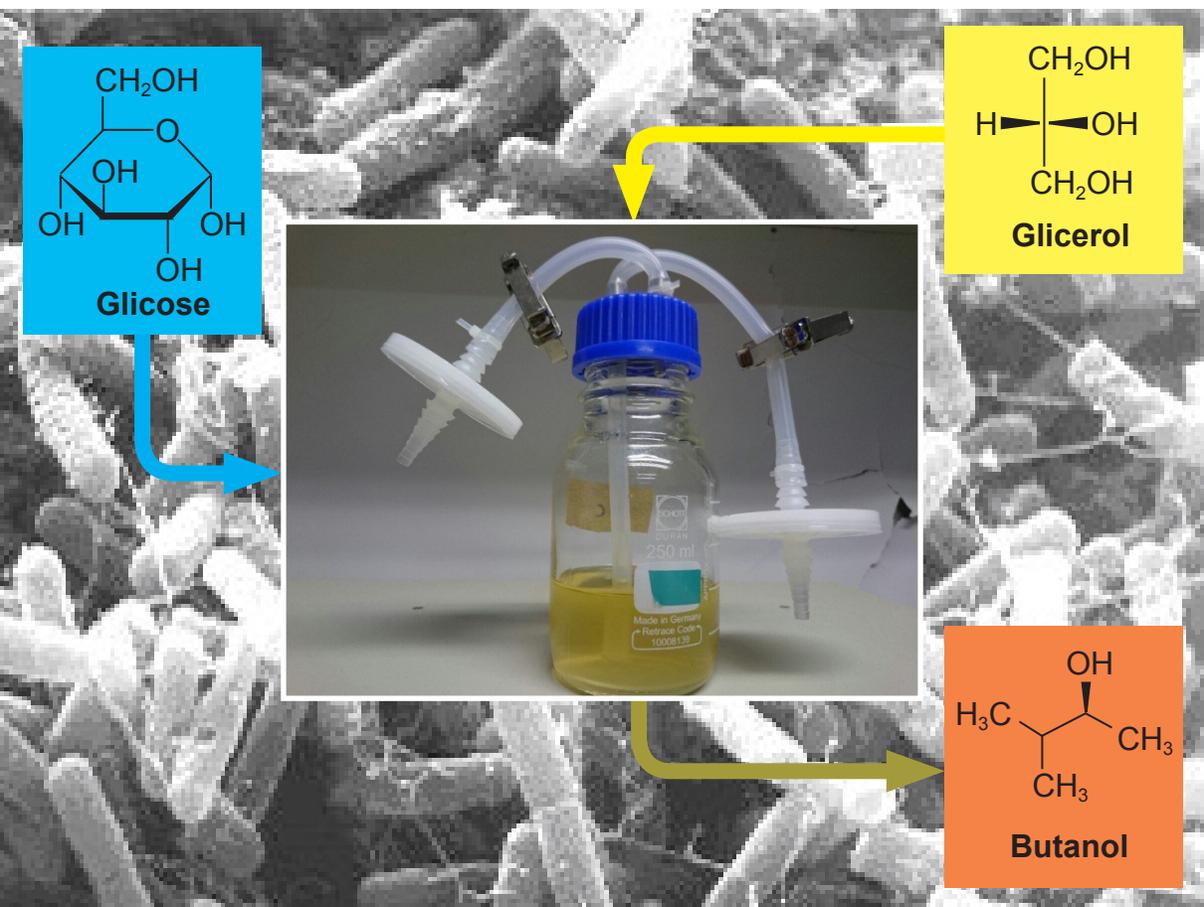


## Produção de *n*-Butanol Usando Linhagens do Gênero *Clostridium* sp.



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroindústria Tropical  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
177**

Produção de *n*-Butanol Utilizando-se  
Linhagens do Gênero *Clostridium* sp.

Alexandre de Araujo Guilherme  
Maria Cristiane Rabelo  
Aldo Souza Colares  
Vanja Fontenele Nunes  
Gustavo Adolfo Saavedra Pinto  
Renato Carrhá Leitão

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Fortaleza, CE  
2018

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
www.embrapa.br/agroindustria-tropical  
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente  
*Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*

Secretária-executiva  
*Celli Rodrigues Muniz*

Secretária-administrativa  
*Eveline de Castro Menezes*

Membros  
*Marlos Alves Bezerra, Ana Cristina Portugal  
Pinto de Carvalho, Deborah dos Santos Garruti,  
Dheyne Silva Melo, Ana Iraidy Santa Brigida,  
Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial  
*Ana Elisa Galvão Sidrim*

Revisão de texto  
*José Cesamildo Cruz Magalhães*

Normalização bibliográfica  
*Rita de Cassia Costa Cid*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Ariilo Nobre de Oliveira*

Imagens de capa  
*John A. Dutton e-Education Institute - Penn  
State University  
e Alexandre de Araujo Guilherme*

**1ª edição**  
On-line (2018)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Agroindústria Tropical

---

Produção de n-Butanol usando linhagens do gênero *Clostridium* sp. /Alexandre de Araujo  
Guilherme... [et al.]. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2018.

