem ser o metanol ou o etanol. Na reação de transesterificação para produção de biodiesel é gerado como resíduo a glicerina (glicerol) (PARENTE, 2003; SILVA *et al.*, 2009; SELEMBO *et al.*, 2009; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

De acordo com os dados apresentados pelos Anuários Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, em torno de 10% da produção de biodiesel refere-se ao glicerol. Dessa maneira, considerando os dados dos anos 2017 e 2018, em torno de 375 e 441 mil m³, respectivamente, de glicerol residual foram gerados. Vale

ressaltar que a quantidade de glicerol varia em função do processo e matérias-primas utilizadas. Portanto, com base na crescente utilização deste biocombustível, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para encontrar aplicações para a valorização de glicerol residual (GUNGORMUSLER *et al.*, 2011a; KAUR *et al.*, 2012a; UPRETY *et al.*, 2017a; UPRETY *et al.*, 2017b; ZABED *et al.*, 2019).

Embora o glicerol puro possua diversas aplicações industriais (farmacêutica, alimentícia, química, têxtil, etc.), para que o glicerol residual do biodiesel seja empregado nestes mesmos ramos é necessária a realização de refino (purificação e tratamento), o que, conseqüentemente, encarece o valor final do processo. Assim sendo, procedimentos alternativos têm sido o foco de muitas pesquisas. Uma das vertentes que vem ganhando espaço no campo científico são os processos biotecnológicos, como a fermentação (BIEBL *et al.*, 1999; BIEBL, 2001; GUNGORMUSLER *et al.*, 2011a; KAUR *et al.*, 2012a; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000; SELEMBO *et al.*, 2009; UPRETY *et al.*, 2017b).

Diversos microrganismos são capazes de metabolizar o glicerol por diferentes rotas. Um dos principais produtos que pode ser gerado a partir da fermentação do glicerol por microrganismos é o 1,3-propanodiol (1,3-PDO) (UPRETY *et al.*, 2017b; ZABED *et al.*, 2019). Este composto apresenta grande importância industrial, uma vez que, é um dos materiais utilizados na fabricação de cosméticos, alimentos, tintas entre outros, e é empregado, principalmente, como matéria-prima para a produção de polímeros. As bactérias do gênero *Clostridium* spp. são uma das mais empregadas para a fermentação do glicerol com este objetivo (BIEBL *et al.*, 1992; BIEBL *et al.*, 1999; BIEBL, 2001; GUNGORMUSLER *et al.*, 2011a; KAUR *et al.*, 2012a; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000; SELEMBO *et al.*, 2009; UPRETY *et al.*, 2017b).

Atualmente o 1,3-PDO é obtido por via química, seja a partir da acroleína, do óxido de etileno (KRAUS, 2008) e até mesmo do próprio glicerol comercial (BIEBL *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 2003; YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Esta rota envolve, além da utilização de compostos derivados do petróleo, elevada pressão e catalisadores, o que eleva, portanto, o custo do processo, além de afetar o meio ambiente (BIEBL *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 2003; YAZDANI e GONZALEZ, 2007; KRAUS, 2008).

Este trabalho se insere neste contexto, no qual foram estudadas diferentes condições para a produção de 1,3-PDO por *Clostridium beijerinckii* Br21, isolada pelo nosso grupo e uma cepa padrão *Clostridium pasteurianum* DSMZ 525, normalmente empregada na obtenção deste produto por fermentação.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi comparar a obtenção de 1,3-PDO a partir da fermentação do glicerol, como principal fonte de carbono, pela cepa *Clostridium beijerinckii* Br21 e pelo *Clostridium pasteurianum* DSMZ 525.

2.1.1. Objetivos Específicos

Avaliar como as variáveis pH inicial do meio, diferentes meios de cultura e concentração inicial de glicerol influenciam no crescimento celular e na obtenção de 1,3-PDO por *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSMZ 525. E, posteriormente, a partir das condições de fermentação selecionadas, comparar a produção de 1,3-PDO em biorreator com controle de pH.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O glicerol

O glicerol (1,2,3-propanotriol) é um álcool simples de fórmula molecular $C_3H_8O_3$, líquido à temperatura de 25 °C e pressão 1 atm. É higroscópico, inodoro e viscoso. (CHUN *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2001). Como constituinte de lipídeos, o glicerol pode ser encontrado em células animais e vegetais, está presente em gordura e óleos animais e vegetais, normalmente como um triglicerídeo combinado com ácidos graxos, como por exemplo, ácido oleico e palmítico (MORRISON, 2000).

O glicerol puro possui muitas aplicações como, por exemplo, na indústria alimentícia como estabilizante, antioxidante, umectante, emulsificante e sequestrante. Este composto pode ser empregado para as mais diferentes finalidades, como por exemplo, indústria têxtil, na produção de tabaco, de explosivos; pode ainda ser utilizado pela indústria química na produção de adesivos, detergentes, tintas, aditivos e papéis; além de ser considerado como agente crioprotetor. Apesar das inúmeras aplicações do glicerol, muitas unidades produtoras estão sendo desativadas devido à grande oferta de glicerol residual proveniente da indústria do biodiesel (WANG *et al.*, 2001; ZABED *et al.*, 2019).

3.1.1 O glicerol residual da indústria do biodiesel

A produção do biodiesel envolve várias etapas incluindo o preparo da matéria-prima para que ocorra a reação de transesterificação, além da separação, recuperação e purificação. O esquema com os procedimentos necessários para a obtenção do biodiesel está apresentado na Figura 1.

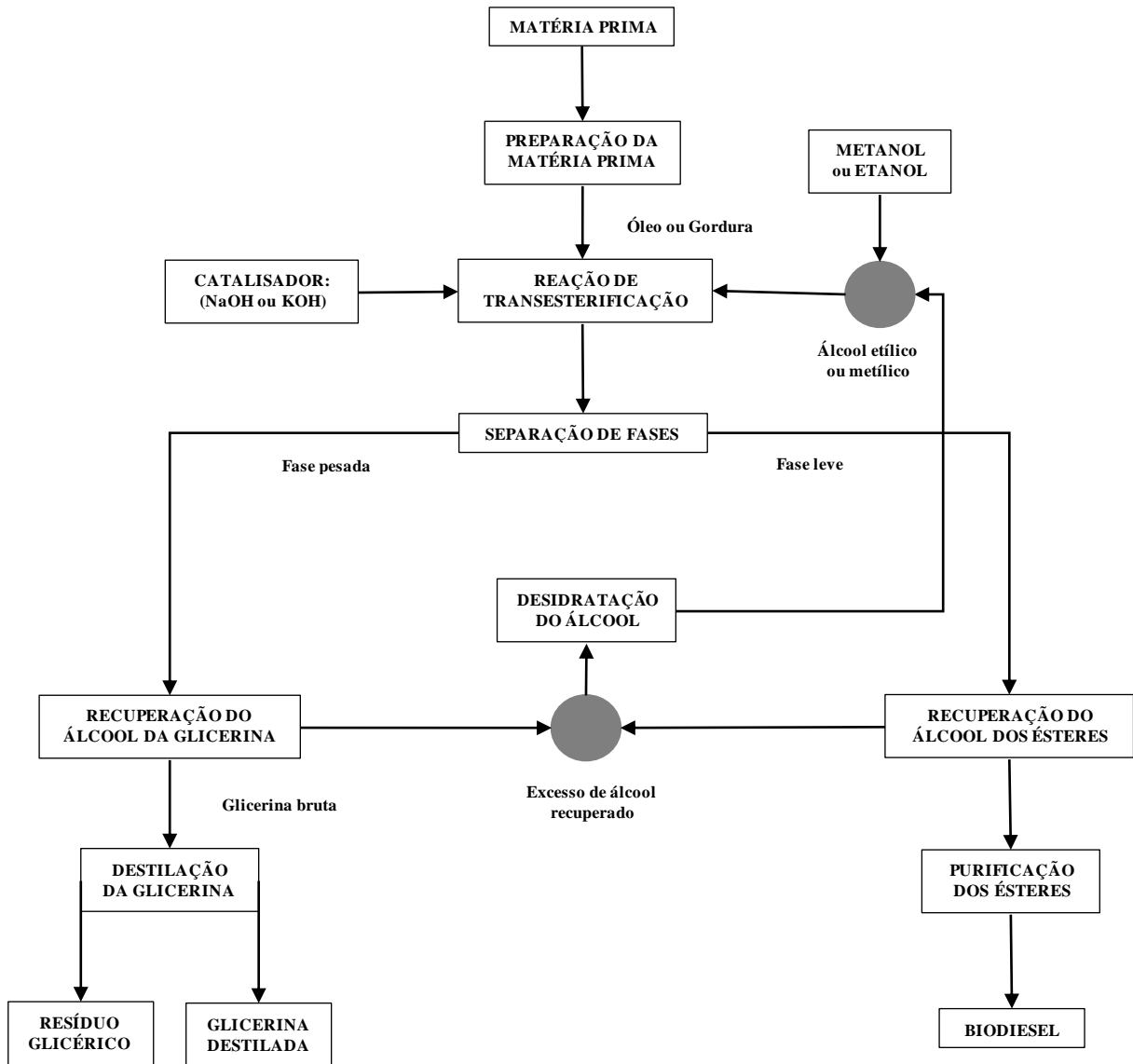
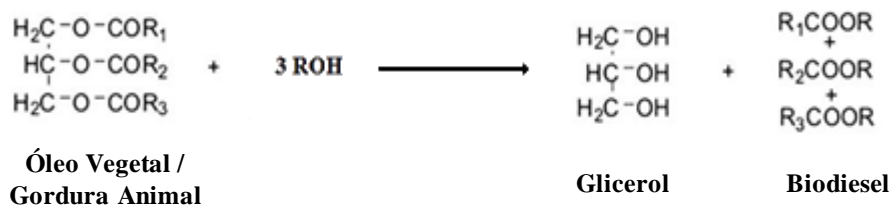


Figura 1. Fluxograma com as etapas realizadas na produção de biodiesel (Fonte: PARENTE, 2003).

É a partir da reação de transesterificação que ocorre entre óleo vegetal e/ou gordura animal e álcoois, que o glicerol residual é formado. De acordo com a Reação 1, que apresenta a reação de transesterificação do biodiesel, os grupamentos R_1 , R_2 e R_3 são hidrocarbonetos de cadeia longa, e R que representa os álcoois, podendo ser tanto etanol ($R: -CH_2CH_3$) ou metanol ($R: -CH_3$). Essa reação de transesterificação é realizada mediante o uso de um catalisador (NaOH ou KOH), sob aquecimento e agitação (SCHUCHARDT *et al.*, 1998, SILVA *et al.*, 2009). Uma vez cessada a agitação, a mistura é separada em biodiesel e o resíduo, ou seja, o glicerol bruto e outras substâncias (SELEMBO *et al.*, 2009; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).



Reação 1: Reação esquemática de transesterificação para obtenção do biodiesel e glicerol (Fonte: Adaptado de SILVA *et al.*, 2009).

O glicerol residual obtido desta reação, como já mencionado, refere-se a cerca de 10% da produção do biodiesel, e, devido à grande demanda por este biocombustível, é gerada uma quantidade elevada deste resíduo (GUNGORMUSLER *et al.*, 2011a; SCHUCHARDT *et al.*, 1998; YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Em razão disso, o glicerol tem sido aplicado como uma matéria-prima renovável para a obtenção de diversos produtos, o que favorece à substituição de materiais provenientes de matérias-primas fósseis. Apesar disso, atualmente, a maior parte do glicerol residual é queimada em fornos e caldeiras para a geração de energia calorífica (REVISTA FAPESP, 2012). Isso devido ao custo envolvido na adequação deste resíduo, nas etapas de purificação, para outras aplicações industriais.

Existem inúmeros estudos realizados para aumentar o valor agregado ao glicerol residual do biodiesel, visando não somente a redução dos custos na produção do biocombustível, como também, a conversão deste em produtos de elevado interesse industrial. Em vista disso, existem processos biotecnológicos que podem converter o glicerol em hidrogênio, 1,3-propanodiol, dihidroxiacetona, ácido succínico, ácido propiônico, etanol, ácido cítrico, pigmentos, polihidroxialcanoato, biossurfactantes, butanol, entre outros (BIEBL *et al.*, 1992; BIEBL *et al.*, 1999; BIEBL, 2001; GUNGORMUSLER *et al.*, 2011a; KAUR *et al.*, 2012a; SILVA *et al.*, 2009; SELEMO *et al.*, 2009; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000; UPRETY *et al.*, 2017b; WANG *et al.*, 2003; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

A Tabela 1 mostra alguns produtos obtidos por meio da fermentação do glicerol, utilizando diferentes microrganismos e os respectivos rendimentos.

Tabela 1. Bioconversão de glicerol bruto em produtos de valor agregado usando diferentes microrganismos (Fonte: Adaptada de UPRETY *et al.*, 2017b).

Produto	Microrganismo	Espécie	Rendimento (g g ⁻¹ glicerol consumido)	Referência
Hidrogênio	Bactéria	<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	0,029	NGO <i>et al.</i> , 2011
1,3-PDO	Bactéria	<i>Clostridium butyricum</i> AKR102a	0,514	WILKENS <i>et al.</i> , 2012
n-butanol	Bactéria	<i>Clostridium pasteurianum</i> MTCC 116	0,35	KHANNA <i>et al.</i> , 2013
Trealose	Bactéria	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>Shermanii</i> NCIM 5137	0,10	RUHAL <i>et al.</i> , 2011
Ácido propanoico	Bactéria	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> 1	0,56	KOŚMIDER <i>et al.</i> , 2010
Etanol	Bactéria	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> 1	0,80	CHOI <i>et al.</i> , 2011
Ácido succínico	Bactéria	<i>Pasteurellaceae</i> strain DD1	1,20	SCHOLTEN <i>et al.</i> , 2008
PHB	Bactéria	<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134	0,14	MOTHES <i>et al.</i> , 2007
Ácido cítrico	Levedura	<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 50109	0,56	PAPANIKOLAOU <i>et al.</i> , 2008
Ácido γ -linoleico	Levedura	<i>Candida</i> sp. LEB-M3	0,33	DUARTE <i>et al.</i> , 2013
Ácido γ -linoleico	Levedura	<i>Rhodospiridium toruloides</i> ATCC 10788	0,44	UPRETY <i>et al.</i> , 2017a
Ácido γ -linoleico	Fungo	<i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411	0,10	FAKAS <i>et al.</i> , 2009
Ácido γ -linoleico	Fungo	<i>Mortierella isabellina</i> ANTHUM 2935	0,08	PAPANIKOLAOU <i>et al.</i> , 2008

3.2. O 1,3-propanodiol

Diversos produtos podem ser obtidos a partir do glicerol por via biológica, sendo um dos principais, o composto 1,3-propanodiol (1,3-PDO), devido a sua ampla importância industrial (JUN *et al.*, 2010; KAUR *et al.*, 2012a).

O 1,3-PDO, também conhecido por trimetileno glicol ou propileno glicerol, é uma substância alifática linear, líquida, incolor e inodora. É usualmente utilizado pela indústria de cosméticos, lubrificantes, têxtil entre outras, mas principalmente, em polímeros. O 1,3-PDO é a principal matéria-prima do poliéster politereftalato de trimetileno (PTT) (Figura 2) que é comercializado tanto pela Shell® – com o nome de **Corterra®** – quanto pela DuPont® – com o nome de **Sorona®**. Este copolímero possui características físicas de grande interesse industrial como, por exemplo, alta resistência e elasticidade (BIEBL *et al.*, 1999).

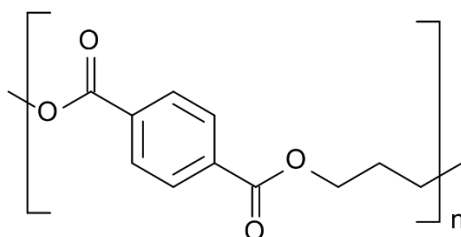


Figura 2. Politereftalato de trimetileno (Fonte: KRAUS, 2008).

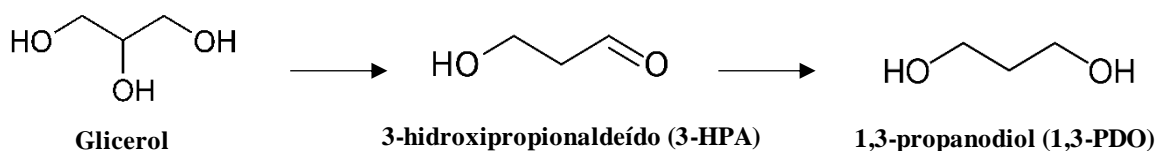
Devido à crescente demanda pelo composto PTT, o mercado de 1,3-PDO tem sido impulsionado ao longo dos anos, tendo uma produção de 100 mil toneladas de 1,3-PDO/ano. No ano de 2014 a demanda global por este composto foi de 1,46 milhões de toneladas e, estima-se que no ano de 2022 este valor seja de, aproximadamente, 2,2 milhões de toneladas, equivalendo cerca de 780 milhões de dólares (ZABED *et al.*, 2019), podendo atingir 870 milhões de dólares em 2024 (MARKET & MARKET, 2020).

O 1,3-PDO pode ser obtido por síntese química a partir da acroleína ou do óxido de etileno (KRAUS, 2008). Segundo Lin *et al.*, (2005) para a conversão da acroleína em 1,3-PDO são necessários elevadas temperatura e pressão, além do uso de catalisadores químicos, o que eleva o custo desta via. Além disso, compostos como a acroleína e o óxido de propileno são derivados do petróleo, portanto, não são considerados fontes de matérias-primas renováveis para a produção sustentável deste composto.

Alternativamente, o 1,3-PDO pode ser obtido por fermentação do glicerol, utilizando catalisadores biológicos, ou seja, microrganismos (BIEBL *et al.*, 1992; BIEBL

et al., 1999; BIEBL, 2001; GUNGORMUSLER *et al.*, 2011a; KAUR *et al.*, 2012a; SELEMBO *et al.*, 2009; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000; UPRETY *et al.*, 2017b; WANG *et al.*, 2003; YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Dentre os principais microrganismos, as bactérias são as mais estudadas na conversão do glicerol em 1,3-PDO. Existem diversos estudos que foram realizados utilizando as bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* e *Propionibacterium* (YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

A via biológica de obtenção do 1,3-PDO, independentemente do microrganismo, compreende duas etapas, onde na primeira o glicerol é convertido a 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA), que subsequentemente é reduzido a 1,3-PDO (Reação 2), etapas catalisadas pelas enzimas glicerol desidratase e 1,3-PDO desidrogenase, respectivamente. Este mecanismo, em particular, será explorado com mais detalhes para o gênero *Clostridium*, nos próximos tópicos deste trabalho.



Reação 2: Reação de conversão do glicerol em 1,3-PDO.

3.2.1. Síntese biológica de 1,3- PDO por *Clostridium*

Considerando o grupo das bactérias, as vias bioquímicas mais elucidadas para a produção de 1,3-PDO são as dos gêneros *Klebsiella* (KAUR *et al.*, 2012a; KAUR *et al.*, 2012b) e *Clostridium* (BIEBL *et al.*, 1992), sendo o *C. pasteurianum* (BIEBL, 2001), o *C. butyricum* (BIEBL, 1991) e o *Clostridium diolis* (reclassificado como *Clostridium beijerinckii*) (BIEBL e SPROER, 2002; KAUR *et al.*, 2012b), as espécies de maior interesse.

O gênero *Clostridium* é constituído por bactérias gram positivas e que possuem estrutura na forma de bastonete. Esses microrganismos são anaeróbios estritos e também são formadores de endósporos (DWORKIN *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2014). Espécies de *Clostridium* são capazes de utilizar como fonte de carbono, não somente o glicerol, mas outros substratos como os carboidratos, convertendo-os em diversos produtos, tais como,

hidrogênio, ácidos (butírico, acético e láctico) e solventes (etanol, acetona e butanol) (DWORKIN *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2014; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

A utilização do glicerol pelo *Clostridium* ocorre em duas vias bioquímicas interdependentes, uma redutiva e outra oxidativa. Na etapa oxidativa, o glicerol é convertido a dihidroxiacetona entrando na via glicolítica (BIEBL *et al.*, 1999; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000; YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Os equivalentes redutores formados na via glicolítica são reoxidados em reações fermentativas posteriores, podendo ser formados os seguintes subprodutos: etanol, butanol, acetona, acetato, butirato e lactato (SILVA, *et al.*, 2009) (Figura 3). Os equivalentes redutores também podem ser reoxidados em uma das conversões, na via redutiva, na qual o glicerol é convertido a 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) que, em seguida, é reduzido a 1,3-propanodiol (1,3-PDO).

Além da fermentação do glicerol gerar o 1,3-PDO, que é o produto de maior interesse industrial pelo seu alto valor agregado, (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000; SELEMBO *et al.*, 2009; VERAS *et al.*, 2019; ZABED *et al.*, 2019) a via bioquímica do *Clostridium* também pode gerar o hidrogênio, por meio da oxidação do piruvato a acetil-CoA seguida da redução da Ferredoxina (Fd/FdH), o qual pode ser recuperado como fonte de energia (SARMA *et al.*, 2012; SELEMBO *et al.*, 2009).

A Figura 3 representa o metabolismo do glicerol pelo gênero *Clostridium* envolvendo as vias oxidativa e redutiva, com os subprodutos formados, bem como algumas das etapas intermediárias, os equivalentes redutores (NADH+H⁺), os ATP produzidos, além das enzimas envolvidas. A Figura 3 também ilustra a presença da glicose no metabolismo. As linhas descontínuas em azul e vermelho representam as fases de acidogênese e solventogênese, respectivamente, da via oxidativa. O metabolismo do glicerol com mais detalhes será discutido no próximo item.