41 p. : il. ; 16 cm x 22 cm – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa  
Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 177).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Combustíveis renováveis. 2. Fermentação ABE. 3. Otimização de processo.  
4. Condições de cultivo. 5. Engenharia evolutiva. I. Guilherme, Alexandre de Araujo.  
II. Rabelo, Maria Cristiane. III. Colares, Aldo Souza. IV. Nunes, Vanja Fontenele. V. Pinto,  
Gustavo Adolfo Saavedra. VI. Leitão, Renato Carrhá. VII. Série.

CDD 572.49

---

© Embrapa, 2018

## Sumário

---

<b>Resumo</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>10</b>
2.1. Planejamento da pesquisa .....	10
2.2. Estoque de microrganismos, ativação e inóculo .....	12
2.3. Ensaio sobre o efeito da concentração inicial de glicose e formas de adição de vitaminas na produção de <i>n</i> -butanol .....	13
2.4. Ensaio sobre a influência do pH inicial na produção de <i>n</i> -butanol ..	14
2.5. Ensaio sobre o uso de diferentes cepas de Clostrídio na produção de <i>n</i> -butanol .....	15
2.6. Ensaio sobre o uso do meio de cultivo RCM na produção de <i>n</i> -butanol .....	15
2.7. Ensaio sobre o efeito do tempo de processo na produção de <i>n</i> -butanol .....	16
2.8. Ensaio sobre o uso de glicerol como substrato para produção de <i>n</i> -butanol .....	16
2.9. Ensaio sobre o uso do <i>Clostridium pasteurianum</i> ATCC 6013 com glicerol como substrato.....	17
2.10. Ensaio sobre o efeito de diferentes meios de cultura na produção de <i>n</i> -butanol utilizando-se <i>Clostridium pasteurianum</i> ATCC 6013 e glicerol como substrato.....	18

2.11. Ensaio sobre os efeitos de repiques sucessivos para produção de <i>n</i> -butanol utilizando-se <i>Clostridium pasteurianum</i> ATCC 6013 e glicerol como substrato .....	21
2.12. Métodos analíticos .....	21
2.12.1. Crescimento microbiano .....	21
2.12.2. Quantificação dos metabólitos .....	21
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>22</b>
3.1. Avaliação da concentração inicial de glicose e formas de adição de vitaminas .....	22
3.2. Avaliação do efeito do pH inicial na produção de <i>n</i> -butanol.....	23
3.3. Avaliação da produção de <i>n</i> -butanol utilizando-se cepas <i>C. acetobutylicum</i> NRRL B-519 e <i>C. saccharoperbutyloceticum</i> ATCC 27022 .....	24
3.4. Avaliação da produção de <i>n</i> -butanol utilizando-se o meio de cultivo RCM .....	26
3.5. Determinação do tempo de processo para produção de <i>n</i> -butanol ..	27
3.6. Avaliação da produção de <i>n</i> -butanol utilizando-se glicerol como substrato.....	29
3.7. Avaliação da produção de <i>n</i> -butanol utilizando-se <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 e glicerol como substrato.....	31
3.8. Avaliação da produção de <i>n</i> -butanol utilizando-se diferentes meios de cultura, <i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 e glicerol como substrato.....	33
3.9. Adaptação microbiana por repiques sucessivos para produção de <i>n</i> -butanol utilizando-se <i>Clostridium pasteurianum</i> ATCC 6013 e glicerol como substrato .....	35
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>37</b>
<b>5. Agradecimentos .....</b>	<b>38</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>38</b>

# Produção de *n*-Butanol Utilizando-se Linhagens do Gênero *Clostridium* sp.

Alexandre de Araujo Guilherme<sup>1</sup>

Maria Cristiane Rabelo<sup>2</sup>

Aldo Souza Colares<sup>3</sup>

Vanja Fontenele Nunes<sup>4</sup>

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto<sup>5</sup>

Renato Carrhá Leitão<sup>6</sup>

**Resumo** - A crescente demanda global por energia tem impulsionado estudos para a diversificação da matriz energética mundial, buscando fontes sustentáveis em substituição aos combustíveis fósseis. Neste sentido, o *n*-butanol é um álcool com grande potencial para substituir a gasolina e que pode ser produzido por meio de processos biológicos, usando-se resíduos da agroindústria como substrato. Neste trabalho, o objetivo foi estabelecer uma rota biológica anaeróbia para produção de *n*-butanol a partir de microrganismos do gênero *Clostridium* sp. Durante os ensaios, foram testadas diferentes cepas microbianas, diferentes meios de cultura e formas de preparo, diferentes fontes de carbono e energia (glicose e glicerol), diferentes valores de pH inicial, diferentes tempos de incubação, processos com e sem agitação e o uso de práticas de engenharia evolutiva, a fim de se obter elevados rendimentos em *n*-butanol. Observou-se que, durante o processo, existe a ativação e inativação de diferentes rotas metabólicas a partir de diferentes condições de cultivo. Todavia, os rendimentos para os

---

<sup>1</sup> Engenheiro de Alimentos, doutor em Engenharia Química, bolsista DTI-A (CNPq) na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, alexandrearaujoguilherme@gmail.com

<sup>2</sup> Engenheira de Alimentos, doutora em Engenharia Química, Bolsista DTI-C (CNPq) na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, tianerabelo@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Graduando em Engenharia Química, bolsista ITI-A na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, aldoscولares@gmail.com

<sup>4</sup> Engenheira de Química, bolsista DTI-C (CNPq) na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, vanjafnunes@gmail.com

<sup>5</sup> Químico, doutor em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, gustavo.saavedra@embrapa.br

<sup>6</sup> Engenheiro Civil, doutor em Ciências Ambientais, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, renato.leitao@embrapa.br

metabólitos foram baixos, inclusive para o *n*-butanol. Portanto, até o presente momento, a condição próxima do ótimo de produção de *n*-butanol ainda não foi encontrada. De qualquer maneira, estes resultados são importantes como avanço no conhecimento desta técnica, indicando futuras rotas tecnológicas para produção de *n*-butanol a partir de um substrato simples (glicose) ou de subprodutos da cadeia produtiva da soja (melaço).

**Palavras-chave:** Combustíveis renováveis, fermentação ABE, otimização de processo, condições de cultivo, engenharia evolutiva.

## Production of *n*-Butanol Using Lineages of the Genus *Clostridium* sp.

**Abstract** - The increase of the global energy demand has encouraged studies for the diversification of the world energy matrix, which aim at sustainable sources as alternatives for the fossil fuels. Reasoning from this fact, *n*-butanol is an alcohol with high potential to readily replace gasoline and can be produced through biological processes. This work aimed to establish an anaerobic biological pathway for the production of *n*-butanol using microorganisms of the genus *Clostridium* sp. During the assays we tested different microbial strains, different culture media and preparation forms, different carbon and energy sources (glucose and glycerol), different initial pH values, different process time, processes with and without agitation and the use of evolutionary engineering in order to obtain high yields of *n*-butanol. We observed that, during the process, activation and inactivation of different metabolic routes from different culture conditions occurred. However, the yields for the metabolites were low, even for *n*-butanol. Thus, up to this moment the optimal condition of *n*-butanol production was not acquired. Anyhow, these results are important as a breakthrough knowledge, leading to further technological pathways for *n*-butanol production using simple substrate (glucose) or a by-product from the soy production chain (molasses)

**Index terms:** Renewable fuels, ABE fermentation, process optimization, culture conditions, evolutionary engineering.

## 1. Introdução

---

Devido aos altos preços dos combustíveis fósseis, sua disponibilidade limitada e seu potencial poluente, estudos têm sido desenvolvidos para produção de alguns álcoois com a finalidade de substituí-los parcialmente e diversificar a matriz energética, aumentando a sustentabilidade econômica e ambiental da cadeia produtiva (Monot et al., 1982). Segundo Lin et al. (2011), o *n*-butanol pode ser um dos combustíveis alternativos mais promissores para resolver problemas de poluição ambiental.

Em comparação com o etanol (19,0 MJ/L), o *n*-butanol tem maior teor energético (27,0 MJ/L), menor miscibilidade em água, menor volatilidade, menor pressão de vapor (4 mmHg a 20 °C), podendo ser transportado por meio da infraestrutura de tubulações já existente (Li; Baral; Jha, 2014). Devido ao teor energético do *n*-butanol ser próximo ao da gasolina (32 MJ/L), este poderá substituí-la sem qualquer modificação nos veículos atuais e seus motores (Li; Baral; Jha, 2014). Além disso, o *n*-butanol pode ser produzido por rotas biológicas a partir de matéria-prima renovável (Biebl, 2001). Dessa forma, pode-se concluir que o *n*-butanol apresenta um potencial para atender a necessidade de sistemas de energia verde e sustentável.