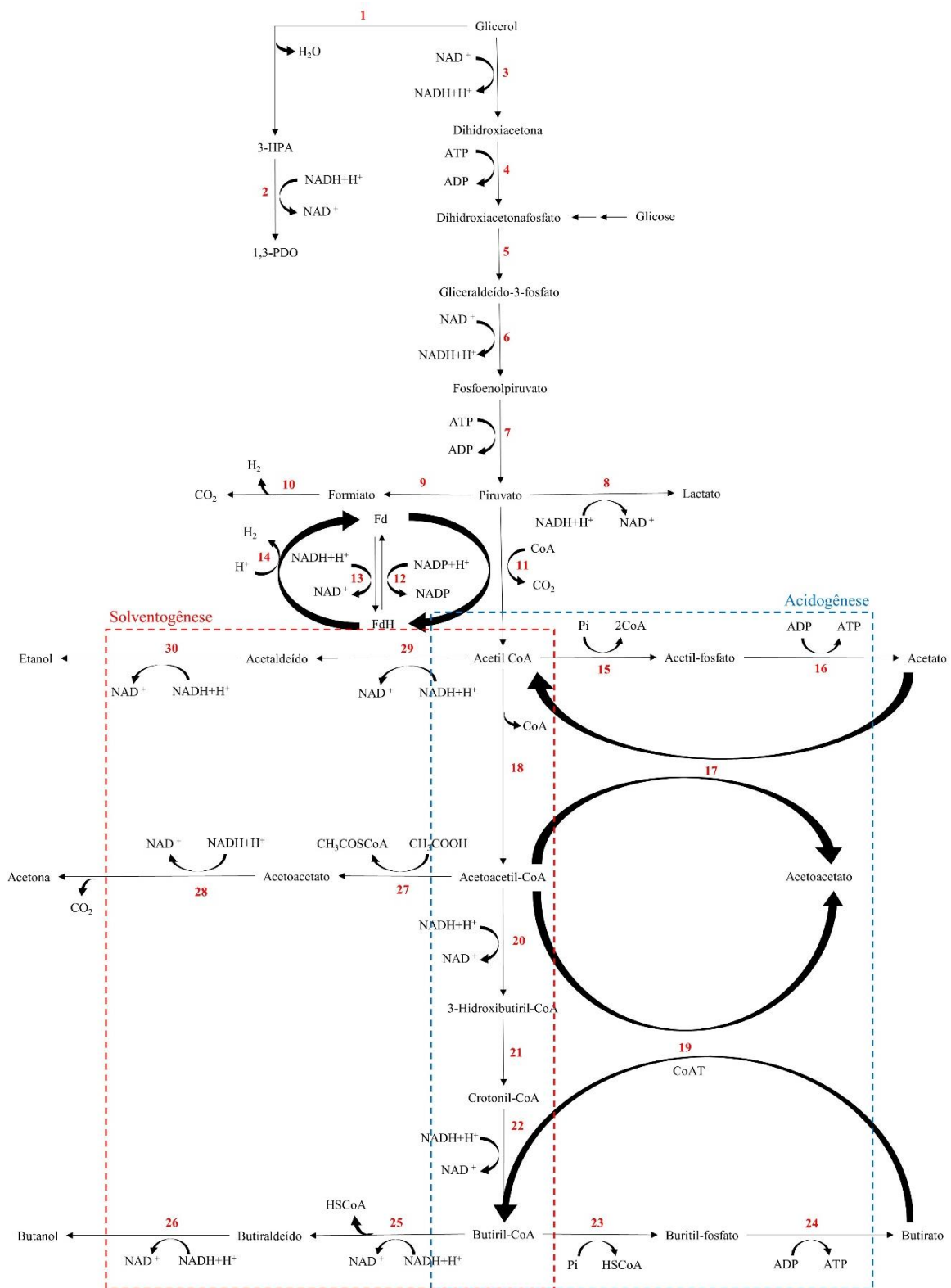


Figura 3. Vias metabólicas envolvidas na conversão do glicerol e glicose por *Clostridium pasteurianum*. 1: glicerol desidratase; 2: 1,3-propanodiol oxidorreductase; 3: glicerol-3-fosfato desidrogenase; 4: dihidroxiacetona cinase; 5: triosefosfato isomerase; 6: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 7: piruvatoquinase; 8: lactato desidrogenase; 9: piruvato formiato-liase; 10: formiato hidrogênio liase; 11: piruvato-ferredoxina oxidorreductase; 12: NADPH-ferredoxina oxidorreductase; 13: NADH-ferredoxina oxidorreductase; 14: hidrogenase de ferredoxina; 15: fosfato acetiltransferase; 16: acetato cinase; 17: acetoacetil-CoA: acetato: CoA transferase; 18: tiolase; 19: acetoacetil-CoA: butirato: CoA transferase; 20: β -hidroxibutiril-CoA desidrogenase; 21: crotonase; 22: butiril-CoA desidrogenase; 23: fosfotransbutirilase;

24: butirato-quinase; 25: butiraldeído desidrogenase; 26: butanol desidrogenase; 27: CoA-transferase; 28: acetoacetate decarboxilase; 29: acetaldeído desidrogenase; 30: etanol desidrogenase. Setas grossas correspondem a reações envolvendo enzimas / proteínas contendo ferro (Fonte: Adaptado de GALLARDO *et al.*, 2017).

3.2.1.1. Via Oxidativa

Na oxidação do glicerol por bactérias do gênero *Clostridium* o glicerol é convertido a dihidroxiacetona (DHA) pela ação da enzima glicerol-3P-desidrogenase (GDH, EC 1.1.1.633), nesta etapa há a formação de NADH (3, Figura 3). Na sequência, a DHA sofre fosforilação pela dihidroxiacetona cinase (DHAK, EC 2.7.1.29), (4, Figura 3), formando dihidroxiacetona fosfato. Este intermediário segue as reações da via glicolítica até ser convertido a piruvato.

O piruvato sofre descarboxilação oxidativa gerando acetil CoA e CO₂, por meio da ação da enzima piruvato ferredoxina oxidorreductase (PFOR, EC 1.2.7.1), (11, Figura 3), e subsequentemente geração de H₂, pela ação da NADPH-ferredoxina oxidorreductase e da hidrogenase (12 e 14, Figura 3). O acetil CoA segue para a formação de diversos metabólitos, tais como os ácidos orgânicos (acético e butírico), etanol (GALLARDO *et al.*, 2017; SARMA *et al.*, 2012;); além de butanol e acetona (BIEBL, 2001; JENSEN *et al.*, 2012; KHANNA *et al.*, 2012; SARCHAMI *et al.*, 2016). O piruvato ainda pode ser convertido a formiato, CO₂ e H₂ pela enzima piruvato formiato-liase (PFL, EC 2.3.1.54) (9, Figura 3).

Recentemente foi descrita a importância da atividade das enzimas PFOR e PFL no que se refere a possibilidade de consumo do CO₂. Isso pois, à medida que o CO₂ é acumulado pode ocorrer o mecanismo reverso da PFOR. No mecanismo reverso da PFOR, o CO₂ juntamente com a molécula de CoA são revertidos a piruvato e este transformado em outros metabólitos da via como os ácidos acético e butírico, por exemplo (SANDOVAL-ESPINOLA *et al.*, 2017).

De maneira concomitante à via oxidativa, após a fase de adaptação do microrganismo (fase lag), acontece o crescimento exponencial celular (fase log). É nesta fase que ocorre o aumento da concentração celular do microrganismo, devido ao elevado consumo do substrato disponível no meio fermentativo (LUTKE-EVERSLOH *et al.*, 2011). É durante o crescimento exponencial celular que os ácidos orgânicos da via oxidativa são produzidos. Essa fase é denominada de acidogênese, representada na Figura 4. À medida que os ácidos orgânicos estão sendo produzidos no meio extracelular, ocorre o decaimento do pH do meio reacional (LUTKE-EVERSLOH *et al.*, 2011). Os ácidos

orgânicos, por sua vez, dependendo do pH do meio podem se apresentar na sua forma dissociada ou não dissociada. Quando o pH está próximo a 5 os ácidos encontram-se, em sua maioria, na forma não dissociada, uma vez que apresentam pKa igual a 4,75 (ácido acético) e 4,82 (ácido butírico). Na sua forma não dissociada estas moléculas podem atravessar a membrana celular e se dissociar dentro da célula, liberando prótons (H^+). Dessa maneira, o pH intracelular que é normalmente próximo à neutralidade diminui, podendo até comprometer o gradiente da membrana e causar morte celular. A concentração de ATP celular também é comprometida ao tentar remover os íons H^+ presentes no interior da célula (BARAL *et al.*, 2014).

Em razão do acúmulo de ácidos não dissociados, as células de *Clostridium* param de crescer exponencialmente, dando início à fase estacionária, e esporulam para se proteger do baixo pH. Nesta fase, em cepas de *Clostridium* solventogênicos, os ácidos produzidos durante a acidogênese são reabsorvidos e convertidos em acetona, butanol e etanol. Esta etapa é denominada de solventogênese e está representada na Figura 4.

A medida que os solventes são produzidos, o pH do meio fermentativo começa a aumentar se aproximando ao do início da fermentação. Dessa maneira, depois que os esporos estão formados, estes podem sofrer germinação, regenerando assim as células vegetativas que podem reiniciar o ciclo (LUTKE-EVERSLOH *et al.*, 2011).

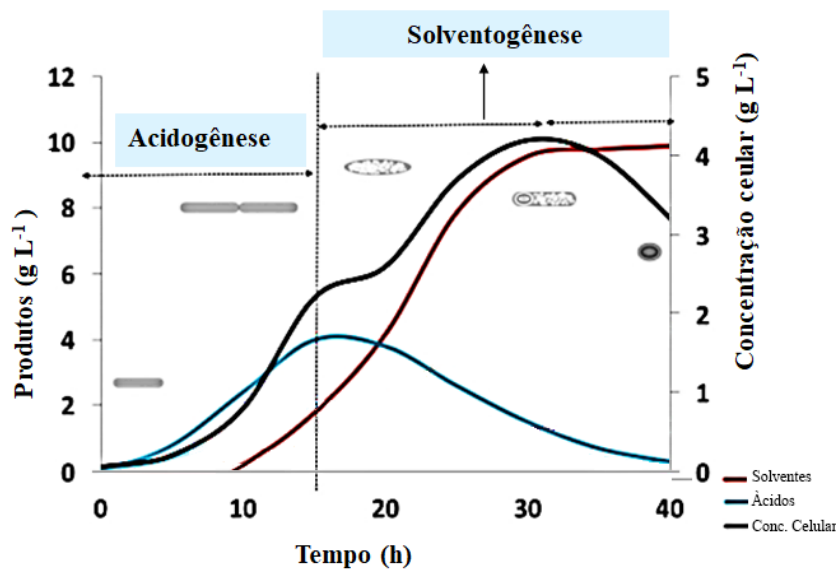


Figura 4. Representação das fases de acidogênese e solventogênese para espécies de *Clostridium*. (FONTE: Adaptado de YOO *et al.*, 2020)

A reassimilação dos ácidos orgânicos com sua posterior conversão em solventes é realizada por meio de diversas enzimas, dentre elas as CoA transferases: acetoacetil-CoA: acetato: CoA transferase; e acetoacetil-CoA: butirato: CoA transferase (17 e 19, Figura 3) e acetoacetato descarboxilase (28, Figura 3) (HARTMANIS *et al.*, 1984). A variação de energia livre padrão de Gibbs para a reação de reassimilação dos ácidos (Reação 3), embora seja negativa (exergônica), $\Delta G^{\circ} = -7,1 / -9,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (THAUER *et al.*, 1977), não é suficiente para suprir o balanço energético global das vias. Dessa maneira, para que a reação ocorra é necessária uma energia adicional, ou seja, é preciso um acoplamento de reações para que assim a energia proveniente seja destinada para a formação de acetoacetato e acetil-CoA/butiril-CoA.



Tendo em vista a hipótese de que alguma reação da via oxidativa deve ocorrer de forma a fornecer a energia necessária para a reabsorção dos ácidos orgânicos, alguns estudos foram realizados com *Clostridium acetobutylicum* (HARTMANIS *et al.*, 1984). De acordo com a Reação 3, para que ocorra a conversão dos ácidos aos seus respectivos tiolésteres de CoA (acetil CoA/butiril CoA), deve ser gerada uma quantidade equimolar de acetoacetato. Esse acetoacetato formado é descarboxilado pela enzima acetoacetato descarboxilase produzindo acetona (HARTMANIS *et al.*, 1984).

De acordo com os resultados obtidos por Hartmanis *et al.*, (1984) a reação de descarboxilação do acetoacetato gerando acetona é a reação que fornece a energia necessária para a reassimilação dos ácidos. A variação de energia livre padrão de Gibbs (ΔG°) para a formação de acetona é de $-26,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ (THAUER *et al.*, 1977). Apesar da afinidade da enzima pelo acetoacetato ser alta (K_m de 8 mM), a energia obtida é suficiente para influenciar a reação da transferase na direção de formação do acetoacetato. Dessa maneira, os autores concluíram que a enzima acetoacetato descarboxilase pode ser considerada como chave para a via da formação de acetona a partir do acetoacetil-CoA e ainda que, não é possível a absorção de acetato e/ou butirato sem que haja a concomitante formação de acetona (HARTMANIS *et al.*, 1984).

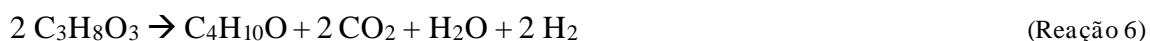
O *C. pasteurianum* é capaz de metabolizar glicerol, como única fonte de carbono gerando 1,3-PDO na via redutiva e butanol pela via oxidativa (BIEBL, 2001; JENSEN *et al.*, 2012; KHANNA *et al.*, 2012; SARCHAMI *et al.*, 2016). Por outro lado, o *C. beijerinckii* só é capaz de produzir butanol, como principal metabólito, a partir de

carboidratos como glicose, ou então, a partir de misturas de glicerol e carboidratos (SANDOVAL-ESPINOLA *et al.*, 2017). Porém, quando somente glicerol é utilizado, o produto majoritário é 1,3-PDO (WISCHRAL *et al.*, 2016). A única maneira de o microrganismo *C. beijerinckii* produzir butanol a partir de glicerol como único substrato é fazendo parte de um consórcio microbiano (VERAS *et al.*, 2019).

Forsberg (1987) comparou a produção de 1,3-PDO por fermentação de glicerol em várias linhagens de *Clostridium* spp.. Segundo o autor, todas as linhagens apresentaram perfis semelhantes no que se refere aos produtos, sendo 1,3-PDO e ácido butírico os produtos majoritários, com exceção do *C. butyricum* IFO 3858 que produziu mais butanol a partir de glicerol do que os demais.

Especificamente a cepa *C. beijerinckii* Br21 não possui o gene *adc* que codifica a enzima acetoacetato descarboxilase (FONSECA *et al.*, 2019). Dessa maneira, não é possível a reabsorção dos ácidos orgânicos com posterior conversão em solventes, uma vez que não existe o fornecimento de energia para que as reações de reabsorção dos ácidos. Embora este microrganismo não seja capaz de produzir solventes, este fato é positivo no que se refere à produção de 1,3-PDO. Pois assim, os equivalentes redutores na forma de NADH+H⁺ que seriam consumidos na formação do butanol (25, Figura 3) estão supostamente disponíveis para serem utilizados na via redutiva do glicerol de formação do 1,3-PDO.

De maneira geral, dentre os produtos formados pela fermentação do glicerol por *Clostridium*, pela via oxidativa, estão o ácido acético (Reação 4), ácido butírico (Reação 5), butanol (Reação 6), etanol (Reação 7) e hidrogênio e CO₂ que são gerados concomitantemente como subproduto destas reações (SARMA *et al.*, 2012).



De acordo com as reações acima, quando ácido acético, ácido butírico, butanol e etanol, são formados como subprodutos da via oxidativa do *Clostridium*, o hidrogênio

também é gerado, na proporção (mol:mol) glicerol:hidrogênio de 1:1, 1:2, 1:1 e 1:1, respectivamente.

3.2.1.2. Via Redutiva

A via redutiva de utilização do glicerol pelo *Clostridium* ocorre em duas etapas, na primeira o glicerol sofre uma desidratação sendo convertido a 3-hidroxiacetaldeído (3-HPA), essa reação é catalisada pela glicerol desidratase (GDHt) (EC 4. 2. 1. 30) (1, Figura 3), que via de regra é dependente de vitamina B₁₂ (coenzima B₁₂) (BIEBL *et al.*, 1999; YAZDANI e GONZALEZ, 2007) (Figura 3).

A enzima GDHt, dependente de equivalente redutor, na forma de NADH+H⁺, é formada por três polipeptídios ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) codificados, pelos genes *dhaB*, *dhaC* e *dhaE*, respectivamente (LIU *et al.*, 2016). No *Clostridium butyricum* a GDHt é independente da coenzima B₁₂, desta maneira, para este microrganismo é possível produzir 1,3-PDO sem a necessidade de vitamina B₁₂ (NAKAMURA e WHITED, 2003; O'BRIEN *et al.*, 2004; RAYNAUD *et al.*, 2003).

De acordo com Macis *et al.* (1998) a enzima glicerol desidratase presente no *C. butyricum* não possui homologia com outros gêneros de *Clostridium* e, portanto, as demais são todas dependentes da B₁₂. De acordo com estas informações, a glicerol desidratase de *C. beijerinckii* e de *C. pasteurianum* necessitam da vitamina B₁₂ (MACIS *et al.*, 1998).

Na segunda etapa da via redutiva, o 3-HPA é reduzido a 1,3-PDO através da ação da enzima 1,3-PDO desidrogenase (PDODH), conhecida também por 1,3-PDO oxidoreductase (PDOR), (EC 1.1.1.202) (2, Figura 3) que é dependente de equivalentes redutores, ou seja, de NADH+H⁺. Na Figura 4 é possível observar que a formação de 1,3-PDO só é possível pela interação das vias redutiva e oxidativa.

Os equivalentes redutores, na forma de NADH+H⁺, gerados pela oxidação do glicerol e que promovem o crescimento celular, são necessários para esta etapa, resultando na formação de 1,3-PDO. Dessa maneira, é possível afirmar que o rendimento de 1,3-PDO dependerá da competição por NADH no metabolismo do *Clostridium*. É importante ressaltar que a formação dos metabólitos da via oxidativa é essencial para que ocorra o balanço redox intracelular (Figura 5) (BIEBL, *et al.*, 1992; BIEBL *et al.*, 1999; TONG e CAMERON, 1992; YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Todavia, se as moléculas de NADH+H⁺, formadas no decorrer da via oxidativa, nas etapas 3 e 6 (Figura 3) forem

consumidas para formar os metabólitos das etapas 8, 13, 20, 22, 25, 26, 28, 29 e 30 (Figura 3), o rendimento de 1,3-PDO será menor. Isso pois, os equivalentes redutores que poderiam ser utilizados na via redutiva estão sendo utilizados na via oxidativa (BIEBL *et al.* 1999; NASCIMENTO *et al.* 2017; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

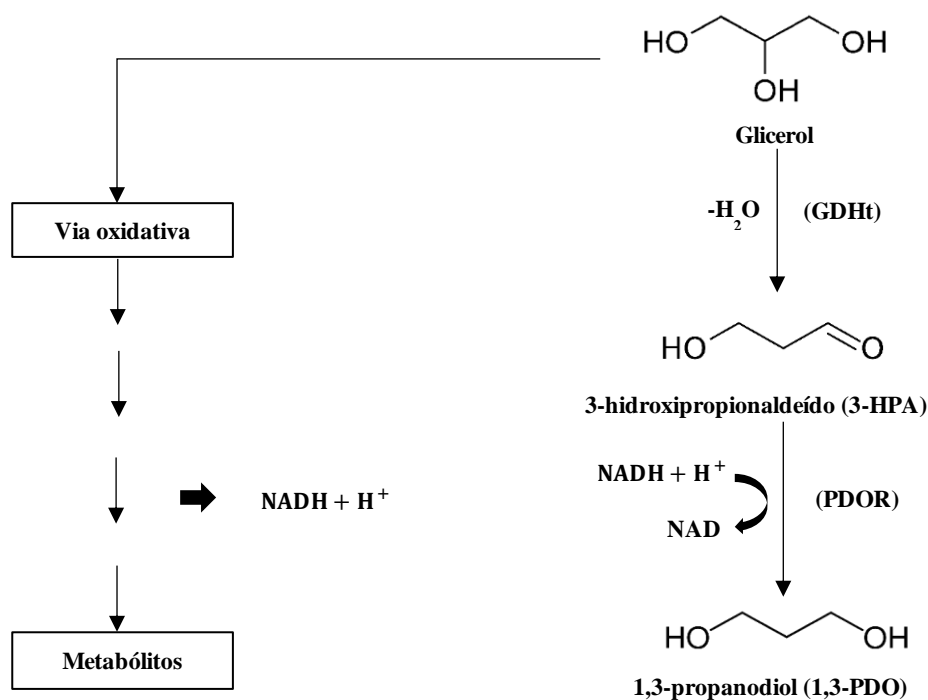


Figura 5. Inter-relação das vias oxidativa e redutiva do metabolismo do glicerol. Os equivalentes redutores (NADH_2) gerados na via oxidativa favorece a via redutiva do glicerol com a formação de 1,3-PDO (Fonte: Adaptado de ZENG e BIEBL, 2002).

A respeito da estequiometria global da reação de obtenção do 1,3-PDO, o rendimento máximo teórico por mol de glicerol é de $0,875 \text{ mol } 1,3\text{-PDO mol}^{-1}$ de glicerol, isso, pois, parte do glicerol é convertido a CO_2 de acordo com o balanço de massa apresentado pela Reação 8.



Contudo, a Reação 8 não é observada na prática, uma vez que dentre os microrganismos já estudados, estes não são capazes de converter todo o glicerol em apenas 1,3-PDO e CO_2 , gerando, portanto, outros subprodutos, conforme já mencionado. (TONG e CAMERON, 1992). De acordo com ensaios realizados por Tong e Cameron (1992), o rendimento teórico máximo será de $0,75 \text{ mol } 1,3\text{-PDO mol}^{-1}$ de glicerol para a

obtenção deste produto e, ocorrerá quando o ácido acético for o único metabólito formado (Reação 9).