O *n*-butanol é o componente principal da fermentação acetona/butanol/etanol (ABE) por bactérias do gênero *Clostridium* sp. No entanto, o desempenho da fermentação ABE é severamente limitado por fatores como baixa tolerância ao solvente e crescimento microbiano lento, o que acarreta baixa densidade de células durante a solventogênese (etapa em que se observa a reassimilação dos ácidos acético e butírico excretados e a produção de etanol, *n*-butanol e acetona) (Li; Baral; Jha, 2014). Um dos principais problemas associados à produção de ABE é a baixa concentração do produto causada pela toxicidade do *n*-butanol nos microrganismos produtores (Ezeji; Qureshi; Blaschek, 2007). Segundo Jones e Woods (1986), o crescimento microbiano é totalmente inibido com uma concentração de *n*-butanol entre 12 a 16 g/L. Outra razão para a baixa produtividade é a baixa concentração celular no biorreator. Segundo Ezeji, Qureshi e Blaschek (2004), em um reator operando em modo descontínuo, uma concentração celular acima de 3 g/L é raramente alcançada. Uma explicação para este fato, além da toxicidade causada pelo produto ou outros metabólitos, é que os processos anaeróbios

produzem menos ATP quando comparado com os processos aeróbios, ocasionando uma menor multiplicação celular (Tortora; Funke; Case, 2012).

Vários microrganismos estritamente anaeróbios estão sendo utilizados para estudos na produção de *n*-butanol, a maioria são dos gêneros *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Butyribacterium*, *Sarcina*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* e *Megasphaera* (Li; Baral; Jha, 2014). As principais espécies utilizadas industrialmente para fermentação ABE são: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* e *C. saccharoperbutylacetonicum*. A cepa *C. acetobutylicum* ATCC 824 é a mais usada para produção de *n*-butanol. De acordo com estes autores, outras cepas como *C. saccharobutylicum* P262, *C. beijerinckii* P260 e *C. Beijerinckii* BA101 também são utilizadas. Microrganismos modificados por engenharia genética, como *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, também são usadas na produção de *n*-butanol (Pighinelli et al., 2013).

Nas fermentações ABE, o rendimento em *n*-butanol é severamente afetado pelas condições de cultivo. Quando cepas de *Clostridium* na forma germinada (não esporulada) são utilizadas para fermentação ABE, vitaminas, minerais, solução tampão e um meio particular influenciam diretamente no rendimento. Meios de propagação de inóculo e de fermentação são diferentes, de acordo com as linhagens utilizadas. A maior parte dos meios consistem de glicose, extrato de levedura,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$  e acetato de amônio, além de alguns microelementos e vitaminas (Li; Baral; Jha, 2014). A produção de *n*-butanol por espécies de *Clostridium*, como *C. acetobutylicum* e/ou *C. beijerinckii*, tem vantagem sobre variedades naturais produtoras de etanol, pois estes microrganismos podem utilizar a glicose, xilose, galactose e arabinose, e outros diferentes açúcares encontrados nos resíduos agrícolas, como fonte de energia e carbono. Dessa forma, pode-se pensar numa diversificação do uso de diferentes matérias-primas (substrato) para produção de *n*-butanol, como, por exemplo, o glicerol. A espécie *C. pasteurianum* é conhecida por sua capacidade de produzir *n*-butanol a partir de glicerol (Moon et al., 2011), porém a produção ainda está em escala de laboratório e ainda não está definida a melhor composição nutricional a ser empregada.

O glicerol pode ser biologicamente utilizado para produzir produtos químicos como 1,3-propanodiol (1,3-PD) (Jun et al., 2010), ácido succínico

(Chayabutra; Wu; Ju, 2001) e ácido caproico (Dams et al., 2016), além de combustíveis como hidrogênio (Ito et al., 2005; Vasconcelos; Leitão; Santaella, 2016), etanol e *n*-butanol (Biebl, 2001), por diferentes rotas biológicas, utilizando-se diferentes microrganismos.

A rápida expansão do mercado do biodiesel está alterando drasticamente o custo e a disponibilidade de glicerol, visto que, pela rota da transesterificação, a cada 10 kg de biodiesel produzido gera-se cerca de 1 kg de glicerol. Em 2009, Adhami et al., (2009) já alertavam que o aumento da demanda de biodiesel que estava por vir poderia levar o mercado a não acomodar a quantidade excessiva de glicerol a ser produzido. Portanto, a aplicação eficaz desse glicerol residual é vital para a melhoria da economia e sustentabilidade na indústria de biodiesel (Khanna; Goyal; Moholkar, 2013).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer condições nutricionais do processo fermentativo de produção de *n*-butanol utilizando-se microrganismos do gênero *Clostridium* sp., via rota biológica anaeróbia, em escala de bancada. Para isso, foram testadas quatro cepas em diferentes condições de processo, como: meios de cultura complexo e sintético, diferentes formas de preparo dos meios de cultura, duas diferentes fontes de carbono, diferentes valores de pH inicial, diferentes tempos de incubação, processos com e sem agitação e o uso de práticas de engenharia evolutiva. Durante a pesquisa foi testado um substrato padrão (glicose), de acordo com a literatura, para se estabelecer as condições padrão do processo, e um substrato oriundo da cadeia produtiva do biodiesel (glicerol) como fonte de energia e carbono. O glicerol foi usado com o propósito de se agregar valor a este subproduto, o que possibilitaria aumentar a sustentabilidade desta cadeia produtiva.

## 2. Material e Métodos

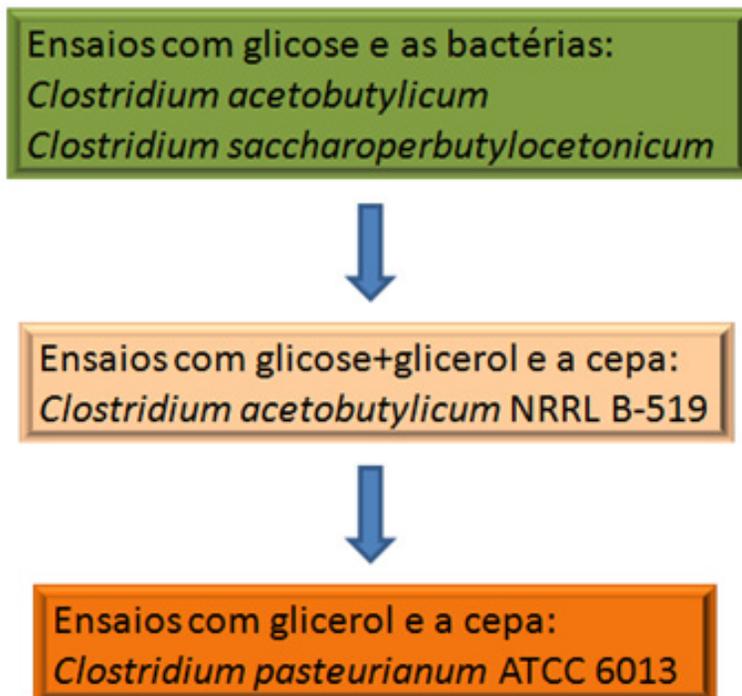
---

### 2.1. Planejamento da pesquisa

Primeiramente, ensaios fermentativos foram realizados com as cepas *Clostridium acetobutylcum* ATCC 824, *Clostridium acetobutylcum* NRRL B-519 e *Clostridium saccharoperbutylocetonicum* ATCC 27022, que já se encontravam prontamente disponíveis na Embrapa Agroindústria Tropical.

Os ensaios iniciais foram realizados utilizando-se glicose como fonte de energia e carbono para avaliar a produção, visto que vários relatos na literatura apontam a glicose como substrato favorável à produção de *n*-butanol. Posteriormente, foram realizados ensaios usando-se o glicerol como substrato principal com os mesmos microrganismos, uma vez que já estavam disponíveis na coleção de cultura da Embrapa Agroindústria Tropical, mesmo havendo poucos trabalhos com esses microrganismos utilizando-se glicerol como fonte de energia e carbono.

A partir dos resultados obtidos com os microrganismos supracitados, nos quais a produção de *n*-butanol a partir do glicerol foi baixa quando comparada com valores relatados na literatura, optou-se por adquirir a cepa *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013, que é conhecida como produtora de *n*-butanol usando-se glicerol como substrato (Moon et al., 2011). Na Figura 1, está apresentado o diagrama de blocos simplificado das principais etapas do trabalho.



**Figura 1.** Diagrama de blocos simplificado das principais etapas do trabalho.

## 2.2. Estoque de microrganismos, ativação e inóculo

As bactérias utilizadas neste estudo foram: *Clostridium acetobutylicum* CCT 0485, que corresponde à linhagem ATCC 824 (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA); *Clostridium acetobutylicum* CCT 0424, que corresponde à linhagem NRRL B-519 (ARS Culture Collection, Peoria, IL); *Clostridium saccharoperbutyloceticum* CCT 1819, que corresponde à linhagem ATCC 27022; e *Clostridium pasteurianum* CCT 0203, que corresponde à linhagem ATCC 6013. As linhagens foram adquiridas por meio da Coleção de Cultura Tropical André Tosello – Campinas, SP.