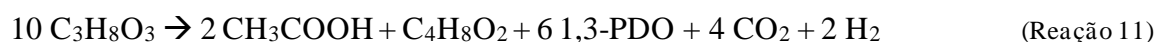


O rendimento de 0,75 mol 1,3-PDO mol⁻¹ de glicerol pode ser obtido de fato, uma vez que, na produção de ácido acético, não se faz necessário equivalentes redutores (NADH+H⁺) (Figura 3). Dessa forma, os equivalentes redutores gerados na via oxidativa podem ser utilizados na via redutiva, a qual a segunda etapa é dependente de NADH+H⁺. Dessa maneira, espera-se que os equivalentes redutores não sejam consumidos na via oxidativa e, uma vez acumulados, esses possam, subsequentemente favorecer a produção de 1,3-PDO (BIEBL, *et al.*, 1992; NAKAMURA e WHITED, 2003).

É possível obter uma mistura de subprodutos reduzindo ainda mais o rendimento teórico máximo de 1,3-PDO, onde o valor será de 0,67 mol 1,3-PDO mol⁻¹ de glicerol, com formação de ácido fórmico, além do ácido acético (Reação 10).



De acordo com Biebl *et al.*, (1992) quando se obtém ácido butírico e ácido acético, o rendimento máximo de 1,3-PDO é 0,6 mol 1,3-PDO mol⁻¹ de glicerol (Reação 11).



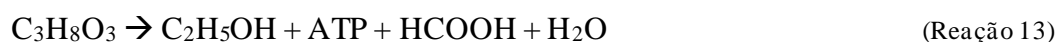
Apesar da possibilidade de conversão do glicerol em vários produtos de elevado valor agregado no meio fermentativo, o rendimento desses compostos pode ser afetado, tanto pelo tipo de microrganismo utilizado, quanto pelas condições empregadas, além da presença de inibidores (BIEBL *et al.*, 1999).

3.2.1.3. Fatores que influenciam na formação de 1,3-PDO

Existem diversos fatores que podem interferir na obtenção de 1,3-PDO, como por exemplo, condições de anaerobiose, falta ou excesso de nutrientes, pH, concentração de substrato, compostos intermediários tóxicos que podem ser formados durante a fermentação e também devido ao acúmulo dos produtos, como os ácidos orgânicos (BIEBL *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.* 2017; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

Além disso, para favorecer uma das vias metabólicas do glicerol é necessário avaliar qual parâmetro é o fator limitante no processo (BIEBL *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.* 2017; YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Um dos fatores que pode influenciar na fermentação do glicerol, ou qualquer outro substrato, é a composição do meio de cultura. O meio sintético possui vários compostos (nutrientes) que devem beneficiar tanto o crescimento dos microrganismos quanto auxiliar nas conversões do substrato em produtos, como por exemplo, soluções de vitaminas, as quais normalmente atuam como cofatores de enzimas (Tabela 2) (ANGELIDAKI *et al.*, 2004).

Estudos constataram que, uma vez que a fonte de carbono é o fator limitante, a tendência é que a via seja destinada para produção de ácido butírico e etanol – via na qual a produção de energia (ATP) é maior (Reações 12 e 13) e, não segue, portanto, para a via destinada a 1,3-PDO e do ácido acético. Contudo, considerando o microrganismo *C. butyricum*, basicamente, tanto o ácido acético, quanto o butírico são produzidos concomitantemente ao 1,3-PDO. Já para o *C. pasteurianum* o metabólito formado simultaneamente, segundo Biebl *et al.* (1999) é o butanol e, em alguns casos, este pode se tornar o principal produto.



Para Biebl *et al.* (1999) quando culturas de *K. pneumoniae* são utilizadas e a fonte de carbono é limitante são favorecidas a produção de células e etanol. E à medida que este produto é formado e acumulado, pode ocorrer inibição produto. Consequentemente, o glicerol disponível pode ser consumido levando a 1,3-PDO.

Tabela 2. Componentes necessários em um meio de cultura sintético (Fonte: ANGELIDAKI *et al.*, 2004).

Composto	Função celular	Substâncias químicas que suplementam o meio sintético
Nitrogênio (N)	Segundo composto mais abundante após o carbono. Elemento majoritário nos ácidos nucleicos e aminoácidos.	NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , N ₂ , KNO ₃
Fósforo (P)	Necessário em ácidos nucleicos e fosfolipídios.	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Enxofre (S)	Necessário nos aminoácidos cisteína e metionina, em vitaminas, como tiamina, biotina e ácido lipóico, coenzima A.	NaSO ₄ , KH ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₃ , Na ₂ S, cisteína.
Potássio (K)	É muito utilizado por diferentes enzimas	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnésio (Mg)	Estabiliza ribossomos, membranas celulares e ácidos nucleicos.	MgCl ₂ , MgSO ₄
Sódio (Na)	Necessário para muitas enzimas	NaCl
Cálcio (Ca)	Ajuda a estabilizar a parede celular bacteriana e é importante na estabilização de endósporos	CaCl ₂
Ferro (Fe)	Presentes nos citocromos	FeCl ₃ , FeSO ₄ , agentes quelantes de ferro complexados com EDTA.
Micronutrientes	Normalmente são necessários em enzimas específicas	Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, V, Zn.
Fatores de crescimento	Pequenas quantidades	Vitaminas, aminoácidos (essenciais), purinas, pirimidinas

Outro fator que pode interferir no desempenho da fermentação, como já mencionado anteriormente, é o pH. Para Lima *et al.*, (2001), de maneira geral, as espécies do gênero *Clostridium* spp. conseguem apresentar atividade dentro da faixa de pH ~4,5-8,0. Quando o pH está acima dessa faixa, pode haver inibição por causa dos solventes produzidos, o que afeta negativamente a fermentação. Como já mencionado anteriormente, uma concentração crítica de íons H⁺ no interior das células é prejudicial (LIMA *et al.*, 2001).

Além disso, podem ocorrer inibição tanto por excesso de substrato quanto de produtos. Em relação ao substrato, Gungormusler *et al.*, (2011b) concluíram que tanto para *K. pneumoniae* quanto *C. beijerinckii* NRRL B593 concentrações de glicerol acima de 80 g L⁻¹ (870 mmol L⁻¹) podem causar inibição. Utilizando *C. butyricum* Biebl (1991) também relatou a concentração de glicerol em 80 g L⁻¹ como limitante.

González-Pajuelo *et al.*, (2004) avaliaram a influência da concentração de glicerol, puro ou residual – 92% (m/v), no crescimento do microrganismo e para a produção de 1,3-PDO visando determinar a porcentagem de inibição por substrato. As concentrações estudadas variavam de 0-100 g L⁻¹ de glicerol. Para a concentração de 20 g L⁻¹, independente do glicerol, nenhuma inibição foi observada. Entre 20-100 g L⁻¹ a inibição observada variou linearmente com o aumento da concentração de ambos os tipos de glicerol.

Em relação a inibição por produtos, além da influência do acúmulo dos ácidos na forma não dissociada, conforme discutido anteriormente, pode ocorrer, por exemplo, a inibição devido ao acúmulo do composto intermediário da primeira etapa da via redutiva, o 3-HPA. Isso se deve ao fato que o 3-HPA é tóxico e pode reduzir a atividade enzimática (BARBIRATO *et al.*, 1996; BIEBL 2001). A enzima 1,3-PDO desidrogenase, além de catalisar a conversão de 3-HPA a 1,3-PDO também é responsável pela reação inversa, ou seja, é possível que ocorra o acúmulo deste produto, o que conseqüentemente, poderá causar inibição de todo o processo (NAKAMURA e WHITED, 2003). Portanto, o entendimento da bioquímica, bem como o monitoramento das atividades de enzimas envolvidas neste complexo processo de obtenção de 1,3-PDO é de fundamental importância para o avanço da área.

4. Materiais e Métodos

4.1. Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram o *Clostridium beijerinckii* Br21 isolado no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Energias Renováveis (FFCLRP, USP) com número de acesso no GenBank KT626859 (FONSECA *et al.*, 2019) e a cepa obtida da coleção de culturas *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, o *Clostridium pasteurianum* DSMZ 525. Ambas as espécies de *Clostridium* são descritas na literatura como biocatalisadores para a conversão de glicerol em 1,3-PDO, lembrando que a cepa Br21 não é solventogênica, devido a falta do gene *adc*. Dessa maneira, pretendeu-se utilizar este microrganismo nos ensaios fermentativos com glicerol como substrato e compará-lo com a cepa padrão DSMZ.

4.2. Composição e preparo dos meios de cultura

Na Tabela 3 estão descritas as composições dos meios de cultura utilizados. Os meios de cultura foram preparados todos com água deionizada, seguindo o mesmo processo de anaerobiose e esterilização. A composição do meio de cultura foi a mesma nas etapas de ativação, no pré-inóculo e no ensaio fermentativo (Figura 6).

A concentração de glicerol nos meios de cultura foi ajustada adicionando-se volumes de glicerol P.A. referentes à concentração de glicerol desejada no volume do meio de cultura. Para a etapa de ativação o volume preparado de meio foi 15 mL distribuídos em tubos tipo penicilina (50 mL), enquanto que para as etapas de pré-inóculo e ensaio foi de 56 mL distribuídos em tubos tipo penicilina (100 mL), realizadas em triplicata.

Gás nitrogênio (N₂) foi borbulhado, por 3 minutos, para garantir anaerobiose. Todos os frascos foram vedados e autoclavados em temperatura 121 °C e 1 atm, por 20 minutos (PRISMATEC). Depois de autoclavados os frascos contendo o meio de cultura foram resfriados à temperatura ambiente e armazenados sem a necessidade de refrigeração.

As denominações e abreviações dos meios de cultura foram realizadas para facilitar a escrita, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de fermentação.

Reagentes	Meios (L)				
	CH	RCM	RCM (mod)	TH	BL
K ₂ HPO ₄	-	5,0 g	5,0 g	1,5 g	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g	-	-	1,5 g	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g	-	-	0,492 g	0,2
MnSO ₄ .H ₂ O	-	-	-	0,015 g	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,045g	-	-	0,02 g	0,01 g
Ácido aminobenzóico	-	-	-	2,0 mg	-
Tiamina	-	-	-	2,0 mg	-
Biotina	-	-	-	0,4 mg	25 µg
Glicose	-	5,0 g	-	-	-
Amido	-	1,0 g	-	-	-
Ágar	-	0,5 g	0,5 g	-	-
Cisteína	-	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,3 g
Extrato de carne	-	10,0 g	10,0 g	-	-
Peptona	-	10,0 g	10,0 g	-	-
Acetato de sódio	-	0,005 g	0,005 g	-	-
Cloreto de sódio	1,0 g	3,0 g	3,0 g	-	-
Extrato de levedura	1,0 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	1,0 g
Na ₂ HPO ₄	5,0 g	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	5,0 g
CaCl ₂ .H ₂ O	-	-	-	-	0,02 g
Resazurina (1,0 g L ⁻¹)	1,0 mL	-	-	-	1,0 mL
SL7	-	-	-	-	2,0 mL
Solução	2,0 mL	-	-	-	-
Oligoelementos					
Reagentes Solução de Oligoelementos (g L ⁻¹)					
H ₃ BO ₃			2,03		
MnSO ₄ .4 H ₂ O			2,85		
FeCl ₃ .6 H ₂ O			0,167		
Reagentes SL7 (g L ⁻¹)					
HCl (25%)			1,0 mL		
ZnCl ₂			70 mg		
MnCl ₂ .4H ₂ O			100 mg		
H ₃ BO ₃			60 mg		
CoCl ₂ .6H ₂ O			200 mg		
CuCl ₂ .2H ₂ O			20 mg		
NiCl ₂ .6H ₂ O			20 mg		
NaMoO ₄ .2H ₂ O			40 mg		

*BL (modificado de BIEBL, 2001), CH (CHEN *et al.*, 2005), TH (TRCHOUNIAN *et al.*, 2017), RCM (WISCHRAL *et al.*, 2015) e RCM descrito por WISCHRAL *et al.*, (2015) com adição amido e glicose.

4.3. Preparo do inóculo

4.3.1. Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foram realizadas etapas prévias de ativação do microrganismo e de cultivo do pré-inóculo. A Figura 6 representa um esquema das etapas envolvidas para o inóculo dos ensaios fermentativos.

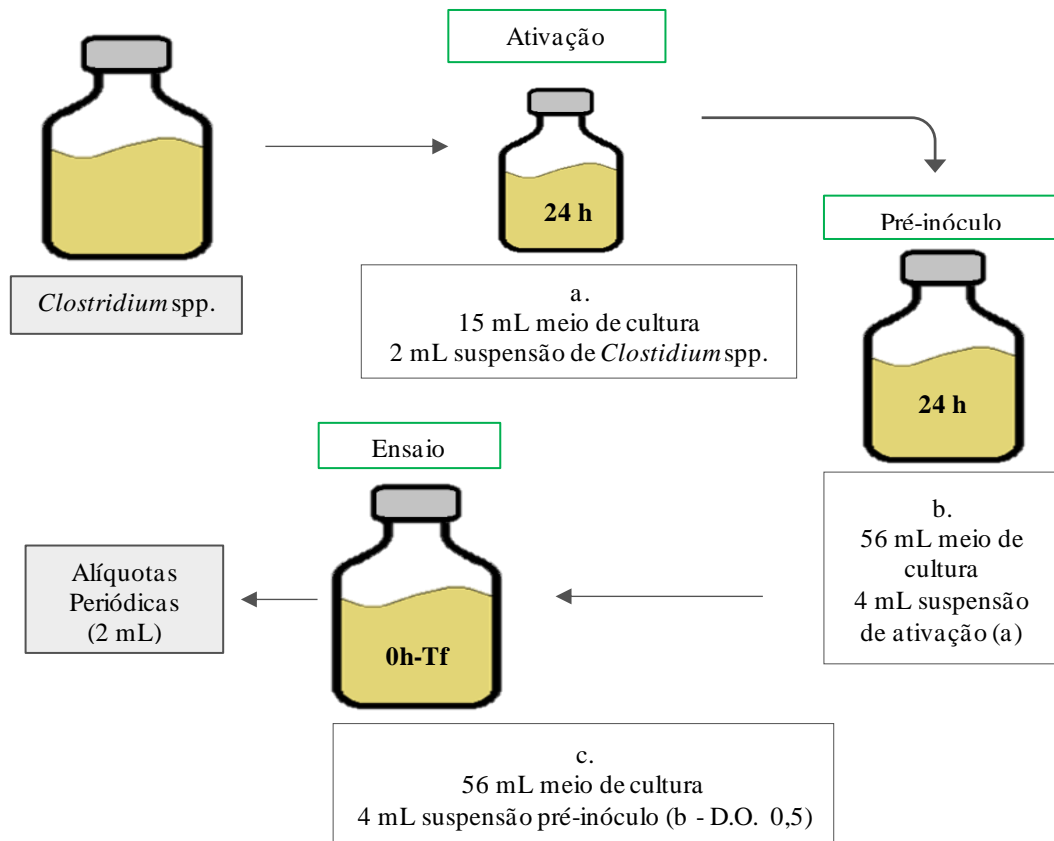


Figura 6. Esquema representativo na preparação do inóculo para os ensaios fermentativos (Fonte: autoria própria).

a. Ativação

Nos frascos de penicilina de 50 mL, contendo 15 mL do meio de cultura previamente preparado conforme item 4.2, em triplicata. Com uma seringa estéril, foram adicionados 2 mL de uma suspensão da cepa de *C. beijerinckii* ou *C. pasteurianum*, que estava acondicionado em meio RCM líquido sob refrigeração por no máximo 15 dias. Após a adição do microrganismo, os frascos foram incubados sob agitação constante na Incubadora de Bancada (CT-712 RN - CIENTEC) com velocidade de 125 RPM e em temperatura de 35 °C, por 24 horas, Figura 6 (a).

b. Pré-inóculo

Após a etapa de ativação, pelo período de 24 horas, com o uso de uma seringa estéril, 4 mL desta cultura foram inoculados em 56 ml de meio de cultura também preparado conforme item 4.2 e em triplicata. Em seguida os frascos foram incubados sob agitação constante na Incubadora de Bancada (CT-712 RN - CIENTEC) com velocidade de 125 RPM e em temperatura de 35 °C, *overnight*, Figura 6 (b).

c. Inóculo e ensaio

Para a realização dos ensaios de fermentação, foi medida a densidade ótica (D.O.) a 600 nm das culturas contidas nos frascos do pré-inóculo. Assim, foi possível calcular o volume do mesmo a ser adicionado ao ensaio para que a D.O. inicial fosse de 0,5 em 60 mL de meio de cultura. Em seguida os frascos foram incubados sob agitação constante na Incubadora de Bancada (CT-712 RN - CIENTEC) a 125 RPM e em temperatura de 35 °C, Figura 6 (c).

4.3.2. Inóculo e ensaios em biorreator de bancada

Nesta etapa foi utilizado somente o meio de cultura CH (Tabela 3). Para este ensaio não foi realizada a etapa de ativação do microrganismo. Dessa maneira, 45 mL de meio de cultura RCM sem glicose e amido, contendo glicerol 390 mM, foram distribuídos em um frasco do tipo penicilina (100 mL), em duplicata. Na sequência, gás nitrogênio (N₂) foi borbulhado por 3 minutos para garantir anaerobiose. Os frascos foram vedados, e, em seguida, o meio foi autoclavado a 121 °C e 1 atm, por 20 minutos e resfriado a temperatura ambiente.

Posteriormente, 5 mL de uma suspensão da cepa de *C. beijerinckii* ou *C. pasteurianum*, que estava acondicionada em meio RCM, sem glicose e amido, com adição de glicerol (390 mM), sob refrigeração, foram adicionados em cada frasco de penicilina previamente preparado. Após a adição do microrganismo os frascos foram incubados sob agitação na incubadora de bancada (CT-712 RN - CIENTEC) com agitação constante, velocidade de 125 RPM e em temperatura de 35 °C, por 24 horas.

Após o tempo estabelecido, o volume total de 100 mL foi adicionado ao fermentador contendo 900 mL do respectivo meio CH, já esterilizado e em anaerobiose. A agitação interna foi mantida em 60 RPM e a temperatura controlada em 35 °C. Para o

controle de pH a 7,0 foi utilizado NaOH 1M. Amostras de 2,0 mL foram coletadas ao longo do experimento com seringa estéril para determinação da concentração celular. Concomitantemente, foi realizado um ensaio nas mesmas condições, porém, sem o controle de pH em frascos de 2 litros, contendo o mesmo meio do ensaio. O frasco foi agitado 125 RPM.

4.4. Ensaio de fermentação

Os ensaios fermentativos (itens 4.4.1., 4.4.2. e 4.4.3.) foram realizados em batelada em frascos de 100 mL, com volume total de 60 mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas de forma independente, e os resultados apresentados como a média e seus desvios médios. Alíquotas de 2,0 mL foram coletadas ao longo de cada experimento com seringa estéril para determinação de pH, concentração celular e concentração dos produtos.

4.4.1. Ensaio com diferentes pHs iniciais

Foi utilizado glicerol na concentração 75 mM e os meios de cultura CH e TH para fermentação pela cepa *C. beijerinckii* Br21. Nestes ensaios de fermentação o pH inicial dos meios foram ajustados em 5,5, 6,5 e 7,5. Foram retiradas amostras no tempo inicial e no tempo final (62 horas) de fermentação para análise dos metabólitos solúveis e de hidrogênio.

4.4.2. Ensaio com diferentes composições de meio de cultura

Foram realizados ensaios cinéticos com glicerol 390 mM utilizando o microrganismo *C. beijerinckii* Br21 e os meios de culturas, descritos na Tabela 3, BL, CH, TH e RCM com e sem glicose e amido. O pH foi ajustado em 7. Amostras periódicas foram coletadas para determinação dos metabólitos e para o acompanhamento da concentração celular e pH.

4.4.3. Ensaio com diferentes concentrações iniciais de glicerol

Nesta etapa foram realizados ensaios cinéticos com a composição do meio CH (Tabela 3) adicionados de concentrações iniciais de 80, 170, 390 e 1000 mM de glicerol. O pH inicial foi ajustado em 7. Os microrganismos utilizados foram *C. beijerinckii* Br21

e *C. pasteurianum* DSMZ 525. Amostras periódicas foram coletadas para determinação dos metabólitos e para o acompanhamento da concentração celular e pH.

4.4.4. Ensaios em biorreator de bancada com controle de pH

Nesta etapa foram realizados ensaios cinéticos com glicerol 390 mM de glicerol por *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSMZ 525. Foi utilizado o meio CH (Tabela 3), com volume total de 1 L. O pH foi ajustado em 7 e controlado utilizando NaOH 1M. Para cada ensaio com controle de pH foi realizado concomitantemente e, nas mesmas condições, um ensaio sem o controle de pH. Os ensaios fermentativos em biorreator foram realizados em duplicata e em batelada em fermentador BioFlo®/CelliGen® 115 (New Brunswick). Alíquotas periódicas foram coletadas para determinação da concentração celular, pH, e análise dos produtos.

4.5. Determinação dos produtos de fermentação

Os produtos obtidos nos ensaios de fermentação foram determinados por Cromatografia a gás (CG). As amostras foram centrifugadas a 13400 RPM por 1,5 minutos e filtradas em seringa com filtro de *nylon* de 0,22 µm. Utilizou-se o equipamento GC-FID (SHIMADZU – 2014) com amostrador automático de líquidos. A separação foi realizada em uma coluna capilar Stabilwax®-DA (30 m, espessura de 0,25 µm 0,25 mm de ID). As condições de análises e preparo das amostras foram estabelecidas de acordo com Egoburo *et al.* 2017, onde a temperatura inicial do forno foi 185 °C por 3 min, em seguida, aumentada para 220 °C na taxa de 40 °C min⁻¹, mantida por 1 min.