A preservação foi realizada em meio RCM (Reinforced Clostridial Medium) (Hirsch; Grinsted, 1954), pH inicial 7,0, cuja composição é indicada na Tabela 1, e estocada sob temperatura de refrigeração ( $4 \pm 1$  °C). As cepas também foram preservadas por técnica de criopreservação (ultrafreezer a  $-85$  °C), conforme protocolo estabelecido pela Coleção de Culturas do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE (Smith; Onions, 1994).

**Tabela 1.** Composição do meio de cultivo RCM de acordo com Hirsch e Grinsted (1954).

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de carne	10,0
Peptona	10,0
Amido solúvel	1,0
Cloreto de cisteína	0,5
NaCl	5,0
Acetato de sódio	3,0
Agar	0,5

A propagação do inóculo foi realizada em meio RCM. Para isso, 10 mL da cultura estoque, mantida sob refrigeração ( $4 \pm 1$  °C), foi repicada em frasco Schott (Figura 2) contendo 100 mL de meio RCM. Após a inoculação, os frascos foram purgados na fase líquida e no *headspace* com nitrogênio por 1 min, e incubados em condições estáticas (TE-391, TECNAL) a  $37 \pm 1$  °C por 72 h para serem usadas nos ensaios de produção de *n*-butanol. A

quantidade de células adicionadas nos ensaios fermentativos foi suficiente para atingir concentração de 0,18 g/L nos frascos, fazendo-se uso de uma curva de calibração de absorbância versus concentração de massa seca de microrganismos (g/L).



**Figura 2.** Frasco Schott utilizado no processo biológico anaeróbio.

### **2.3. Ensaios sobre o efeito da concentração inicial de glicose e formas de adição de vitaminas na produção de *n*-butanol**

Para se avaliar o efeito da concentração inicial de glicose e de diferentes formas de adição das vitaminas (biotina e ácido *p*-aminobenzóico) ao meio de cultivo na produção de *n*-butanol, foi realizado um ensaio com a cepa *C. acetobutylicum* ATCC 824 e o meio de cultivo de acordo com Gungormusler et al. (2010), conforme descrito nas Tabelas 2 e 3. As concentrações de glicose estudadas foram seguindo procedimentos de Monot et al. (1982). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 110°C por 10 min, e as condições experimentais em relação à adição de vitaminas e de glicose inicial são apresentadas na Tabela 4.

Os ensaios foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 100 mL de volume reacional e pH inicial de 6,5. Após a inoculação, os frascos foram purgados na fase líquida e no *headspace* com nitrogênio por 1 min, e incubados em condições estáticas (TE-391, TECNAL) a  $37 \pm 1$  °C por 72 h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**Tabela 2.** Composição do meio de cultivo para a produção de *n*-butanol de acordo com Gungormusler et al. (2010).

Componentes	Concentração
Glicose g/L	Tabela 4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,015 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005 g/L
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,01 g/L
Extrato de levedura	1,0 g/L
Biotina	0,01 g/L
Solução elemento-traço*	2,0 mL/L

\* Tabela 3.

**Tabela 3.** Solução de elementos-traço para composição do meio de cultivo de acordo com Gungormusler et al. (2010).

Componentes	Concentração (g/L)
ZnCl <sub>2</sub>	0,07
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06
CoCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,20
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,50
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,035
HCl (37%)	0,90 (mL/L)

**Tabela 4.** Condições experimentais para adição de vitaminas e glicose.

Nutrientes	Experimento		
	1	2	3
Vitaminas	Adicionadas ao meio de cultivo antes da esterilização	Esterilizadas por filtração em membrana de PES de 0,22 µm (TPP, Suíça)	Não houve adição de vitaminas ao meio de cultivo
Glicose	80 g/L	20 e 80 g/L	80 g/L

## 2.4. Ensaios sobre a influência do pH inicial na produção de *n*-butanol

Para se avaliar diferentes valores de pH inicial na produção de *n*-butanol, experimentos foram realizados com o *C. acetobutylicum* ATCC 824 e o meio de cultivo de acordo com Gungormusler et al. (2010), descrito nas Tabelas 2 e 3, contendo 80 g/L de glicose.