A temperatura do injetor foi fixada em 290 °C e a do detector em 300 °C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio com fluxo de 2,5 mL min⁻¹. O volume de injeção foi 2 µL com taxa de divisão de 30:1. O intervalo entre as análises foi de 3 minutos, Etanol (P.A.) foi o solvente tanto para o preparo das amostras quanto para a limpeza. O tratamento de dados foi realizado pelo software GC-Solutions. Os produtos 1,3-PDO, ácido acético, ácido butírico e o glicerol consumido foram determinados por cromatografia a gás, de acordo com as curvas analíticas apresentadas no Anexo I.

Para a determinação de hidrogênio, a composição do gás do *head-space* foi realizada por cromatografia a gás, equipamento GC-TCD (SHIMADZU – 2014), com detector de condutividade térmica (TCD), a coluna utilizada foi de peneira molecular 5A,

com gás de arraste argônio com vazão de 30 mL min⁻¹, e as temperaturas utilizadas no injetor, da coluna e do detector foram de 80, 50 e 100 °C, respectivamente.

4.6. Conversão da concentração celular em massa seca

Ao longo dos ensaios realizados, as alíquotas coletadas, para determinação da concentração celular, do pH e dos produtos finais, foram centrifugadas a 13400 RPM por 1,5 minutos e filtradas em seringa com filtro de *nylon* de 0,22 µm e armazenadas a -16 °C até o momento das determinações analíticas.

Para a determinação da concentração celular foi utilizado o espectrofotômetro UV/Vis (BEL Engineering – UV - M51) para medida de densidade ótica (D.O.) em 600 nm. Os valores obtidos foram convertidos em concentração de massa celular seca em função do tempo. Para estabelecer a correlação entre esses parâmetros foi utilizada a Equação 1 obtida anteriormente em nosso laboratório, e para os experimentos realizados no fermentador de bancada, foi utilizada a Equação 2.

$$y = 0,0024x \quad (\text{Eq. 1})$$

$$y = 0,002x + 0,0182 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde y corresponde ao valor de absorvância medida e x corresponde ao valor da concentração celular em massa seca (mg L⁻¹).

4.7. Determinação dos parâmetros cinéticos

O fator de conversão (Y_{X/S}) de substrato em células foram calculados através da Equação 3, onde ΔX é a variação de concentração em massa seca (mg L⁻¹) ((X_f – X_i) e ΔS é a concentração de glicerol consumido (mM) (S_i – S_f).

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (\text{Eq. 3})$$

Foram calculados os rendimentos para o produto de interesse (Y_{P/S}) o em relação ao substrato consumido pela Equação 4, onde ΔP é a variação de concentração de 1,3-PDO em mM (P_f – P_i) e ΔS é a concentração de glicerol consumido (mM).

$$Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (\text{Eq. 4})$$

Comparando-se a conversão de substrato em produto com a teórica, dada pela estequiometria da reação, foi determinada a eficiência do ensaio (Equação 5). Onde $Y_{\text{TEÓRICO}}$ é o rendimento máximo (estequiométrico) que pode ser obtido para o produto, de acordo com as reações 4-11. Neste estudo, para cálculo da eficiência foi considerada apenas a Reação 11.

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}}{Y_{\text{TEÓRICO}}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

A produtividade (P) (Equação 6) foi calculada considerando a variação de concentração de 1,3-PDO (ΔP) (mM) e o intervalo de tempo (Δt) (h) da fermentação.

$$P = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad (\text{Eq. 6})$$

4.8. Análise estatística

Para comparar os parâmetros dos ensaios de fermentação, foi realizado uma análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância utilizando o software Statistica 7.0.

5. Resultados e Discussão

5.1. Influência do pH inicial na fermentação de glicerol

Nesta etapa foram utilizados apenas os meios CH e TH (Tabela 3), glicerol 75 mM e o *C. beijerinckii* Br21. Os pH iniciais estudados foram 5,5, 6,5 e 7,5. Partindo-se das amostras iniciais e finais (62 horas) dos ensaios fermentativos foram determinadas as concentrações de substrato consumido e dos produtos de fermentação (Tabela 4).

No meio CH, em pH inicial 5,5 não houve crescimento da bactéria, uma vez que, a variação de concentração celular (ΔX) foi de apenas 13,3 mg L⁻¹. Em pH inicial 6,5, foi observada a maior variação da concentração celular (393,7 mg L⁻¹). Já em pH inicial 7,5, o crescimento foi estatisticamente igual ao observado para o de mesmo valor de pH inicial em meio TH, sendo 234,2 e 280,4 mg L⁻¹ para os meios de cultura CH e TH, respectivamente (Tabela 4).

Quando o meio TH foi utilizado, o ensaio com pH inicial em 5,5 e 6,5 não apresentaram diferença significativa para a concentração celular. Trchounian *et al.*, (2017) estudaram a produção de 1,3-PDO por fermentação utilizando *C. beijerinckii* DSM 791 e glicerol (110 mM) como fonte de carbono. Foi realizado o controle de pH em 5,5 e 7,5. Em pH 7,5 foi observado maior crescimento celular comparado ao ensaio realizado em pH 5,5. Os autores relacionam este fato às atividades enzimáticas, principalmente da hidrogenase. Além disso, Trchounian *et al.*, (2017) observaram uma elevada atividade da enzima ATPase. O presente trabalho está de acordo com os resultados obtidos por Trchounian *et al.*, (2017), pois em pH inicial de 7,5 o crescimento celular (variação da concentração celular), em meio TH, foi maior comparado aos demais para o mesmo meio de cultura.

Chen *et al.*, (2005) avaliaram o crescimento celular do *C. butyricum* CGS5 em diferentes pH controlados, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,0, no meio CH e a sacarose como fonte de carbono. Similarmente, os autores relataram que o maior crescimento celular foi em pH controlado entre 6,0-6,5, sendo que em pH 5 não houve crescimento. No ensaio realizado com pH 5,5 os autores observaram baixo crescimento. Logo, os resultados obtidos no presente trabalho para os ensaios realizados com o meio CH tendo os pHs iniciais 5,5 e 6,5, e glicerol como fonte de carbono, estão de acordo com os encontrados por Chen *et al.*, (2005).

Tabela 4. Glicerol consumido, hidrogênio, concentração de ácido butírico e 1,3-PDO, variação da concentração celular (ΔX), fatores de conversão ($Y_{X/GLICEROL}$ e $Y_{1,3-PDO/GLICEROL}$), produtividade ($P_{1,3-PDO}$) e eficiência para a fermentação de glicerol (75 mM) por *C. beijerinckii* Br21 em 62 horas.

Meio de cultura	pH inicial	Glicerol consumido (mM) (g de C)	H ₂ (mM)	Ácido butírico (mM) (g de C)	1,3-PDO (mM) (g de C)	ΔX (mg L ⁻¹) (g de C)	Y _{1,3-PDO/GLICEROL} mM mM ⁻¹ (g g ⁻¹ de C)	Y _{X/GLICEROL} (g g ⁻¹ de C)	P _{1,3-PDO} (mM h ⁻¹)	Eficiência (%)
TH	5,5	9,7 ± 0,3 ^{de} (0,34 ± 0,01)	<0,1	3,2 ± 0,1 ^{cde} (0,16 ± 0,00)	4,7 ± 0,2 ^{cde} (0,17 ± 0,01)	120 ± 12,0 ^c (0,06 ± 0,00)	0,47 ± 0,01 ^a (0,47 ± 0,01)	0,17 ± 0,01 ^a	0,1 ± 0,0 ^{bcd}	78,4 ± 1,1
	6,5	15,8 ± 5,7 ^{cde} (0,57 ± 0,02)	0,2	3,9 ± 0,1 ^{cd} (0,19 ± 0,01)	6,5 ± 0,1 ^{cd} (0,23 ± 0,00)	160,4 ± 16,0 ^c (0,08 ± 0,01)	0,46 ± 0,19 ^a (0,46 ± 0,19)	0,16 ± 0,05 ^a	0,1 ± 0,0 ^{bcd}	76,6 ± 32,5
	7,5	24,7 ± 2,4 ^{cd} (0,89 ± 0,09)	0,9	7,3 ± 0,0 ^b (0,35 ± 0,00)	14,3 ± 0,7 ^b (0,51 ± 0,02)	280,4 ± 28,0 ^b (0,13 ± 0,01)	0,57 ± 0,09 ^a (0,57 ± 0,09)	0,15 ± 0,03 ^a	0,2 ± 0,0 ^{cd}	95,7 ± 15,9
CH	5,5	8,0 ± 0,0 ^{de} (0,29 ± 0,03)	<0,1	<0,1 ^f	<0,1 ^{de}	13,3 ± 1,3 ^d (0,01 ± 0,00)	<0,1 ^b	0,02 ± 0,00 ^d	<0,1 ^{bc}	<0
	6,5	51,1 ± 9,0 ^b (1,84 ± 0,64)	1,2	11,0 ± 0,8 ^a (0,53 ± 0,04)	24,4 ± 4,8 ^a (0,88 ± 0,17)	393,7 ± 39,4 ^a (0,19 ± 0,01)	0,62 ± 0,15 ^a (0,62 ± 0,15)	0,10 ± 0,01 ^b	0,4 ± 0,1 ^a	102,3 ± 25,0
	7,5	73,9 ± 1,5 ^a (2,66 ± 0,60)	0,3	2,5 ± 0,0 ^{de} (0,12 ± 0,01)	4,6 ± 0,3 ^{cde} (0,17 ± 0,01)	234,2 ± 23,4 ^b (0,11 ± 0,01)	0,06 ± 0,00 ^b (0,06 ± 0,00)	0,04 ± 0,00 ^c	0,1 ± 0,0 ^{bcd}	10,4 ± 0,8

*As diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa entre os diferentes meios de culturas com diferentes valores de pH inicial, conforme revelado pelo teste de Tukey, p <0,05.

*Cálculo realizado considerando a fórmula da massa celular: C₄H₇O₂N (BIEBL, 2001).

*C: carbono.

*Eficiência calculada considerando Y_{1,3-PDO/GLICEROL(máximo)}: 0,6 g g⁻¹ de carbono.

Em relação aos metabólitos, quando o meio TH foi utilizado com pH inicial de 7,5, maiores concentrações de 1,3-PDO, ácido butírico e de substrato consumido foram observadas: 14,3, 7,3 e 24,7 mM, respectivamente (Tabela 4). Para os demais, em meio TH, com pH inicial de 6,5 e de 5,5, as concentrações foram inferiores (Tabela 4). Embora o ensaio com pH inicial de 7,5 tenha sido o qual houve a maior produção de 1,3-PDO, em todos o fator de conversão ($Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$) permaneceu elevado, entre 0,4 e 0,6 mM 1,3-PDO mM^{-1} glicerol. Isso se deve ao baixo consumo de substrato, especialmente nos ensaios com pHs 5,5 e 6,5 sendo 9,7 e 15,8, respectivamente, e 24,7 mM de glicerol para o ensaio com pH inicial 7,5.

No ensaio realizado por Trchounian *et al.*, (2017), quando somente glicerol (110 mM) foi utilizado como fonte de carbono, o substrato foi totalmente consumido levando a produção de 40 mM de 1,3-PDO e 15 mM de ácido butírico como segundo metabólito majoritário. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os encontrados por Trchounian *et al.*, (2017), onde o metabólito majoritário foi 1,3-PDO seguido de ácido butírico produzido concomitantemente (Tabela 4). As menores concentrações obtidas neste trabalho, quando comparadas com as observadas por Trchounian *et al.*, (2017), provavelmente se devem ao baixo consumo de substrato pela cepa *C. beijerinckii* Br21 tendo em vista o obtido pelos autores para *C. butyricum*.

Considerando o ensaio realizado para o meio CH em diferentes pH iniciais, em pH 5,5 não foi observada a produção de 1,3-PDO e nem de ácido butírico, indicando que neste valor de pH nenhuma das vias do metabolismo do glicerol é realizada, como já era esperado devido ao baixíssimo crescimento celular. Em pH inicial de 6,5 foi observada a maior produção tanto de 1,3-PDO quanto de ácido butírico, 24,4 e 11,0 mM, respectivamente; com fator de conversão de 0,62 mM 1,3-PDO mM^{-1} glicerol, e a maior produtividade, 0,4 mM 1,3-PDO h^{-1} (0,03 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$). Já em pH inicial 7,5 no meio CH foram detectados apenas 4,6 mM de 1,3-PDO e 2,5 mM de ácido butírico. Estes resultados indicam que, para o meio de cultura CH, tendo pH inicial em 6,5 a produção de 1,3-PDO é favorecida comparado aos demais pH iniciais estudados.

Comparando-se os resultados obtidos entre os dois meios de cultura e considerando os pH iniciais, é possível notar que os valores de pH mais adequados para a fermentação de glicerol visando a produção de 1,3-PDO dependem da composição do meio de cultura. Considerando este estudo preliminar, pode-se concluir que a faixa mais adequada de pH para a obtenção do 1,3-PDO pela cepa Br21 varia entre 6,5 e 7,5.

Gonen *et al.* (2013) avaliaram a produção de 1,3-PDO com glicerol residual por meio da fermentação por uma cultura imobilizada de *C. beijerinckii* NRRL B-593 em biorreator com pH fixo entre 6-6,5. Mantendo o pH dentro dessa faixa, os autores observaram rápida fase lag (2 horas), enquanto a fase exponencial durou de 8-10 horas e, em 12 h o microrganismo já havia chegado a fase estacionária. Os rendimentos de 1,3-PDO variaram entre 0,30-0,77 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol.

Em outro estudo comparativo sobre a produção de 1,3-PDO pela cultura imobilizada de *C. beijerinckii* NRRL B-593 e um isolado de *K. pneumoniae*, com glicerol (20 g L⁻¹), pH controlado em pH 7, por 24 horas, o rendimento encontrado foi de 0,60 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol com produtividade de 0,5 g L⁻¹ h⁻¹ para o microrganismo *C. beinjerinckii*, e 0,61 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol e 1,3 g L⁻¹ h⁻¹ para a *K. pneumoniae*, respectivamente (Gungormusler *et al.* (2011b).

Em nossos ensaios também foi determinada a concentração de H₂ no *headspace* do frasco de fermentação, uma vez que este produto está diretamente relacionado com as reações de oxidação e redução do *C. beijerinckii*. Foi possível associar maiores concentrações deste composto à obtenção de 1,3-PDO, ou seja, as melhores condições para a geração de 1,3 -PDO também promoveram as maiores concentrações de H₂, onde, 0,9 e 1,2 mM de hidrogênio foram detectados para os ensaios com pH inicial de 7,5 e 6,5 para os meios TH e CH, respectivamente. Esta mesma correlação também foi observada por Trchounian *et al.*, (2017).

Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o meio CH com o pH inicial em 6,5 são as condições mais adequadas para a obtenção de 1,3-PDO pelo *C. beinjerinckii* Br21. Neste pH tanto o crescimento celular quanto a via redutiva foram favorecidos.

5.2. Influência de diferentes composições de meio de cultura na fermentação de glicerol

Nesta parte do trabalho foram empregadas quatro composições de meio de cultura descritos na literatura, o RCM, RCMmod, CH, TH e BL (Tabela 3), para a fermentação de 390 mM de glicerol por *C. beijerinckii* Br21, em pH inicial 7.

Os ensaios realizados com os meios de cultura CH e BL foram os que apresentaram maior crescimento celular (Figura 7A), representados pela variação da concentração celular (ΔX) 615,5 e 590,0 mg L⁻¹, respectivamente, valores estes estatisticamente iguais (Tabela 5). O rápido crescimento celular correspondeu com a acentuada queda do pH dos meios. O decaimento de pH observado para os respectivos meios de cultura, CH e BL, foram de 1,4 e 2,1, indicando a formação dos ácidos orgânicos (Figura 7B).

Considerando os meios de cultura RCM, o meio original (presença dos carboidratos – glicose e amido) apresentou maior crescimento celular, ou seja, maior variação da concentração celular (ΔX) de 425,4 mg L⁻¹. Já quando essas fontes adicionais de carbono foram retiradas, ou seja, meio RCMmod, a variação da concentração celular diminuiu para de 350,5 mg L⁻¹, indicado que esta composição foi mais limitante para o crescimento celular, em relação ao meio RCM original. A variação de pH (ΔpH) para o meio com os carboidratos foi de 1,6, enquanto no meio modificado esta variação foi de 1,3 unidades de pH.

A fermentação de glicerol no meio de cultura TH apresentou variação da concentração celular similar à do meio RCMmod, 348,1 mg L⁻¹, indicando que esta composição de meio tem a mesma influência no que se refere ao crescimento celular. Também foi observado o decaimento de pH 1,6 unidades, indicando a formação dos ácidos orgânicos (Tabela 5).

De maneira geral, considerando apenas o crescimento celular (variação da concentração celular) (Tabela 5), os meios de cultura que apresentaram resultados promissores para o microrganismo *C. beijerinckii* Br21 foram os CH e BL.

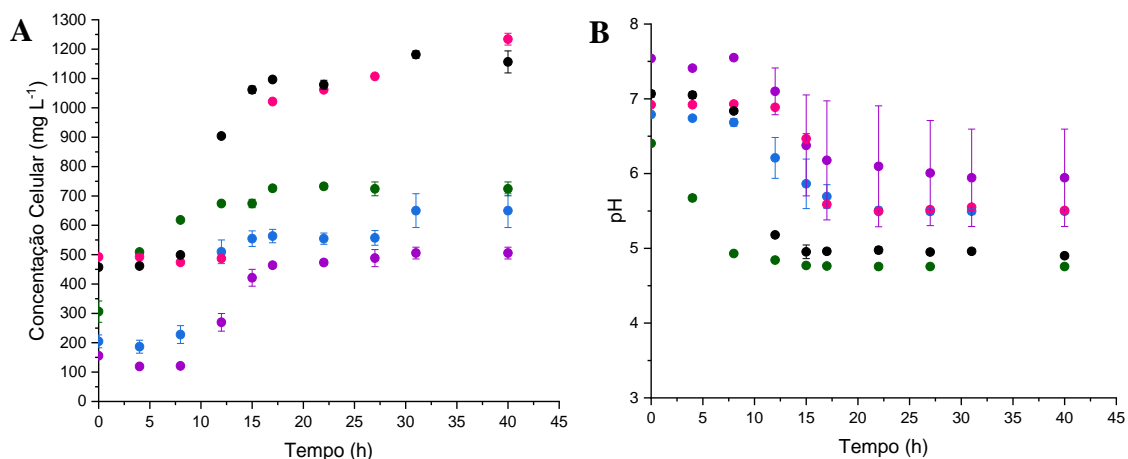


Figura 7. A. Concentração celular de *C. beijerinckii* Br21. B. pH em função do tempo de fermentação utilizando os meios (●) CH, (●) TH, (●) RCM, (●) RCMmod e (●) BL e glicerol 390 mM.

A Tabela 5 apresenta os resultados referentes ao consumo de substrato, as concentrações de metabólitos produzidos, entre outros dados para os diferentes meios de cultura utilizados. No meio RCM original, não foi observada a formação de 1,3-PDO, ou seja, os carboidratos presentes no meio RCM favoreceram, de fato, apenas a via oxidativa. A Figura 8 representa os cromatogramas, inicial e final, obtidos utilizando o meio RCM, no tempo zero e após 40 horas de fermentação com 390 mM de glicerol, no qual aparece o ácido butírico e o glicerol não consumido. A variação de consumo de glicerol foi de apenas 28,2 mM. Com base nesses resultados, é possível propor que o microrganismo consome majoritariamente as fontes de carboidratos disponíveis em detrimento do glicerol presente no meio e, ainda que, a via oxidativa é favorecida, uma vez que foram detectados 23,6 mM de ácido butírico.

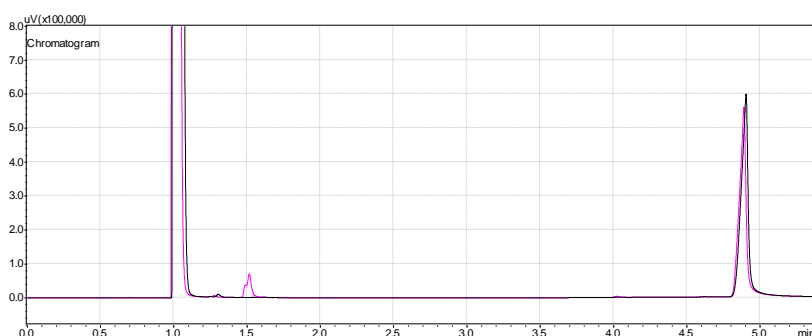


Figura 8. Sobreposição dos cromatogramas inicial (linha preta) e após 40 horas (linha rosa) obtidos na fermentação de glicerol 390 mM por *C. beijerinckii* Br21, utilizando o meio RCM original. Os picos referem-se ao solvente (etanol), ácido butírico e glicerol, respectivamente, em 1, 1,5 e 4,9 minutos.

Tabela 5. Variação da concentração celular (ΔX), variação de pH (ΔpH), pH final, glicerol consumido, metabólitos produzidos, fatores de conversão ($Y_{X/GLICEROL}$, $Y_{1,3-PDO/GLICEROL}$), produtividade ($P_{1,3-PDO}$) e eficiência obtidos para a fermentação de glicerol 390 mM por *C. beijerinckii* Br21 em diferentes meios de cultura em 40 horas..

Meio de cultura	ΔX (mg L ⁻¹) (g de C)	ΔpH	pH final	Glicerol consumido (mM) (g de C)	1,3-PDO (mM) (g de C)	Ácido acético (mM) (g de C)	Ácido butírico (mM) (g de C)	$Y_{1,3-PDO/GLICEROL}$ mM mM ⁻¹ (g g ⁻¹ de C)	$Y_{X/GLICEROL}$ mM mM ⁻¹ (g g ⁻¹ de C)	$P_{1,3-PDO}$ (mM h ⁻¹)	Eficiência (%)
CH	615,5 ± 2,5 ^a 0,29 ± 0,00	1,4 ± 0,1 ^{bcd}	5,5 ± 0,1 ^b	89,2 ± 2,2 ^b 3,21 ± 0,08	40,1 ± 0,1 ^a 1,44 ± 0,02	4,6 ± 0,1 ^a 0,11 ± 0,00	16,9 ± 0,1 ^b 0,81 ± 0,01	0,44 ± 0,02 ^a (0,44 ± 0,02)	0,09 ± 0,00 ^b	1,0 ± 0,0 ^a	73,2 ± 2,7
BL	590,0 ± 0,1 ^a 0,28 ± 0,00	2,1 ± 0,1 ^a	4,9 ± 0,1 ^c	149,4 ± 5,0 ^a 5,38 ± 0,18	22,7 ± 0,2 ^b 0,88 ± 0,01	<0,1 ^c	8,5 ± 0,1 ^d 0,41 ± 0,00	0,16 ± 0,00 ^b (0,16 ± 0,00)	0,05 ± 0,00 ^c	0,5 ± 0,0 ^b	26,0 ± 0,3
RCM	425,4 ± 20,8 ^b 0,20 ± 0,01	1,6 ± 0,1 ^{bcd}	4,7 ± 0,1 ^c	28,2 ± 3,7 ^d 1,02 ± 0,13	<0,1 ^d	<0,1 ^c	23,6 ± 0,1 ^a 1,14 ± 0,07	<0,1 ^c	0,21 ± 0,02 ^a	<0,1 ^d	<0
RCMmod	350,5 ± 32,5 ^c 0,17 ± 0,01	1,3 ± 0,1 ^{be}	5,5 ± 0,1 ^b	55,8 ± 5,0 ^c 2,01 ± 0,18	24,3 ± 2,6 ^b 0,88 ± 0,09	<0,1 ^c	13,5 ± 1,7 ^c 0,54 ± 0,04	0,44 ± 0,01 ^a (0,44 ± 0,01)	0,09 ± 0,03 ^b	0,6 ± 0,1 ^b	72,5 ± 1,3
TH	348,1 ± 27,7 ^c 0,17 ± 0,01	1,6 ± 0,1 ^{bcd}	5,9 ± 0,2 ^a	24,7 ± 0,2 ^d 0,89 ± 0,01	11,9 ± 0,1 ^c 0,43 ± 0,00	3,8 ± 0,1 ^b 0,09 ± 0,03	8,9 ± 0,1 ^d 0,40 ± 0,00	0,48 ± 0,09 ^a (0,48 ± 0,09)	0,19 ± 0,06 ^a	0,3 ± 0,1 ^c	80,7 ± 14,3

*Meio RCM descrito por WISCHRAL *et al.*, (2015) com glicose e amido e meio RCMmod descrito por WISCHRAL *et al.*, (2015).

*As diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa entre os diferentes meios de culturas com diferentes valores de pH inicial, conforme revelado pelo teste de Tukey, p <0,05.

*Cálculo realizado considerando a fórmula da massa celular: C₄H₇O₂N (BIEBL, 2001).

*C: carbono.

*Eficiência calculada considerando $Y_{1,3-PDO/GLICEROL(máximo)}$: 0,6 g g⁻¹ de carbono.

Wischrál *et al.*, (2015) avaliaram diversos compostos que usualmente estão presentes nos meios de cultura e que podem influenciar na produção de 1,3-PDO por *C. beijerinckii* DSM 791. Este estudo foi baseado em uma otimização estatística. Dentre os compostos estudados está a glicose. Os autores concluíram que a presença de glicose no meio de cultura não influencia positivamente a formação de 1,3-PDO, ou seja, não favorece a via redutiva do glicerol por *C. beijerinckii*. Com base nos resultados apresentados e de acordo com a literatura, a via redutiva do glicerol por *C. beijerinckii* não é favorecida quando fontes adicionais de carbono, como a glicose, são utilizadas no meio de cultura.

Já para o ensaio realizado sem a presença dos carboidratos, ou seja, RCMmod, a concentração de ácido butírico foi menor do que o observado para o meio padrão, 13,5 mM, e houve a formação de 1,3-PDO, 24,3 mM, com consumo de 55,8 mM de glicerol, com fator de conversão ($Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$) de 0,44 mM mM⁻¹. Portanto, quando as fontes adicionais de carbono foram retiradas, a via redutiva do *Clostridium* foi favorecida, aumentando a produtividade de <0,1 para 0,6 mM de 1,3-PDO h⁻¹, respectivamente.

Para a mesma composição do meio de cultura (RCMmod) e tendo glicerol inicial 87 mM Wischrál *et al.*, (2015) obtiveram rendimento de 0,6 mol mol⁻¹ de 1,3-PDO utilizando uma cepa de *C. beijerinckii* DSM791. De acordo com os autores, valores próximos a estes são usualmente obtidos nos estudos realizados com cepas de *Clostridium*. Dessa maneira, o presente trabalho está de acordo com os valores esperados com base na literatura, embora este tenha sido em detrimento do baixo consumo de substrato.

Os dados obtidos para o meio BL apresentados na Tabela 5 indicam que esta composição de meio de cultura propiciou o maior consumo de substrato 149,4 mg L⁻¹, embora tenha produzido apenas 22,7 mM 1,3-PDO, resultado análogo ao observado para o meio de cultura RCMmod, porém, com $Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$ de 0,16 mM mM⁻¹. No meio de cultura BL não foi observada a presença de ácido acético, somente butírico 8,5 mM. A produtividade foi de 0,5 mM 1,3-PDO h⁻¹. Esta composição de meio de cultura é muito descrita na literatura para a fermentação do glicerol por cepas de *Clostridium*, mais especificamente, *C. pasteurianum* DSMZ 525, para a produção de butanol e/ou 1,3-PDO (BIEBL, 2001).

Quando o meio de cultura TH foi utilizado, o consumo de substrato foi baixo, assim como para o meio de cultura RCM, sendo de 24,7 mM. Esse baixo consumo de substrato levou a menor concentração de 1,3-PDO dentre os meios estudados, 11,9 mM,

com $Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$ de $0,48 \text{ mM mM}^{-1}$. Utilizando esta composição de meio de cultura foram observados os ácidos acético e butírico, 3,8 e 8,9 mM, respectivamente. O fator de conversão foi elevado devido ao baixo consumo de substrato.

Em relação ao ensaio com o meio de cultura CH foi observada a maior concentração de 1,3-PDO, 40,1 mM, com o consumo de 89,2 mM de glicerol. O ácido butírico foi detectado, 16,9 mM, porém juntamente com o acético, 4,6 mM, o qual está relacionado com a via de formação do 1,3-PDO (Reação 11). O fator de conversão para esse ensaio foi de $0,44 \text{ 1,3-PDO mM}^{-1} \text{ glicerol}$ com a maior produtividade de $1,0 \text{ mM 1,3-PDO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

A Figura 9 representa os cromatogramas inicial e final da fermentação do glicerol (390 mM) por *C. beijerinckii* Br21 com o meio CH. É possível identificar todos os produtos formados bem como a concentração de glicerol não consumido.

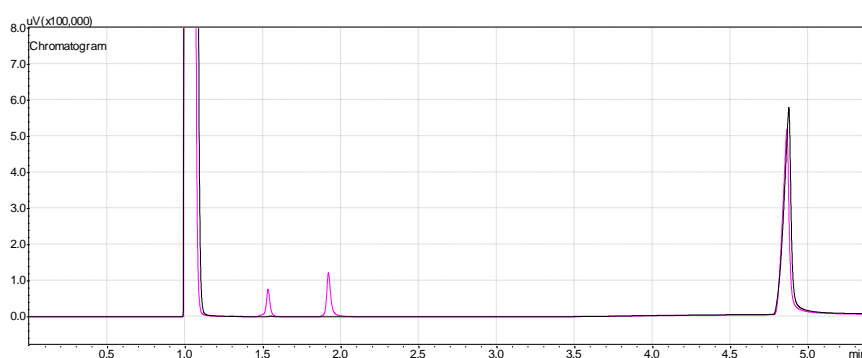


Figura 9. Sobreposição dos cromatogramas inicial (linha preta) e após 40 horas (linha rosa) obtidos na fermentação de glicerol 390 mM por *C. beijerinckii* Br21, utilizando o meio CH. Os picos referem-se ao solvente (etanol), ácido butírico, 1,3-PDO e glicerol, respectivamente, em 1, 1,5, 1,8 e 4,9 minutos.

Em relação a composição do meio de cultura CH, o extrato de levedura estava presente em maior concentração e este fato deve ser levado em consideração, uma vez que, o extrato também é fonte de vitaminas e isso pode ter tido um efeito positivo sobre a formação de 1,3-PDO. Conforme descrito na revisão de literatura uma das enzimas chave na via biossintética do 1,3-PDO é a glicerol desidratase, dependente de vitamina B_{12} em *C. beijerinckii*. Além disso, o meio CH conta com compostos como Na_2HPO_4 e a solução de oligoelementos, que podem ter auxiliado na produção dos equivalentes redutores para serem utilizados na via redutiva; onde de acordo com a Tabela 2 são compostos, normalmente utilizados em meios sintéticos, que podem influenciar benéficamente o desempenho dos microrganismos durante processos fermentativos.

No estudo de otimização da composição do meio de cultura para a produção de 1,3-PDO por *C. beijerinckii* DSM 791 feito por Wischral *et al.*, (2015) o efeito de diversos compostos, tais como glicose, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, extrato de levedura, acetato de sódio, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 e ureia foi estudado. De acordo com os autores, dos compostos analisados, apenas o extrato de levedura, o acetato de sódio e o fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) influenciam positiva e significativamente a obtenção de 1,3-PDO. Avaliando-se os tipos dos meios de cultura estudados em relação a esses compostos (Tabela 3), o meio CH não possui K_2HPO_4 , mas este composto está presente nos meios RCM e TH, ou seja, o efeito positivo deste composto não foi confirmado no presente estudo. Isso, pois, a eficiência de 1,3-PDO referente ao meio TH (~80%) deve-se ao baixo consumo de substrato, uma vez que, neste meio foi observada a menor concentração de 1,3-PDO.

Curiosamente, no meio CH que não contém solução de vitaminas e nem o K_2HPO_4 , foi justamente o que apresentou maior concentração de 1,3-PDO (Tabela 5). Além do meio RCM, o meio de cultura TH também possui diferentes compostos como as vitaminas tiamina e biotina, bem como o ácido amino benzóico e cisteína que não estão presentes no meio CH. O extrato de levedura parece ter papel fundamental, pois este meio possui maior concentração deste nutriente. O extrato de levedura também é fonte de vitaminas, principalmente do complexo B. Além disso, o meio CH conta com $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2HPO_4 , bem como a solução de oligoelementos, que podem ter auxiliado na produção dos equivalentes redutores necessários na via reductiva.

Estes resultados sugerem que meios ricos em nutrientes e principalmente na presença de outras fontes de carbono facilmente assimiláveis como os carboidratos, não favorecem a obtenção de 1,3-PDO. E, ainda que, a presença de glicose inibe a utilização do glicerol como substrato, bem como seu destino na via reductiva. Embora, estudos apontem que a adição de carboidrato ao glicerol como fonte de carbono pode estimular a formação de 1,3-PDO (TRCHOUNIAN, *et al.*, 2017).

Dessa maneira, dentre os meios de cultura estudados, o que mostrou maior potencial para a obtenção de 1,3-PDO foi o meio CH.

5.3. Influência da concentração inicial de glicerol para a obtenção de 1,3-PDO

Nesta etapa do trabalho foi utilizado apenas o meio CH (Tabela 3) tendo em vista que este foi o mais apropriado a obtenção de 1,3-PDO, de acordo com os resultados anteriormente discutidos.

As concentrações iniciais de glicerol no meio CH foram 80, 170, 390 e 1100 mM e os ensaios conduzidos tanto para com o *C. beijerinckii* Br21, quanto com o *C. pasteurianum* DSMZ 525, tendo pH inicial em 7, por 25,5 horas. Partindo-se da coleta de alíquotas periódicas foi possível construir a curva de variação da concentração celular e o pH para as fermentações conduzidas com diferentes concentrações de glicerol com o *C. beijerinckii* Br21 e o *C. pasteurianum* DSMZ 525, Figuras 10 e 11, respectivamente.

Para o *C. beijerinckii* Br21, os ensaios contendo 170 e 390 mM de glicerol, apresentaram maior variação de concentração celular (Figura 10A), sendo 328,1 e 298,1 mg L⁻¹, respectivamente. Enquanto na concentração mais baixa (80 mM) e mais elevada (1100 mM), o crescimento celular foi menor (Figura 10A), sendo 200,8 e 230,2 mg L⁻¹, respectivamente. Além disso, na concentração de 1100 mM de glicerol a fase lag foi mais longa, de aproximadamente 20 horas. Portanto, pode-se afirmar que concentrações de 170 e 390 mM de glicerol foram as mais adequadas para o crescimento celular deste microrganismo.

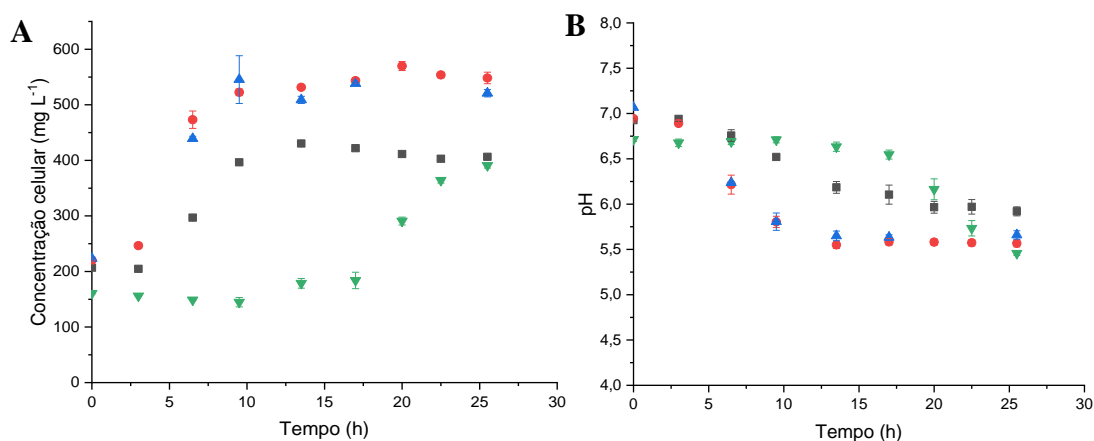


Figura 10. A. Concentração celular. B. pH. Obtidos na fermentação de glicerol 80 mM (■); 170 mM (●); 390 mM (▲) e 1100 mM (▼) por *C. beijerinckii* Br21 utilizando meio CH. Dados em função do tempo (h).

O crescimento celular está associado a formação dos ácidos orgânicos (acético e butírico) e conseqüentemente a diminuição de pH (ZENG e BIEBL, 2002). Dessa maneira, é possível observar que para o *C. beijerinckii* Br21 (Figura 10B) todos os ensaios

apresentaram semelhantes variações de pH, cerca de 1,4 unidades (Tabela 6), atingindo pH final de aproximadamente 5,7. Esses valores foram observados apesar do menor crescimento celular e do decaimento menos acentuado de pH nos ensaios com as concentrações mais baixas e a mais elevada de glicerol (80 e 1100 mM).

Para o *C. pasteurianum* DSMZ 525, (Figura 11A) observa-se que nos ensaios em todas as concentrações de glicerol, ou seja, entre 80 e 1100 mM apresentaram, ao final da fermentação, concentrações celulares similares. Os valores de variação de concentração celular (ΔX) foram de 362,9, 335,6, 332,1 e 367,7 mg L⁻¹ para as concentrações 80, 170, 390 e 1100 mM de glicerol, respectivamente. Portanto, é possível afirmar que o *C. pasteurianum* DSMZ 525, ao contrário do *C. beijerinckii* Br21, na faixa de concentração de glicerol estudada, não apresenta inibição por substrato, no que se refere ao crescimento celular. A variação de pH também apresentou comportamento semelhante, cerca de 1,9 unidades, apesar da concentração de 170 mM ter apresentado maior fase lag (Figura 11B).

Biebl (2001) avaliou a inibição causada pelo substrato e pelos produtos durante a fermentação de glicerol por *C. pasteurianum* DSMZ 525, com pH fixo 6,0. Foram estudadas diferentes concentrações de glicerol (30 – 115 g L⁻¹). Segundo o autor, tanto inibição por substrato quanto por produto começaram a ser observadas quando a concentração de glicerol ultrapassou 60 g L⁻¹ (~650 mM). No presente estudo, para a concentração de 1100 mM de glicerol (100 g L⁻¹) houve crescimento celular e decaimento de pH, assim como para as demais concentrações, o que indica a possível formação de metabólitos como ácido acético e butírico.

Sarchami *et al.*, (2016) avaliaram a produção de 1,3-PDO pela fermentação de glicerol (~330 mM) por *C. pasteurianum* DSMZ 525 em diferentes pH 4,7, 5,0, 5,3, 5,6, 5,9. Os autores observaram que em valores mais baixos de pH, o crescimento celular diminuía, levando a fermentações mais lentas e, direcionando o metabolismo para a formação de butanol, com alto rendimento. Nas fermentações com os pH mais altos, além de maior crescimento celular, a via do 1,3-PDO era favorecida. Dessa maneira, supõe-se que o pH inicial do presente estudo em 7 auxiliou no controle da inibição por substrato para o ensaio de 1100 mM de glicerol.

Em relação a cepa *C. beijerinckii* Br21 para esta mesma concentração a variação do crescimento celular foi menor do que a observada para a cepa *C. pasteurianum*, como já mencionado. O *C. beijerinckii*, mesmo em pH inicial 7, sofreu alguma inibição em concentrações elevadas de glicerol.

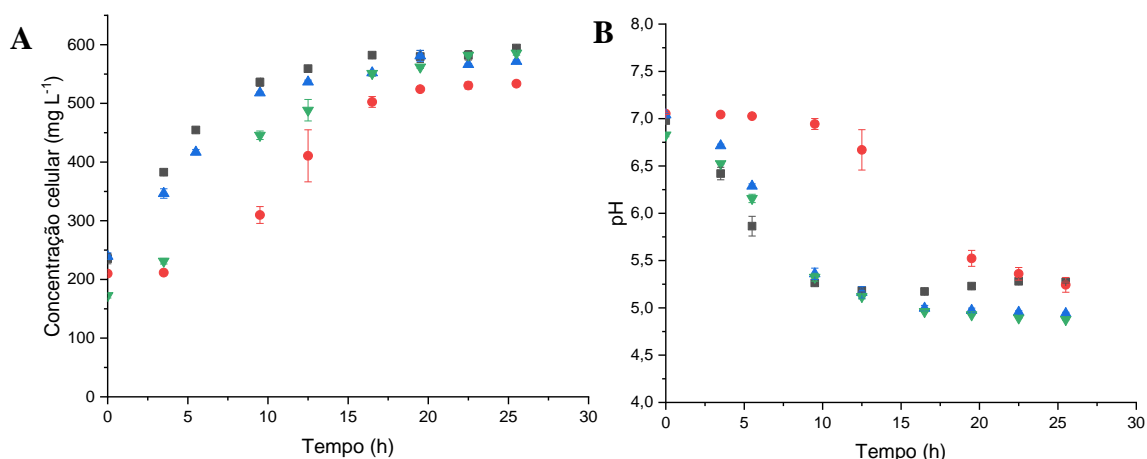


Figura 11. A. Concentração celular. B. pH. Obtidos na fermentação de glicerol 80 mM (■); 170 mM (●); 390 mM (▲) e 1100 mM (▼) por *C. pasteurianum* DSMZ 525 utilizando meio CH. Dados em função do tempo (h).

As Figuras 12 e 13 apresentam a cinética de formação dos produtos (1,3-PDO, ácido acético e ácido butírico) e consumo de substrato decorrentes da fermentação de glicerol por *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSMZ 525 em meio CH para todas as concentrações de glicerol estudadas neste trabalho.

Nas fermentações conduzidas com o *C. beijerinckii* Br21, de maneira geral, é possível observar a concomitante formação de ácido butírico com o 1,3-PDO. As concentrações iniciais de 170 e 390 mM de glicerol apresentaram perfis de concentração dos metabólitos semelhantes, embora no ensaio com a concentração 170 mM de glicerol o consumo de substrato tenha sido maior. Para esta mesma concentração é possível observar uma leve diminuição da concentração de ácido acético relacionado com a produção de 1,3-PDO (Figura 12B).

Apesar de o *C. beijerinckii* Br21 não ser capaz de produzir solventes por não conter o gene *adc* que codifica a enzima acetoacetato descarboxilase, como já mencionado (FONSECA *et al.*, 2019); estudos em nosso grupo de pesquisa estão sendo realizados para avaliar o consumo de acetato. Esta possibilidade esclarece a produção e consumo do ácido acético, neste caso, e em outros trabalhos já realizados em nosso grupo de pesquisa.

Considerando a concentração de glicerol de 1100 mM, tanto o 1,3-PDO quanto os ácidos orgânicos, começam a ser produzidos somente após cerca de 15 horas do início da fermentação. Este fato pode ser devido a possível inibição por substrato que leva a fermentações mais lentas e à menor conversão dos metabólitos.