Os valores iniciais de pH testados foram 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,0. Após o ajuste do pH, os meios de cultivo foram esterilizados a 110 °C por 10 min. Os ensaios foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 100 mL de volume reacional. Após a inoculação, os frascos foram purgados na fase líquida e no *headspace* com nitrogênio por 1 min, e incubados de forma agitada a 100 rpm em incubador rotatório (TE-420, TECNAL) a  $37 \pm 1$  °C por 72 h. As vitaminas foram adicionadas ao meio de cultura após esterilização por filtração em membrana de PES de 0,22 µm (TPP, Suíça), devido a seu caráter termolábil, mesmo aparentemente não sendo ainda o melhor método, segundo os resultados do item anterior. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## **2.5. Ensaios sobre o uso de diferentes cepas de Clostrídio na produção de *n*-butanol**

Neste ensaio, foi realizada a avaliação das cepas *Clostridium acetobutylicum* NRRL B-519 e *Clostridium saccharoperbutyloceticum* ATCC 27022 na produção de *n*-butanol, uma vez que estas duas cepas também são citadas na literatura como produtoras deste metabólito (Li; Baral; Jha, 2014). Foi utilizado o meio de cultivo de acordo com Gungormusler et al. (2010), contendo 80 g/L de glicose, cuja composição está descrita no item 2.3. Foram avaliados, também, dois valores de pH, 4,5 e 6,5.

Após o ajuste do pH, os meios de cultivo foram esterilizados a 110 °C por 10 min. Os ensaios foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 100 mL de volume reacional. Após a inoculação, os frascos foram purgados na fase líquida e no *headspace* com nitrogênio por 1 min, e incubados de forma agitada a 100 rpm em incubador rotatório (TE-420, TECNAL) por 72 h. A temperatura de processo foi de 37 °C para a cepa NRRL B-519 (Biebl, 1999) e 30 °C para a cepa ATCC 27022, conforme recomendado por Keis, Shaheen e Jones (2001). As vitaminas foram esterilizadas por filtração em membrana de PES de 0,22 µm (TPP, Suíça), e os ensaios foram realizados em triplicata.

## **2.6. Ensaio sobre o uso do meio de cultivo RCM na produção de *n*-butanol**

Para este ensaio, foi realizada uma fermentação com o *C. acetobutylicum* ATCC 824. A quantidade de glicose utilizada no meio de cultivo foi de 80 g/L.

Foram avaliados também dois valores de pH, 4,5 e 6,5. Após o ajuste do pH, os meios de cultivo foram esterilizados a 110 °C por 10 min. Os ensaios foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 100 mL de volume reacional. Após a inoculação, os frascos foram purgados na fase líquida e no *headspace* com nitrogênio por 1 min, e incubados de forma agitada a 100 rpm em incubador rotatório (TE-420, TECNAL) a  $37 \pm 1$  °C por 72 h. As vitaminas foram esterilizadas por filtração em membrana de PES de 0,22 µm (TPP, Suíça). Os experimentos foram realizados em triplicata.

## **2.7. Ensaio sobre o efeito do tempo de processo na produção de *n*-butanol**

Esta etapa consistiu em avaliar se o tempo maior de processo (10 d) favoreceria a produção de *n*-butanol quando comparado com o tempo de 3 dias praticado nos ensaios anteriores. Para isto, foram realizadas fermentações com as cepas *C. acetobutylicum* ATCC 824 e *C. acetobutylicum* NRRL B-519, utilizando-se dois meios de cultivo, sendo um deles o RCM (Tabela 1, item 2.2) e o outro de acordo com Gungormusler et al. (2010), cuja composição está descrita no item 2.3 (Tabelas 2 e 3). A quantidade de glicose utilizada nos dois meios de cultivo foi de 80 g/L, e o pH inicial foi de 6,5.

Após o ajuste do pH, os meios de cultivo foram esterilizados a 110 °C por 10 min. Os ensaios foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 100 mL de volume reacional. Após a inoculação, os frascos foram purgados na fase líquida e no *headspace* com nitrogênio por 1 min, e incubados de forma agitada a 100 rpm em incubador rotatório (TE-420, TECNAL) a  $37 \pm 1$  °C. Neste ensaio, as vitaminas (biotina e ácido *p*-aminobenzoico) foram adicionadas no momento da inoculação, sem filtração ou outro método de esterilização, pois elas apresentaram baixa solubilidade quando se tentava esterilizá-las por filtração, em ensaios anteriores, além de serem sensíveis ao calor. O tempo de processo que foi de 10 dias, e os ensaios foram realizados em triplicata.