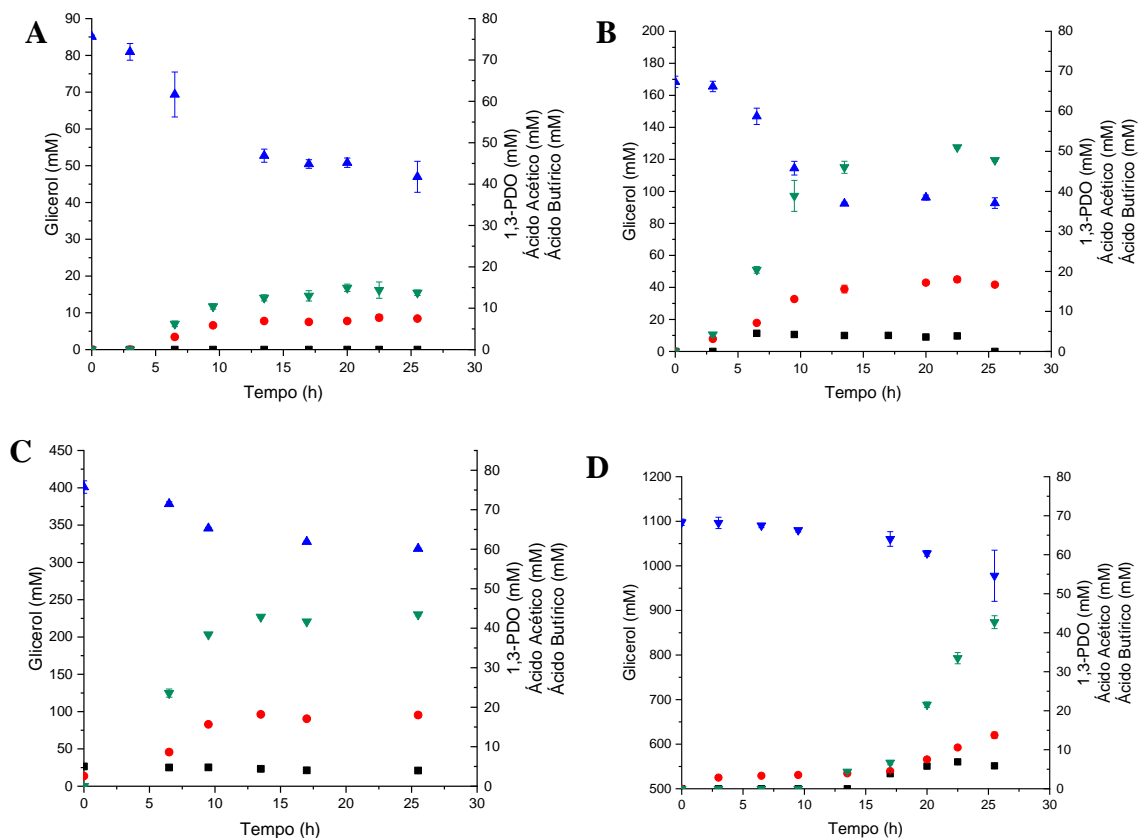


Figura 12. Cinética de formação de produtos a partir de diferentes concentrações de glicerol pelo *C. beijerinckii* Br21 em meio CH. 80 mM (A), 170 mM (B), 390 mM (C) e 1100 mM (D). Glicerol (▲), 1,3-PDO (▼), ácido acético (■) e ácido butírico (●).

Na Tabela 6 estão sumarizados os resultados dos ensaios apresentados nas Figuras 12 e 13, que se referem aos dados cinéticos dos ensaios de fermentação de glicerol por *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSMZ 525 em meio CH.

Analisando os dados da Tabela 6 para o microrganismo *C. beijerinckii* Br21 é possível observar que o consumo de glicerol foi de 41,1, 43,0, 22,3 e 11,0 % das concentrações iniciais de glicerol estudadas para 80, 170, 390 e 1100 mM, respectivamente. Ou seja, os ensaios nos quais as concentrações iniciais de glicerol foram menores, apresentaram maior consumo de substrato.

No ensaio, para o *C. beijerinckii* Br21, com 80 mM de glicerol foi produzido 13,7 mM de 1,3-PDO, gerando um fator de conversão ($Y_{1,3-PDO/GLICEROL}$) de $0,39 \text{ mM mM}^{-1}$, decorrente do baixo consumo de substrato. Por outro lado, para as concentrações iniciais de 170, 390 e 1100 mM de glicerol foram gerados 47,8, 43,5 e 38,5 mM de 1,3-PDO levando aos fatores de conversão de $0,66$, $0,47$ e $0,41 \text{ mM mM}^{-1}$, respectivamente, sendo os dois primeiros estatisticamente iguais. Isso indica que, embora o substrato tenha sido pouco consumido, este foi direcionado majoritariamente para a via reductiva.

Tong e Cameron (1992) afirmaram que a via que favorece a conversão de glicerol em 1,3-PDO é aquela em que acetato é produzido como subproduto. Contudo, o ácido acético detectado ao longo das fermentações com o *C. beijerinckii* Br21 foi consumido, particularmente na concentração de 170 mM. Já nas fermentações conduzidas com 390 e 1100 mM de glicerol apenas 1,2 e 6,5 mM de ácido acético foram detectados.

As fermentações com o *C. beijerinckii* Br21 que produziram mais 1,3-PDO foram também as que apresentaram maior concentração de ácido butírico, 16,7 e 15,4 mM, para 170 e 390 mM de glicerol, respectivamente. (Tabela 6). Dessa maneira, neste caso, o 1,3-PDO foi formado juntamente com o ácido butírico, uma vez que as maiores produtividades de 1,3-PDO foram observadas nas concentrações de 170 e 390 mM de glicerol, 1,9 e 1,7 mM de 1,3-PDO h⁻¹, respectivamente.

Para o microrganismo *C. beijerinckii* diferentes produtividades são descritas na literatura, abrangendo a faixa de 0,42 – 0,71 g L⁻¹ h⁻¹ quando glicerol puro é utilizado (WISCHRAL, *et al.*, 2016). Os valores encontrados no presente trabalho são mais baixos comparados à literatura, pois, as produtividades variaram de 0,04 a 0,14 g L⁻¹ h⁻¹ para 80 e 170 mM de glicerol, respectivamente. Esses baixos valores de produtividade podem estar relacionados ao baixo consumo de substrato, já que em nenhum ensaio com a cepa Br21 o consumo foi maior que 50%.

Gungormusler *et al.*, (2011b) ao comparar o desempenho dos microrganismos *C. beijerinckii* e *K. pneumoniae*, observaram que a concentração inicial ótima de glicerol para a produção de 1,3-PDO deve ser menor ou igual a 40 g L⁻¹ (~430 mM) quando não é realizado o controle de pH. Os autores utilizaram a concentração de 20 g L⁻¹ (217 mM) e obtiveram as concentrações máximas de 10 g L⁻¹ de 1,3-PDO em 24 h para *C. beijerinckii* e 11 g L⁻¹ de 1,3-PDO em 8 h para *K. pneumoniae*.

No que se refere ao microrganismo *C. beijerinckii* Br21 pode-se concluir que as concentrações de 170 e 390 mM de glicerol favoreceram a produção de 1,3-PDO.

Tabela 6. Variação da concentração celular (ΔX), variação de pH (ΔpH), pH final, glicerol consumido, metabólitos produzidos, fatores de conversão ($Y_{X/GLICEROL}$, $Y_{1,3-PDO/GLICEROL}$), produtividade ($P_{1,3-PDO}$) e eficiência para os ensaios com o *C. beijerinckii* Br21 e o *C. pasteurianum* DSMZ 525 com glicerol em diferentes concentrações em 25,5 horas

***C. beijerinckii* Br21**

Glicerol (mM) (g L ⁻¹)	ΔX (mg L ⁻¹) (g de C)	ΔpH	pH final	Glicerol consumido (mM) (g de C)	1,3-PDO (mM) (g de C)	Ácido acético (mM) (g de C)	Ácido butírico (mM) (g de C)	$Y_{X/GLICEROL}$ (g g ⁻¹ de C)	$Y_{1,3-PDO/GLICEROL}$ (mM mM ⁻¹) (g g ⁻¹ de C)	$P_{1,3-PDO}$ (mM h ⁻¹)	Eficiência (%)
80 (7)	200,83 ± 2,9 ^d (0,10 ± 0,00)	1,3 ± 0,2 ^a	5,92 ± 0,0 ^a	34,9 ± 0,6 ^{bc} (1,26 ± 0,02)	13,7 ± 0,6 ^d (0,49 ± 0,02)	<0,1 ^c	7,5 ± 0,1 ^d (0,36 ± 0,01)	0,08 ± 0,00 ^a	0,39 ± 0,03 ^{bcd} (0,39 ± 0,03)	0,5 ± 0,0 ^d	65,7 ± 4,3
170 (16)	328,13 ± 9,4 ^a (0,17 ± 0,01)	1,4 ± 0,0 ^a	5,57 ± 0,0 ^c	72,3 ± 0,4 ^{abc} (2,60 ± 0,01)	47,8 ± 0,3 ^a (1,72 ± 0,02)	<0,1 ^c	16,7 ± 0,2 ^a (0,80 ± 0,01)	0,07 ± 0,00 ^a	0,66 ± 0,00 ^{ab} (0,66 ± 0,00)	1,9 ± 0,0 ^a	110,4 ± 0,5
390 (36)	298,12 ± 6,9 ^b (0,14 ± 0,01)	1,4 ± 0,0 ^a	5,66 ± 0,0 ^b	89,6 ± 0,5 ^{abc} (3,22 ± 0,02)	43,5 ± 0,4 ^b (1,53 ± 0,05)	1,2 ± 0,1 ^b (0,03 ± 0,0)	15,4 ± 0,6 ^b (0,74 ± 0,03)	0,04 ± 0,00 ^b	0,47 ± 0,02 ^{abcd} (0,47 ± 0,02)	1,7 ± 0,0 ^b	78,4 ± 2,7
1100 (101)	230,21 ± 3,5 ^c (0,11 ± 0,00)	1,4 ± 0,0 ^a	5,46 ± 0,0 ^d	120,0 ± 57,8 ^{ab} (4,33 ± 2,08)	38,5 ± 1,0 ^c (1,39 ± 0,04)	6,5 ± 0,7 ^a (0,16 ± 0,02)	12,6 ± 0,3 ^c (0,60 ± 0,02)	0,03 ± 0,02 ^b	0,41 ± 0,19 ^{bcd} (0,41 ± 0,19)	1,5 ± 0,0 ^c	68,8 ± 31,8

***C. pasteurianum* DSMZ 525**

Glicerol (mM) (g L ⁻¹)	ΔX (mg L ⁻¹) (g de C)	ΔpH	pH final	Glicerol consumido (mM) (g de C)	1,3-PDO (mM) (g de C)	Ácido acético (mM) (g de C)	Ácido butírico (mM) (g de C)	$Y_{X/GLICEROL}$ (g g ⁻¹ de C)	$Y_{1,3-PDO/GLICEROL}$ (mM mM ⁻¹) (g g ⁻¹ de C)	$P_{1,3-PDO}$ (mM h ⁻¹)	Eficiência (%)
80 (7)	362,9 ± 9,17 ^a (0,17 ± 0,00)	1,7 ± 0,0 ^{bc}	5,27 ± 0,0 ^a	74,1 ± 0,6 ^b (2,67 ± 0,02)	32,7 ± 0,4 ^c (1,17 ± 0,01)	3,7 ± 0,1 ^b (0,09 ± 0,00)	17,5 ± 0,4 ^a (0,82 ± 0,02)	0,06 ± 0,00 ^a	0,44 ± 0,00 ^a (0,44 ± 0,00)	1,3 ± 0,0 ^c	72,9 ± 0,1
170 (16)	335,6 ± 8,9 ^b (0,16 ± 0,00)	1,8 ± 0,0 ^{bc}	5,24 ± 0,0 ^b	64,3 ± 18,3 ^b (2,31 ± 0,66)	23,7 ± 2,1 ^d (0,85 ± 0,08)	<0,1 ^d	10,7 ± 1,4 ^b (0,51 ± 0,07)	0,07 ± 0,02 ^a	0,41 ± 0,15 ^a (0,41 ± 0,15)	0,9 ± 0,1 ^d	68,7 ± 25,1
390 (36)	332,1 ± 7,9 ^b (0,16 ± 0,00)	2,1 ± 0,0 ^{ab}	4,94 ± 0,0 ^c	173,7 ± 5,7 ^a (6,25 ± 0,21)	76,7 ± 1,73 ^a (2,76 ± 0,06)	10,8 ± 0,2 ^a (0,26 ± 0,00)	19,3 ± 0,8 ^a (0,93 ± 0,04)	0,03 ± 0,00 ^b	0,44 ± 0,01 ^a (0,44 ± 0,01 ^a)	3,0 ± 0,0 ^a	74,1 ± 1,6
1100 (101)	367,7 ± 6,0 ^a (0,17 ± 0,00)	1,9 ± 0,0 ^{abc}	4,88 ± 0,0 ^d	149,6 ± 5,1 ^a (5,39 ± 0,19)	57,1 ± 0,6 ^b (2,06 ± 0,02)	3,3 ± 0,1 ^c (0,08 ± 0,00)	19,3 ± 0,2 ^a (0,97 ± 0,01)	0,03 ± 0,00 ^b	0,38 ± 0,02 ^a (0,38 ± 0,02)	2,2 ± 0,0 ^b	63,7 ± 2,9

*As diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa entre os diferentes meios de culturas com diferentes valores de pH inicial, conforme revelado pelo teste de Tukey, p <0,05.

*Cálculo realizado considerando a fórmula da massa celular: C₄H₇O₂N (BIEBL, 2001).

*C: carbono.

*Eficiência calculada considerando $Y_{1,3-PDO/GLICEROL(máximo)}$: 0,6 g g⁻¹ de carbono.

O *C. pasteurianum* no que se refere a formação dos metabólitos apresentou a concomitante geração de ácido butírico com o 1,3-PDO, assim como para a cepa Br21, porém, concentrações de ácido acético também acompanharam a formação de 1,3-PDO nas fermentações com este microrganismo. Diferentemente do observado para *C. beijerinckii*, em 80 mM de glicerol o *C. pasteurianum* (Figura 13A), consumiu todo o substrato, indicando que este microrganismo consome mais facilmente baixas concentrações de glicerol. A concentração de 390 mM de glicerol foi a que apresentou a maior concentração de 1,3-PDO, e, além do ácido butírico, foi observada a maior concentração de ácido acético (Figura 13C). Para 1100 mM de glicerol, foi observada a segunda maior concentração de 1,3-PDO, diferentemente do *C. beijerinckii*, que foi inibido por esta concentração (Figura 13D).

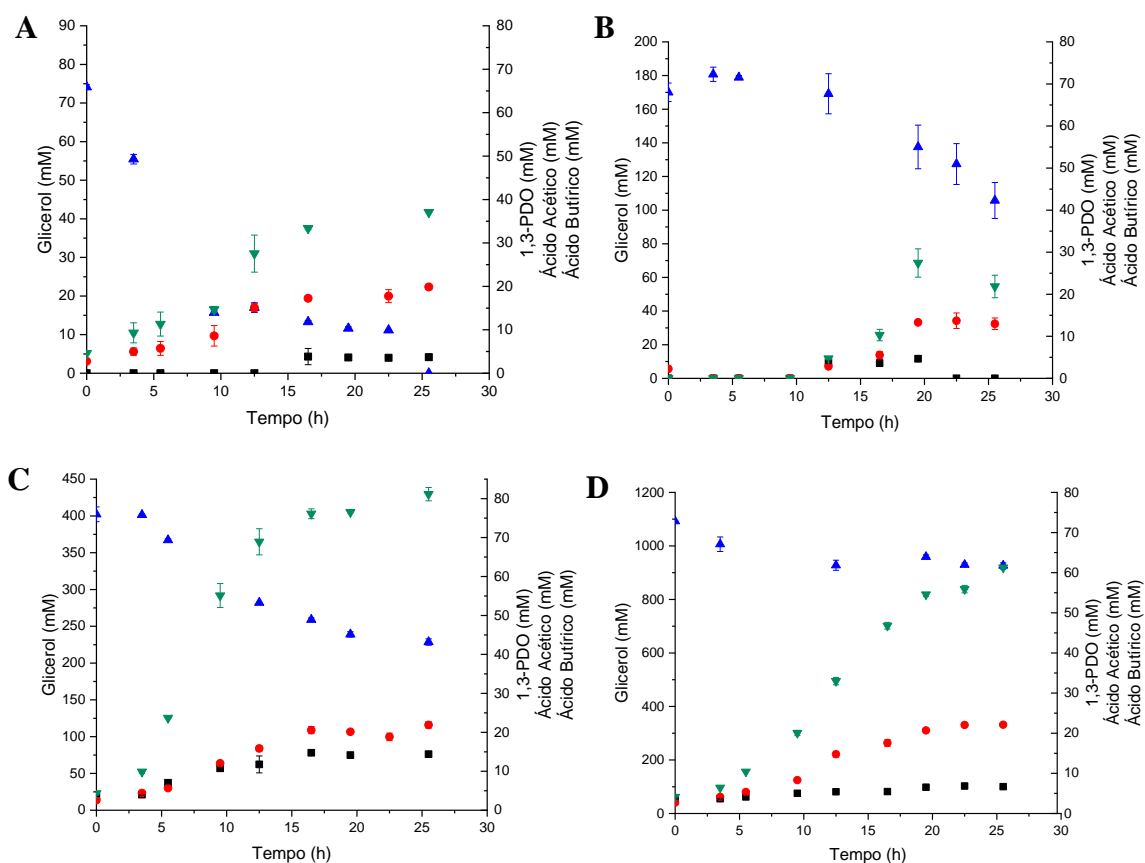


Figura 13. Cinéticas de formação de produtos a partir de diferentes concentrações de glicerol pelo *C. pasteurianum* DSMZ 525 em meio CH. 80 mM (A), 170 mM (B), 390 mM (C) e 1100 mM (D). Glicerol (▲), 1,3-PDO (▼), ácido acético (■) e ácido butírico (●).

Nos ensaios com o *C. pasteurianum* DSMZ 525, o consumo de substrato foi de 74,1, 64,3, 173,7 e 149,6 mM, representando 100, 37,5, 43,0 e 13,9 % de consumo nas fermentações com 80, 170, 390 e 1100 mM de glicerol, respectivamente.

O maior consumo do substrato não indica, necessariamente, a maior conversão em 1,3-PDO. A fermentação com a concentração de 80 mM de glicerol com o *C. pasteurianum* DSMZ 525 foi a única na qual o substrato foi totalmente consumido, entretanto, não foi observada maior formação de 1,3-PDO (Figura 13A). Considerando a formação dos ácidos orgânicos, o ensaio utilizando 170 mM glicerol para o microrganismo *C. pasteurianum* DSMZ 525, assim como para *C. beijerinckii* Br21, foi observada a produção de ácido acético e butírico durante os ensaios, sendo o ácido acético consumido ao longo da fermentação (Figura 13B).

O ensaio com 390 mM de glicerol resultou na maior concentração de 1,3-PDO (76,7 mM) e também apresentou a maior concentração de ácido butírico (19,3 mM). Contudo, este ensaio, apresentou também maior concentração de ácido acético, 10,8 mM, o que está de acordo com o proposto por Tong e Cameron (1992). Segundo Biebl *et al.*, (1992) é comum a mistura de ácido butírico e ácido acético na formação de 1,3-PDO, ocasionando a diminuição do rendimento de 0,75 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol, quando o ácido acético é o único metabólito formado, para 0,6 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol (Reação 11). Apesar disso, a geração de ácido butírico pode estar relacionada positivamente com a produção de 1,3-PDO (Tabela 6).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, independente da concentração inicial de glicerol estudada, o fator de conversão ($Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$) para o *C. pasteurianum* foi em torno de 0,4 mM 1,3-PDO mM⁻¹ glicerol. Entretanto, maiores produtividades foram alcançadas se comparadas a cepa Br21, 3,0 e 2,2 mM 1,3-PDO h⁻¹ para as concentrações de 390 e 1100 mM de glicerol, respectivamente. A produtividade descrita na literatura para este microrganismo varia bastante, 2,9 – 8,8 mM 1,3-PDO h⁻¹ (GALLARDO *et al.*, 2019; MOON *et al.*, 2011). As produtividades indicam que, de fato, as fermentações de concentrações intermediárias de glicerol são mais adequadas, tanto para o *C. pasteurianum* assim como para *C. beijerinckii* para a obtenção de 1,3-PDO, para os próximos estudos, optou-se pela concentração de glicerol 390 mM.

Além de o *C. pasteurianum* DSMZ 525 ser capaz de produzir 1,3-PDO, algumas pesquisas envolvendo este microrganismo baseiam-se na coprodução deste metabólito com butanol (GROEGER *et al.*, 2016; GALLARDO *et al.*, 2017; SABRA *et al.*, 2014) e de hidrogênio (SARMA *et al.*, 2017). De acordo com Biebl (2001) na fermentação do glicerol por *C. pasteurianum* o metabólito principal obtido é o butanol. Contudo, é necessário que ocorra concomitantemente a formação de 1,3-PDO, pois este atuará como um receptor dos equivalentes redutores para que seja mantido o equilíbrio redox

intracelular. Isso, pois, uma vez que o glicerol é mais reduzido do que a massa celular formada junto com os produtos de fermentação, os equivalentes redutores adicionais que são liberados precisam de um receptor, que no caso é o 1,3-PDO (BIEBL, 2001). Entretanto, independentemente da concentração de glicerol utilizada neste ensaio com o *C. pasteurianum* DSMZ 525 não foi observada a presença de butanol.

As concentrações de glicerol descritas na literatura para a produção de 1,3-PDO por *C. pasteurianum* variam na faixa de 270 – 540 mM (BIEBL, 2001; SARCHAMI *et al.*, 2016; GALLARDO *et al.*, 2017), enquanto que por *C. beijerinckii* são entre 87 – 330 mM (WISCHRAL, *et al.*, 2015; WISCHRAL, *et al.*, 2016). Considerando os resultados para ambos os microrganismos estudados neste trabalho, é possível concluir que concentrações menores e intermediárias de glicerol são mais favoráveis para a produção de 1,3-PDO por ambos os microrganismos.

A Figura 14 apresenta a concentração de 1,3-PDO ao final das fermentações, bem como o rendimento $Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$ para cada concentração de glicerol e microrganismo estudado. Como pode ser observado, apesar do *C. pasteurianum* apresentar maiores concentrações de 1,3-PDO, os rendimentos, ou seja, o $Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$, do *C. beijerinckii*, foram significativamente maiores e até mesmo superior ao teórico (0,6 mM 1,3-PDO mM⁻¹ glicerol), especialmente na concentração de 170 mM de glicerol.

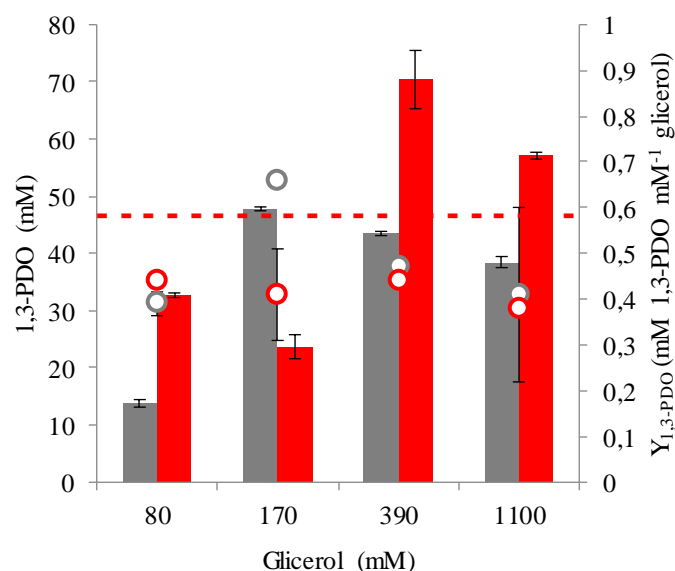


Figura 14. Variação da concentração de 1,3-PDO obtidas das fermentações com diferentes concentrações de glicerol com o *C. beijerinckii* Br21 (■) e *C. pasteurianum* DSMZ 525 (■). $Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$ para *C. beijerinckii* Br21 (○) e *C. pasteurianum* DSMZ 525 (○). O traço pontilhado indica o rendimento teórico possível $Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$: 0,6 mM 1,3-PDO mM⁻¹ glicerol.

Biebl *et al.*, (1992) observaram que para alguns isolados de *C. butyricum* o rendimento ($Y_{P/S}$) de 1,3-propanodiol em relação ao glicerol estava acima do esperado e relacionaram este fato à baixa produção de hidrogênio. Isso pois, a maior parte do H_2 que seria liberado na forma molecular via ação da hidrogenase, está ligado à ferredoxina e é disponibilizado para a redução do glicerol, catalisada pela enzima ferredoxina-NAD redutase. Ou seja, os equivalentes redutores da ferredoxina são direcionados para as reações de formação de 1,3-propanodiol.

Estudos recentes relatam o possível metabolismo mixotrófico do *C. beijerinckii*, isto é, esta espécie de *Clostridium*, além de ser heterotrófica apresenta a possibilidade de assimilação de CO_2 como fonte de carbono na presença de fonte orgânica e inorgânica de carbono, ou seja, é capaz de realizar o metabolismo autotrófico e heterotrófico juntos. O envolvimento de enzimas, tais como a formiato desidrogenase e piruvato-ferredoxina oxireductase – PFOR – no sentido reverso, possibilitariam a via autotrófica do *C. beijerinckii* (SANDOVAL-ESPINOLA *et al.*, 2017). Este resultado abre possibilidades de estudos futuros, uma vez que o CO_2 gerado durante a própria fermentação pode ter sido assimilado como fonte de carbono para a geração de 1,3-PDO. Indícios de que isto tenha ocorrido está nos diferentes $Y_{1,3-PDO/GLICEROL}$ da cepa *C. beijerinckii* Br21, que apresentou o maior rendimento dentre todos os ensaios realizados. Estudos futuros da expressão destas enzimas em ambos os microrganismos permitirão averiguar as suas contribuições na formação de 1,3-PDO pela via mixotrófica.

5.4. Ensaios em biorreator com controle de pH

Como já mencionado, o pH é um dos principais parâmetros que podem afetar o desempenho de uma fermentação. A maioria dos estudos realizados visando a via reductiva do glicerol por cepas de *Clostridium* considera o pH entre 6,0 e 7,0 ideal para esse processo (GALLARDO *et al.*, 2017; GUNGORMUSLER *et al.* 2011b; MOON *et al.*, 2011; WISCHRAL *et al.*, 2016; TRCHOUNIAN *et al.*, 2017). Dessa maneira, foram realizados ensaios cinéticos com 390 mM de glicerol com as cepas *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSMZ 525 em meio CH (Tabela 3), por 44 horas, com pH controlado em 7, comparando-se com ensaio realizado sem o controle de pH, ambos realizados em biorreator de bancada (Figura 15).



Figura 15. Fermentador de bancada BioFlo®/CelliGen® 115 (New Brunswick).

O crescimento celular, considerando a variação da concentração celular (ΔX), não apresentou diferença no que se refere ao controle ou não de pH (Figura 16 e Tabela 7). Os resultados indicaram que o controle de pH, neste caso, não interferiu no crescimento celular, embora estudos indiquem que em pH ácido o crescimento do *Clostridium* seja limitado (LUTKE-EVERSLOH *et al.*, 2011). Na maioria dos casos, em pH baixo o crescimento celular cessa como forma de proteção das células devido ao acúmulo dos ácidos. Essa proteção acontece, como já mencionado, para que os ácidos produzidos não atravessem a membrana celular, de modo que assim não ocorra a dissociação dos ácidos levando a liberação de prótons (H^+) no interior da célula (BARAL *et al.*, 2014).

Em relação a variação de pH, no ensaio realizado com o controle para *C. beijerinckii* houve um leve aumento no pH final da fermentação. Contudo, este pequeno aumento pode estar relacionado ao próprio controle de pH que é realizado automaticamente pelo equipamento, conforme há o decaimento deste. Em relação ao *C. pasteurianum* a variação de pH observada pode estar associada a uma possível formação de solventes, uma vez que este é capaz de fazê-lo ao realizar a fase de solventogênese. Já para os ensaios realizados sem o controle de pH, a variação foi de 1,6 e 1,2, para *C. beijerinckii* e *C. pasteurianum*, respectivamente, indicando, portanto, a formação dos ácidos orgânicos (Figura 16 e Tabela 7).

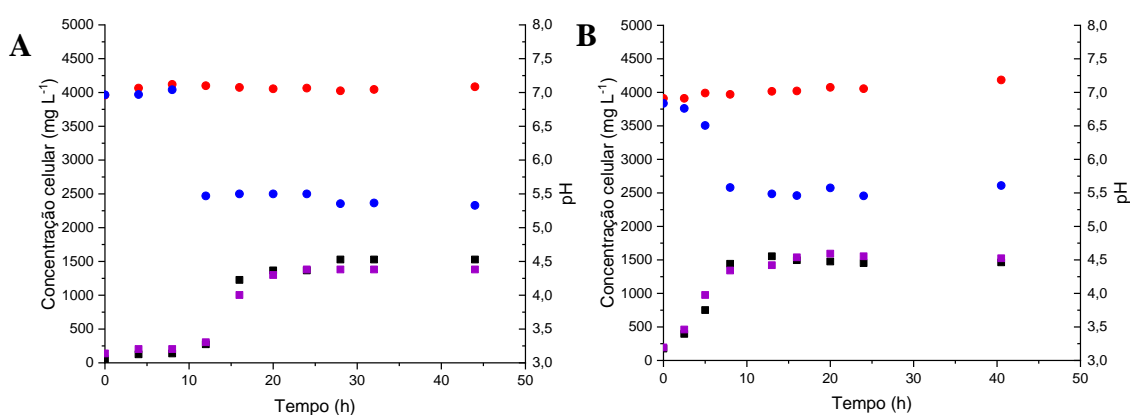


Figura 16. Variação da concentração celular e pH referentes a fermentação de glicerol por *C. beijerinckii* Br21 (A) e *C. pasteurianum* DSMZ 525 (B), com e sem o controle de pH utilizando o meio CH. pH com (●) e sem (●) controle. Concentração celular com (■) e sem (■) controle de pH.

A Figura 17 apresenta as cinéticas de formação dos metabólitos e consumo de substrato para o microrganismo *C. beijerinckii* com e sem controle de pH. O controle de pH influencia no consumo de substrato e, conseqüentemente, na formação dos produtos. Considerando este microrganismo, o controle de pH favoreceu a via reductiva do glicerol, uma vez que o produto majoritário foi 1,3-PDO (Figura 17A). Concomitantemente, foram produzidos ácidos acético e butírico como já era esperado com base em resultados anteriores, sendo o ácido acético consumido ao final da fermentação.

Para esta mesma cepa quando o pH não foi controlado, a produção de 1,3-PDO foi inferior à observada em relação ao ensaio com pH controlado e o ácido acético produzido foi consumido (Figura 17B). Embora o 1,3-PDO tenha sido produzido neste ensaio sem o controle de pH, foi possível observar que o controle de pH é influencia no aumento da conversão do glicerol neste metabólito.

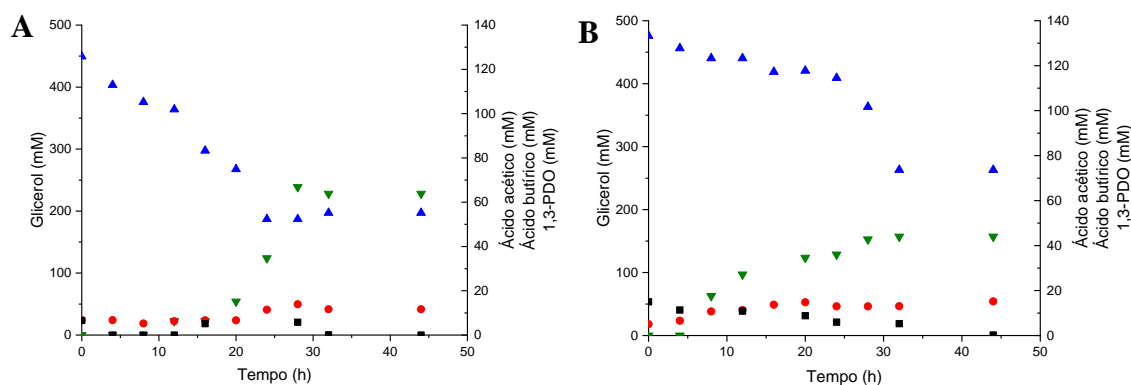


Figura 17. Cinética do consumo de substrato e metabólitos obtidos pela fermentação do glicerol (390 mM) por *C. beijerinckii* Br21 utilizando o meio CH (A,B), com (A) e sem (B) o controle de pH. Glicerol (▲), 1,3-PDO (▼), ácido acético (■) e ácido butírico (●).

Quando o *C. pasteurianum* foi empregado na fermentação de glicerol com o controle de pH (Figura 18A), o controle de pH favoreceu a geração de 1,3-PDO e ácido butírico. O ácido acético presente foi consumido ao longo da fermentação. Diferentemente do observado para *C. beijerinckii*, no ensaio realizado sem o controle de pH para *C. pasteurianum* houve considerável consumo de substrato bem como produção de 1,3-PDO (Figura 18B).

SARCHAMI *et al.*, (2016) ao avaliarem a produção de 1,3-PDO por *Clostridium pasteurianum* em diferentes pHs controlados constataram que, embora o crescimento celular e a produção dos metabólitos sejam afetados quando o pH está próximo a 5, ainda sim o microrganismo é capaz de metabolizar o substrato em favor, tanto do crescimento quanto dos produtos. Segundo Veras *et al.* (2019) é possível obter rendimentos próximos a 0,5 mol de 1,3-PDO mol⁻¹ de glicerol com pH entre 5,0-5,5 (VERAS *et al.*, 2019). Ou seja, para este microrganismo a faixa de pH para a produção de 1,3-PDO é mais ampla do que a observada para *C. beijerinckii* Br21.

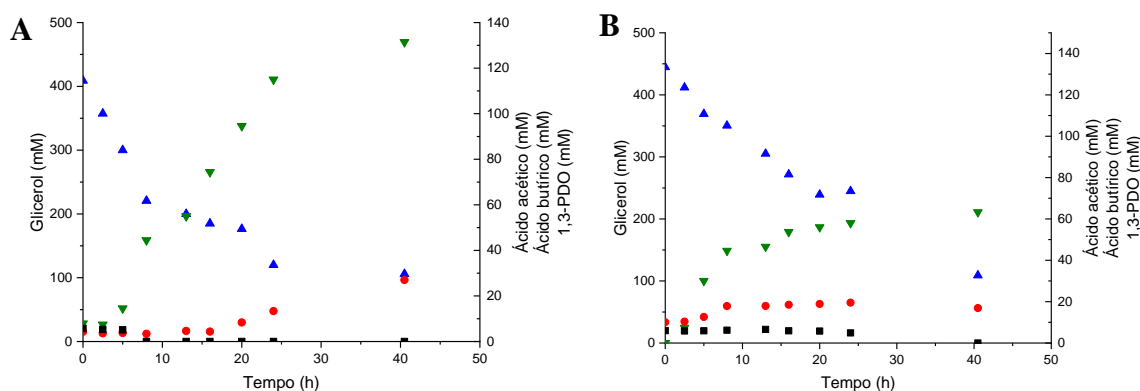


Figura 18. Cinética do consumo de substrato e metabólitos obtidos pela fermentação do glicerol (390 mM) por *C. pasteurianum* DSMZ 525 utilizando o meio CH (A,B), com (A) e sem (B) controle de pH, respectivamente. Glicerol (▲), 1,3-PDO (▼), ácido acético (■) e ácido butírico (●).

A Tabela 7 contém os dados referentes aos produtos da fermentação de glicerol por *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSMZ 525 dos ensaios em biorreatores com e sem o controle de pH. Também são apresentados os dados da cinética fermentativa, além do rendimento de 1,3-PDO que foi calculado com base na quantidade de glicerol consumida para cada microrganismo.

De maneira geral, em todos os ensaios foi observada a presença dos ácidos orgânicos, sendo o ácido butírico acumulado ao final das fermentações, correspondendo a 8,0 e 6,8 mM para os ensaios sem controle de pH com *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSMZ 525, respectivamente. Para o ensaio com o *C. pasteurianum* o ácido acético presente foi consumido durante a fermentação. Este consumo indica, como nos demais ensaios, em que este fato já havia sido observado, a possibilidade de consumo deste metabólito em detrimento da formação de ácido butírico (Figura 3). Já para o microrganismo *C. beijerinckii* Br21, também foi observado consumo deste metabólito, contudo, não totalmente, restando ao final da fermentação apenas 5,3 mM. Nos ensaios com o controle de pH, 5,0 e 27,0 mM de ácido butírico foram produzidos por *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSMZ 525, respectivamente. E, para nestes ensaios o ácido acético produzido foi consumido ao longo da fermentação.

No ensaio com o controle de pH com o *C. beijerinckii*, 206,2 mM de glicerol foi consumido e 63,8 mM de 1,3-PDO foi produzido, resultando, o fator de conversão ($Y_{1,3\text{-PDO/GLICEROL}}$) de 0,31 mM 1,3-PDO mM⁻¹ glicerol. Já quando não foi realizado o controle de pH, 44,0 mM de 1,3-PDO foi produzido em detrimento do consumo do substrato, 275,1 mM glicerol, levando ao fator de conversão de apenas 0,16 mM 1,3-PDO mM⁻¹ glicerol. As produtividades de 1,3-PDO foram 1,4 e 1,0 mM h⁻¹, para os ensaios com e sem controle de pH, respectivamente.

Comparando-se com o observado para *C. beijerinckii* NRRL B-593 por Gungormusler *et al.* (2011b) tendo o pH controlado em 7, a produtividade relatada foi de apenas 0,5 g L⁻¹ h⁻¹, enquanto que as obtidas no presente trabalho correspondem a 0,11 e 0,08 g L⁻¹ h⁻¹, para os ensaios com e sem controle de pH, respectivamente. Wischral *et al.* (2016) obtiveram 26 g L⁻¹ de 1,3 PDO, com produtividade de 0,99 g L⁻¹ h⁻¹ durante a fermentação de glicerol residual por *C. beijerinckii* DSM 791, em pH 6. Quando o glicerol puro é utilizado a produtividade pode variar de 0,42 – 0,71 g L⁻¹ h⁻¹ (WISCHRAL, *et al.*, 2016). Dessa maneira, pode-se concluir que o controle de pH é imprescindível para que a produtividade de 1,3-PDO seja aumentada.

Tabela 7. Variação da concentração celular (ΔX), variação de pH (ΔpH), concentração de glicerol consumido, metabólitos produzidos, fatores de conversão ($Y_{X/GLICEROL}$, $Y_{1,3-PDO/GLICEROL}$), produtividade ($P_{1,3-PDO}$) e eficiência para os ensaios em fermentador com o *C. beijerinckii* Br21 e o *C. pasteurianum* DSMZ 525 em 44 horas.

Microorganismo	Controle pH	ΔX (mg L ⁻¹) (g de C)	ΔpH	pH final	Glicerol consumido (mM) (g de C)	1,3-PDO (mM) (g de C)	Ácido acético (mM) (g de C)	Ácido butírico (mM) (g de C)	$Y_{X/GLICEROL}$ (g g ⁻¹ de C)	$Y_{1,3-PDO/GLICEROL}$ mM mM ⁻¹ (g g ⁻¹ de C)	$P_{1,3-PDO}$ (mM h ⁻¹)	Eficiência (%)
<i>C. beijerinckii</i> Br21	Com	1247,5 (0,59)	0,13	7,1	206,2 (7,42)	63,8 (2,27)	< 0,1	5,0 (0,22)	0,08	0,31 (0,31)	1,4	51,7
	Sem	1155,0 (0,55)	1,63	5,3	275,1 (9,90)	44,0 (1,56)	5,3 (0,12)	8,0 (0,38)	0,06	0,16 (0,16)	1,0	26,7
<i>C. pasteurianum</i> DSMZ 525	Com	1287,0 (0,61)	0,27	7,2	266,7 (9,60)	123,4 (4,45)	< 0,1	27,0 (1,31)	0,06	0,46 (0,46)	3,1	76,7
	Sem	1333,0 (0,63)	1,23	5,6	335,7 (12,09)	63,2 (2,27)	< 0,1	6,8 (0,33)	0,05	0,19 (0,19)	1,6	31,7

*Cálculo realizado considerando a fórmula da massa celular: C₄H₇O₂N (BIEBL, 2001).

*C: carbono.

*Eficiência calculada considerando $Y_{1,3-PDO/GLICEROL(máximo)}$: 0,6 g g⁻¹ de carbono.

Analisando os ensaios com o *C. pasteurianum* DSMZ 525 com o pH controlado, ao final da fermentação foi obtido 123,4 mM de 1,3-PDO a partir de 266,7 mM de glicerol. Por outro lado, sem o controle de pH apenas 63,2 mM de 1,3-PDO foram produzidos em detrimento do consumo de 335,7 mM glicerol. Os fatores de conversão foram 0,46 e 0,19 mM 1,3-PDO mM⁻¹ glicerol, respectivamente, para os ensaios com e sem controle de pH. As produtividades de 1,3-PDO foram 3,1 mM h⁻¹ (0,24 g L⁻¹ h⁻¹) e 1,6 mM h⁻¹ (0,12 g L⁻¹ h⁻¹) para os ensaios com e sem controle de pH, respectivamente.

Veras *et al.*, (2019), utilizando majoritariamente esta mesma cepa como parte de um consórcio microbiano, obtiveram uma produtividade de 0,3 g L⁻¹ h⁻¹. Já Gallardo *et al.*, (2017) chegaram a valores entre 0,49-0,67 g L⁻¹ h⁻¹ em pH 6. Embora o *C. pasteurianum* seja muito empregado na produção de butanol, neste ensaio não foi observada a sua presença (Figura 19).

Sarma *et al.* (2017) avaliaram a produção de hidrogênio por meio da fermentação de glicerol residual por *C. pasteurianum* ATCC 6013 e observaram que butirato e 1,3-PDO foram os principais subprodutos obtidos. Os autores constataram que a maior fração de carbono havia sido destinada para o crescimento celular e também associaram o crescimento celular à produção de hidrogênio. Embora não tenha sido realizada a determinação de hidrogênio nesta etapa do trabalho, considerando esta literatura, pode-se supor que o substrato também tenha sido destinado para produção de hidrogênio.

Gallardo *et al.*, (2017) estudaram a produção simultânea de butanol e 1,3-PDO por *C. pasteurianum* DSM 525 a partir de glicerol. Três condições experimentais diferentes foram testadas para avaliar a influência do pH e da dispersão de N₂ para manutenção da anaerobiose durante a fermentação. A primeira condição era pH 6 e N₂ presente durante toda a fermentação. A segunda e a terceira foram pH 6 e 5 controlados, respectivamente, e N₂ apenas durante a fase lag. Os autores observaram que em pH 6,0 a presença de N₂ favoreceu notoriamente a produção de biomassa e 1,3-PDO. E que, em pH 5,0 foi observado maior produção butanol, porém o crescimento celular foi afetado. Ou seja, a anaerobiose é muito importante para fermentações por *Clostridium* e dependendo do pH, este pode favorecer uma das vias em detrimento da outra.

Observando a Figura 19 para o microrganismo *C. pasteurianum* é possível constatar que independente do controle ou não de pH não foi observada a formação de butanol. Em outros estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando esta cepa também não foi observada a produção de butanol (dados não publicados). De acordo com Gallardo *et al.*, (2017), a formação do solvente pode ser favorecida quando o pH da

fermentação está em torno de 5, pode-se propor que, este metabólito não foi formado, uma vez que o pH final da fermentação foi próximo a 5,5.

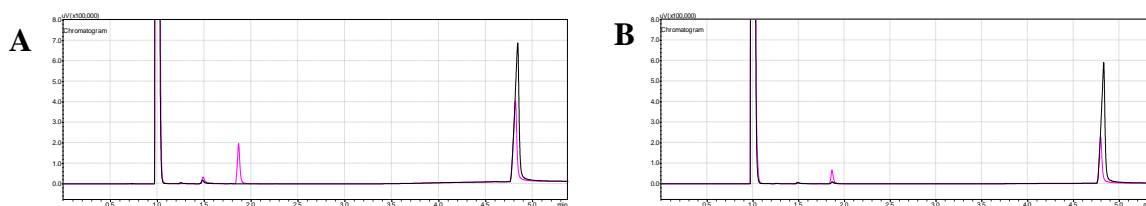


Figura 19. Cromatogramas inicial e final da fermentação de glicerol por *C. pasteurianum* DSMZ 525 utilizando o meio CH com (A) e sem (B) controle de pH.

Baseado nos resultados obtidos para os ensaios em fermentador de bancada com controle de pH, pode-se concluir que, independente do microrganismo utilizado, quando o controle de pH é realizado, a produção de 1,3-PDO é diretamente afetada, ou seja, o controle de pH faz com que uma maior concentração de 1,3-PDO seja obtida ao final da fermentação de glicerol.

A eficiência (Eq. 5), considerando a Reação 11, calculada para cada microrganismo foi 50 e 83 % para *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSMZ 525, respectivamente, nos ensaios com o controle de pH. Com base nos valores teóricos máximos de 1,3-PDO que seriam obtidos tendo em vista o substrato consumido em cada ensaio, para uma eficiência de 100% deveriam ser produzidos 124 e 160 mM para *C. beijerinckii* Br21 e *C. pasteurianum* DSMZ 525, respectivamente. Considerando os resultados obtidos, pode-se propor que, embora a cepa *C. pasteurianum* tenha apresentado melhores resultados no que se refere a concentração de 1,3-PDO, a cepa *C. beijerinckii* também proporcionou resultados promissores neste estudo preliminar em biorreator. Vale ressaltar que o microrganismo *C. beijerinckii* Br21 não é capaz de produzir solventes, dessa maneira, aumentando-se o consumo de substrato provavelmente será possível aumentar também a produção de 1,3-PDO.

6. Conclusões

As variáveis da fermentação de glicerol estudadas neste trabalho, tais como a concentração de glicerol, diferentes tipos de meios de cultura e o pH, influenciam fortemente no direcionamento do metabolismo do glicerol à 1,3-PDO pelas cepas *C. pasteurianum* DSMZ 525 e *C. beijerinckii* Br21.

Nos ensaios de fermentações os quais não foi possível controlar o pH, o pH inicial mais adequado foi dependente da composição do meio de cultura, variando entre 6,5 para o meio CH e 7,5 para o meio TH. Independentemente da composição do meio, a faixa mais adequada de pH para a obtenção do 1,3-PDO pelas cepas variou entre 6,5 e 7,5.

Meios ricos em nutrientes, e, principalmente na presença de outras fontes de carbono facilmente assimiláveis, como os carboidratos, não favorecem a formação de 1,3-PDO. O extrato de levedura parece ter papel fundamental na biossíntese de 1,3-PDO, pois no meio CH, o qual possui a maior concentração de extrato, também foi observada a maior concentração 1,3 PDO.

A faixa de concentração de glicerol estudada não causou a inibição ao crescimento celular do *C. pasteurianum* DSMZ 525, ao contrário do *C. beijerinckii* Br21 que teve seu crescimento fortemente afetado em 1100 mM. Concentrações iniciais mais baixas de glicerol para o *C. beijerinckii* foram mais adequadas, comparado ao *C. pasteurianum* DSMZ 525. Entretanto, para ambos os microrganismos, concentrações intermediárias, forneceram maiores concentrações de 1,3-PDO e maiores fatores de conversão de glicerol em produto. O principal subproduto formado juntamente com o 1,3-PDO na fermentação de glicerol por ambas as cepas de *Clostridium* foi o ácido butírico.

Quando o pH do meio é controlado próximo à neutralidade é possível aumentar a obtenção de 1,3-PDO, por ambos os microrganismos. Embora o *C. pasteurianum* DSMZ 525 tenha apresentado maiores concentrações de 1,3-PDO a partir do glicerol comparado ao *C. beijerinckii* Br21, este último se mostrou capaz de aumentar a produção deste metabólito quando o pH do meio foi controlado. Além disso, a cepa Br21 é capaz de produzir ácido butírico o qual é considerado um produto de elevado valor agregado.

7. Referências bibliográficas

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Consulta do Anuário Estatístico 2019, disponível em: <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/5237-anuario-estatistico-2019#Se%C3%A7%C3%A3o%204>

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Consulta do RenovaBio, disponível em: <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/renovabio>

ANGELIDAKI, I., SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev Environ Sci Biotechnol* 3, 117–129 (2004).

BARAL, NAWA RAJ., SHAH, AJAY. Microbial inhibitors: formation and effects on acetone-butanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 98, n. 22, p. 9151-9172, (2014).

BARBIRATO, F., GRIVET, J. P., SOUCAILLE, P., BORIES, A. 3-Hydroxypropionaldehyde, an Inhibitory Metabolite of Glycerol Fermentation to 1,3-Propanediol by Enterobacterial Species. *App. Environmental Microbiology*, p. 1448–1451 Vol. 62, No. 4 (1996).

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* batch and continuous culture studies. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 27: 18–26 (2001).

BIEBL, H. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotechnol*, 35:701-705 (1991).

BIEBL, H., MARTEN, S., HIPPE, H., DECKWER, W. D. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Appl Microbiol Biotechnol*, 36:592-597 (1992).

BIEBL, H., MENZEL, K., ZENG, A.P., DECKWER, W.D. Microbial production of 1,3-Propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 52 p. 289-297 (1999).

BIEBL, H., SPROER, C. Taxonomy of the glycerol fermenting *Clostridia* and description of *Clostridium diolis* sp nov. *Syst Appl Microbiol*, 25:491–497 (2002).

CHEN, W.M., TSENG, Z.J., LEE, K.S., CHANG, J.S. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30: 1063-1070 (2005).

CHOI, W. J., HARTONO, M. R., CHAN, W. H., YEO, S. S. Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1255–1264 (2011).

CHUN, H. Z.; BELTRAMINI, J. N.; FAN, Y. X.; LU, G. Q. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. *Chemical Society Reviews*, Australia, v. 37, n. 1, p. 527-549 (2007).

DUARTE, S. H., DE ANDRADE, C. C. P., GHISELLI, G., MAUGERI, F. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. *Bioresour Technol* 138:377–381 (2013).

DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K. STACKEBRANDT, E. (2006). *The Prokaryotes*. 3rd ed. New York, NY: Springer-Verlag, Cap. 1, 3.

EGOBURO, D. E., PEÑA, R. D., KOLENDER, A., PETTINARI, M. J. Optimization and Validation of a GC–FID Method for Quantitative Determination of 1,3-Propanediol in Bacterial Culture Aqueous Supernatants Containing Glycerol. *Chromatographia*. 80: 1121 (2017).

FAKAS, S., PAPANIKOLAOU, S., BATSOS, A. *et al.* Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass Bioenergy* 33:573–580 (2009).

FONSECA, B. C., RIAÑO-PACHÓN, D. M., GUAZZARONI, M. E., REGINATTO, V. Genome sequence of the H₂-producing *Clostridium beijerinckii* strain Br21 isolated from a sugarcane vinasse treatment plant. *Genet. Mol. Biol.* vol.42 no.1 (2019).

FORSBERG, C. W. Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and Other *Clostridium* Species. *Microbiology*. Vol. 53, 4, p. 639-643 (1987).

GALLARDO, R., ALVES, M., RODRIGUES, L.R. Influence of nutritional and operational parameters on the production of butanol and 1,3-propanediol from glycerol by a mutant *Clostridium pasteurianum*. *New Biotechnology* 34 59–67 (2017).

GONEN C., GUNGORMUSLER, M., AZBAR, N. Continuous Production of 1,3-Propanediol Using Waste Glycerol with *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593. Immobilized on Glass Beads and Glass Rushing Rings *Chem. Biochem. Eng. Q.* 27 (2) 227–234, 227 (2013).

GONZÁLEZ-PAJUELO, M., ANDRADE, J. C., VASCONCELOS, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 442–446 (2004).

GROEGER, C., SABRA, W., ZENG, A. P. Simultaneous production of 1,3-propanediol and n-butanol by *Clostridium pasteurianum*: In situ gas stripping and cellular metabolism. *Eng. Life Sci.* 16, 664–674 (2016).

GUNGORMUSLER, M., GONEN, C., AZBAR, N. Continuous production of 1,3-propanediol using raw glycerol with immobilized *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 in comparison to suspended culture. *Bioprocess Biosyst Eng*, 34, 727–733 (2011a).

GUNGORMUSLER, M., GONEN, C., AZBAR, N. 1,3-Propanediol Production Potential by a Locally Isolated Strain of *Klebsiella Pneumoniae* in Comparison to *Clostridium Beijerinckii* NRRL B593 from Waste Glycerol. *J Polym Environ* 19:812–817 (2011b).

- HARTMANIS, M. G. N., KLASON, T., GATENBECK, S. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 20:66-71 (1984).
- JENSEN, T. O., KVIST, T., MIKKELSEN, M. J., WESTERMANN, P. Production of 1,3-PDO and butanol by a mutant strain of *Clostridium pasteurianum* with increased tolerance towards crude glycerol. *AMB Expr* 2, 44 (2012).
- JUN, S. A., MOON, C., KANG, C. H., KONG, S. W., SANG, B. I., UM, Y. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotech*, 161 (1-8): 491-501 (2010).
- KAUR, G., SRIVASTAVA, A. K., CHAND, S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochemical Engineering Journal* 64 106–118 (2012a).
- KAUR, G., SRIVASTAVA, A. K., CHAND, S. Mathematical modelling approach for concentration and productivity enhancement of 1,3-propanediol using *Clostridium diolis*. *Biochemical Engineering Journal* 68 34–41 (2012b).
- KHANNA, S., GOYAL, A., MOHOLKA, V. S., Bioconversion of Biodiesel Derived Crude Glycerol by Immobilized *Clostridium pasteurianum*: Effect of Temperature. *Int. J. Chem. Mol. Eng.* Vol:6, No:4, (2012).
- KHANNA S., GOYAL, A., MOHOLKAR, V. S. Production of n-butanol from biodiesel derived crude glycerol using *Clostridium pasteurianum* immobilized on Amberlite. *Fuel* 112:557–561 (2013).
- KOSMIDER, A., DROZDZYNSKA, A., BLASZKA, K. *et al.* Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* using crude glycerol and whey lactose industrial wastes. *Pol J Environ Stud* 19:1249–1253 (2010).
- KRAUS, G. A. Synthetic Methods for the Preparation of 1,3-Propanediol. *Clean*, 36 (8), 648 – 651 (2008).
- LI, J., BARAL, N. R., JHA, A. K. Acetone-butanol-ethanol fermentation of corn stover by *Clostridium* species: present status and future perspectives. *World J Microbial Biotechnol* 30:1145-1157 (2014).
- LIN, R., LIU, H., HAO, J., CHENG, K., LIU, D. Enhancement of 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* with fumarate addition. *Biotechnol Lett* 27:1755–9 (2005).
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos*, São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v.3, p. 61 – 72, 2001.
- LIU, J-Z., XU, W., CHISTOSERDOV, A., BAJPAI, R. Glycerol Dehydratases: Biochemical Structures, Catalytic Mechanisms, and Industrial Applications in 1,3-Propanediol Production by Naturally Occurring and Genetically Engineered Bacterial Strains. *Appl Biochem Biotechnol*, 179:1073–1100 (2016).

LUTKE-EVERSLOH, T.; BAHL, H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, n. 5, p. 634–647 (2011).

MACIS, L.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. Properties and sequence of the coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 164, p. 21-28 (1998).

MOON, C., LEE, C. H., SANG, B., UM, Y. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology* 102, 10561–10568 (2011).

MARKET & MARKET. Consulta do Global forecast to 2024 – 1,3-Propanediol Market by application and region, 2019. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4832576/13-propanediol-pdo-market-by-application>

MORRISON, L. R. Glycerol. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc. (2000).

MOTHES, G., SCHNORPFEIL, C., ACKERMANN, J. Production of PHB from crude glycerol. *Eng Life Sci* 7:475–479 (2007).

NAKAMURA, C. E.; WHITED, G. M. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, p. 454-459 (2003).

NASCIMENTO, R. P., RIBEIRO, B. D., PEREIRA, K. S., COELHO, M. A. Z. *Microbiologia Industrial: Bioprocessos*. Elsevier Brasil 704p. (2017).

NGO, T. A., KIM, M. S., SIM, S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. *Int J Hydrog Energy* 36:5836–5842 (2011).

O'BRIEN, J. R., RAYNAUD, C., CROUX, C., GIRBAL, L., SOUCAILLE, P., & LANZILOTTA, W. N. Insight into the mechanism of the B₁₂-independent glycerol dehydratase from *Clostridium butyricum*: preliminary biochemical and structural characterization. *Biochemistry* 43(16), 4635–4645 (2004).

PARENTE, E. J. S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza: *Tecbio*, 2003. 66p (2003).

PAPANIKOLAOU, S., RUIZ-SANCHEZ, P., PARISSET, B., BLANCHARD, F., FICK, M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain, *Journal of Biotechnology* 77 191–208 (2000).

PAPANIKOLAOU, S., FAKAS, S., FICK, M. *et al.* Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenergy* 32:60–71 (2008).

RAYNAUD, C., SARCABAL, P., MEYNIAL-SALLES, I., CROUX, C., & SOUCAILLE, P. Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5010–5015 (2003).

REVISTA FAPESP. Glicerina, Resíduos bem-vindos. Edição 196, 2012.

RUHAL, R., AGGARWAL, S., CHOUDHURY, B. Suitability of crude glycerol obtained from biodiesel waste for the production of trehalose and propionic acid. *Green Chem* 13:3492 (2011).

SABRA, W., GROEGER, C., SHARMA, P. N., ZENG, A. P. Improved n-butanol production by a non-acetone producing *Clostridium pasteurianum* DSMZ 525 in mixed substrate fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:4267–4276 (2014).

SANDOVAL-ESPINOLA, W. J., CHINN, M. S., THON, M. R., BRUNO-BARCENA, J. M. Evidence of mixotrophic carbon capture by n-butanol-producer *Clostridium beijerinckii*. *Nature*. 7: 12759 (2017).

SARCHAMI, T., JOHNSON, E., REHMANN, L. Optimization of fermentation condition favoring butanol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum* DSM 525. *Bio. Tech.* 208, 73-80 (2016).

SARMA S. J., BRAR S. K., SYDNEY E. B., BIHAN Y. L., BUELNA G., SOCCOL C. R., Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International journal of hydrogen energy* 37 pp 6473-6490 (2012).

SARMA S., ANAND, A., DUBEY, V. K., MOHOLKAR, V. S. Metabolic flux network analysis of hydrogen production from crude glycerol by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology* 242 169–177 (2017).

SCHOLTEN, E., DAGELE, D. Succinic acid production by a newly isolated bacterium. *Biotechnol Lett* 30:2143–2146 (2008).

SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 199-210 (1998).

SELEMBO P. A., PEREZ J. M., LLOYD W. A., LOGAN B. E. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnol Bioeng*, 104: 1098-106 (2009).

SILVA, G. P., MACK, M., CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Advances* 27 30-9 (2009).

THAUER, R. K., JUNGERMANN, K., DECKER, K. Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriological reviews*, v. 41 (1) p.100-180 (1977).

TONG, I. T., CAMERON, D. C. Enhancement of 1,3-Propanediol Production by Cofermentation in *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* dha Regulon Genes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.34, p149-159 (1992).

TRCHOUNIAN, K. *et al.* Glycerol and mixture of carbon sources conversion to hydrogen by *Clostridium beijerinckii* DSM791 and effects of various heavy metals on hydrogenase activity. *International journal of hydrogen energy* v.42, p. 7875- 7882 (2017).

UPRETY, B. K., DALLI, S. S., RAKSHIT, S. K. Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities. *Energy Convers Manag* 135:117–128 (2017a).

UPRETY, B. K., VENKATESAGOWDA, B., RAKSHIT, S. K. Current Prospects on Production of Microbial Lipid and Other Value-Added Products Using Crude Glycerol Obtained from Biodiesel Industries. *Bioenerg. Res.*10:1117–1137 (2017b).

VERAS, S. T. S., ROJAS, P., FLORENCIO, L., KATO, M. T., SANZ, J. L. Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support. *Bioresource Technology* 279, 140–148 (2019).

WANG, K., HAWLEY, M. C., DEATHOS, S. J. Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol via Selective Dehydroxylation, *Ind. Eng. Chem. Res.* 42 (13), 2913 – 2923 (2003).

WANG, Z-X., ZHUGE, J., FANGA, H., PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnology Advances*, 19, 2001, 201–223 (2001).

WILKENS, E., RINGEL, A. K., HORTIG, D. *et al.* High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1057–1063 (2012).

WISCHRAL, C., BARCELOS, A., JR. N., PESSOA, F. 1,3-Propanediol: Statistical Optimization of Medium to Improve Production by *Clostridium beijerinckii* DSM 791. *Journal: Journal of Advances in Biotechnology*. Vol.5, No. 2. 614–623. ISSN 2348-6201 (2015).

WISCHRAL, D., ZHANG, J., CHENG, C., LIN, M., SOUZA, L. M. G., PESSOA, F. L. P., JUNIOR, N. P., YANG, S-T. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. *Bioresource Technology*. Vol. 212, p100-110 (2016).

YAZDANI, S. S., GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18:213 – 219 (2007).

YOO, M., NGUYEN, N. P. T., SOUCAILLE, P. Trends in Systems Biology for the Analysis and Engineering of *Clostridium acetobutylicum* Metabolism. *Microbiology*. Vol. 28, 2 (2020).

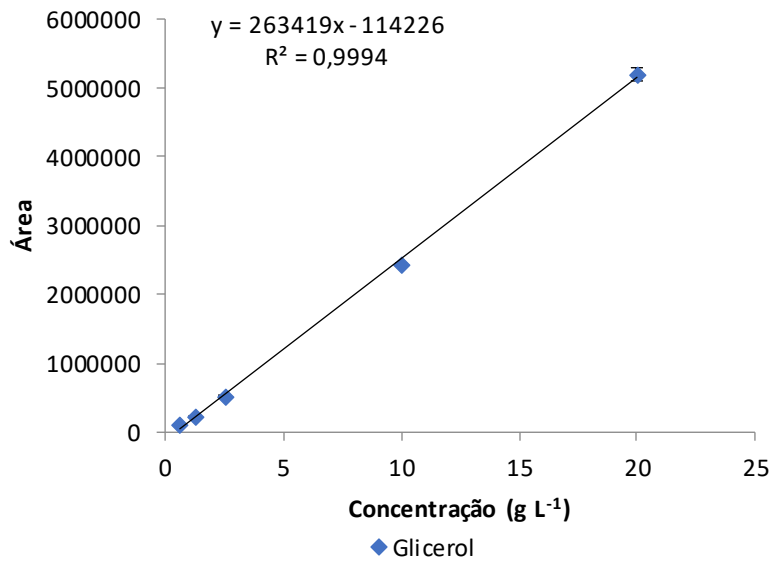
ZABED, H. M., ZHANG, Y., GUO, Q., YUN, J., YANG, M., ZHANG, G., QI, X. Co-biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol by a newly isolated *Lactobacillus reuteri* strain during whole cell biotransformation of glycerol. *Journal of Cleaner Production* 226, 432-442 (2019).

ZENG, A. P., BIEBL, H. Bulk Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-Propanediol Production and the New Trends. In: Schügerl K. et al., (eds) Tools and Applications of Biochemical Engineering Science. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 74. Springer, Berlin, Heidelberg (2002).

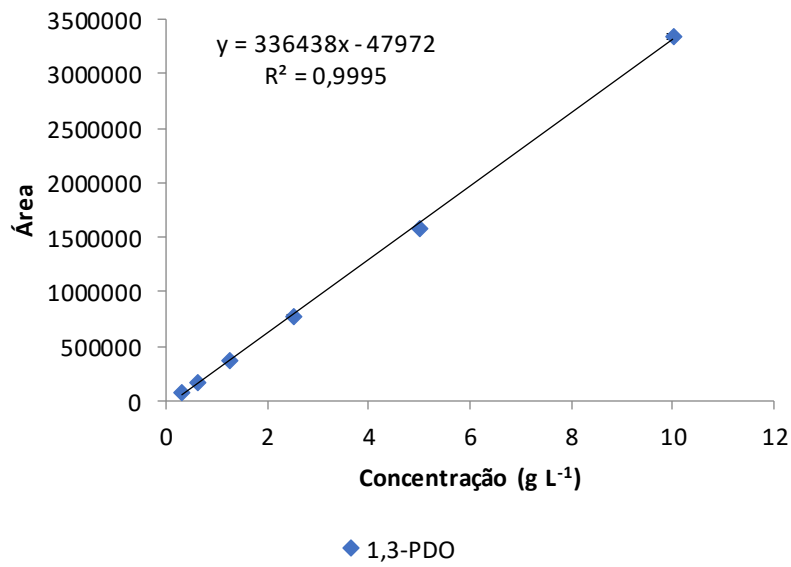
Anexo I

Curva Padrão – Cromatografia a gás.

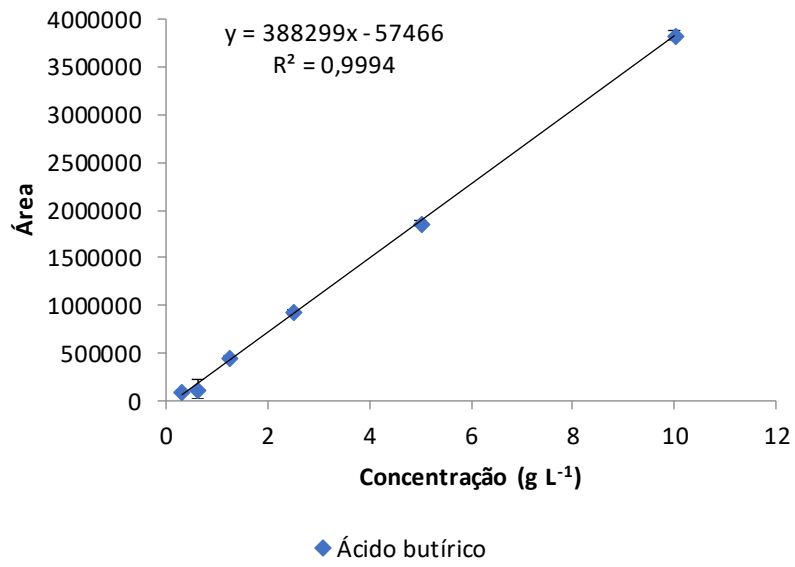
Glicerol



1,3-PDO



Ácido Butírico



Ácido Acético