## **2.8. Ensaio sobre o uso de glicerol como substrato para produção de *n*-butanol**

Este ensaio consistiu em avaliar o glicerol como principal substrato, fonte de energia e carbono para a produção de *n*-butanol. Para isso, foram

realizadas fermentações com o *C. acetobutylicum* NRRL B-519, utilizando-se o meio de cultivo RCM (Tabela 1, item 2.2) como suplemento de nutrientes. Glicerol P.A. ou uma mistura de glicerol e glicose foram usados como principal fonte de energia e carbono. Os experimentos foram realizados de acordo com a Tabela 5.

Após o ajuste do pH (6,5), os meios de cultivo foram esterilizados a 110 °C por 10 min. Os ensaios foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 100 mL de volume reacional. Após a inoculação, os frascos foram purgados na fase líquida e no *headspace* com nitrogênio por 1 min, e incubados de forma agitada a 100 rpm em incubador rotatório (TE-420, TECNAL) a 37 ± 1 °C. Neste ensaio, as vitaminas foram adicionadas no momento da inoculação, sem que fossem esterilizadas. O tempo de processo foi de 10 dias, sendo os ensaios realizados em triplicata.

**Tabela 5.** Concentrações dos substratos nos diferentes ensaios.

Substrato	Experimento					
	1	2	3	4	5	6
Glicerol (g/L)	10,0	20,0	30,0	15,0	20,0	40,0
Glicose (g/L)	-	-	-	15,0	40,0	20,0

## 2.9. Ensaio sobre o uso do *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 com glicerol como substrato

A cepa *C. pasteurianum* ATCC 6013 foi usada para a produção de *n*-butanol, empregando-se o glicerol P.A. como principal substrato neste ensaio. Os experimentos foram realizados com a utilização do meio de cultivo MP2 (Moon et al., 2011), conforme a Tabela 6. O pH inicial foi ajustado para 6,5, e as vitaminas (tiamina, biotina e ácido *p*-aminobenzóico) foram esterilizadas por meio de luz ultravioleta por 15 min e adicionadas, de acordo com os experimentos, no momento da inoculação.

Após o ajuste do pH, os meios de cultivo foram esterilizados a 110 °C por 10 min. Os ensaios foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 100 mL de volume reacional. Após a inoculação, os frascos foram purgados na fase líquida e no *headspace* com nitrogênio por 1 min, e incubados de forma agitada a 100 rpm em incubador rotatório (TE-420, TECNAL) a

37 ± 1 °C. O tempo de processo foi de 15 d (Moon et al., 2011), e os ensaios foram realizados em triplicata.

Foram realizados três experimentos, um com as vitaminas tiamina, biotina e ácido *p*-aminobenzoico (Exp. 1) e outro sem adição destas vitaminas (Exp. 2), utilizando-se o meio de cultivo MP2 (Moon et al., 2011), conforme a Tabela 6. Um terceiro experimento (Exp. 3) foi realizado com o emprego de um meio MP2 otimizado por Moon et al. (2011) para produção de *n*-butanol, conforme apresentado na Tabela 7.

**Tabela 6.** Composição do meio de cultivo MP2 segundo Moon et al. (2011).

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	20,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,01
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·SO <sub>4</sub>	2,00
NaCl	0,01
Extrato de levedura	1,00
Biotina	0,01 (mg/L)
Tiamina	1,0 (mg/L)
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	1,0 (mg/L)

**Tabela 7.** Composição do meio de cultivo MP2 modificado segundo Moon et al. (2011).

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	20,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
Extrato de levedura	0,10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·SO <sub>4</sub>	5,00
NaCl	0,01
Biotina	0,01 (mg/L)
Tiamina	1,0 (mg/L)
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	1,0 (mg/L)

## 2.10. Ensaio sobre o efeito de diferentes meios de cultura na produção de *n*-butanol utilizando-se *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 e glicerol como substrato

Diferentes meios de cultivo foram testados para o crescimento do *C. pasteurianum* ATCC 6013, empregando-se o glicerol P.A. como principal

substrato, visando à produção de *n*-butanol. Os experimentos foram realizados com a utilização de meios de cultivo segundo Colin, Bories e Moulin (2000); Gallardo, Alves e Rodrigues (2014); Gallazzi et al. (2015); Kao et al. (2013); e Szymanowska-Powalowska, Orczyk e Leja (2014), conforme as Tabelas de 8 a 15. Um sexto meio utilizado foi o RCM (Tabela 1, item 2.2).

Após o ajuste do pH (6,5), os meios de cultivo foram esterilizados a 110 °C por 10 min. Os ensaios foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 100 mL de volume reacional. Após a inoculação, os frascos foram purgados na fase líquida e no *headspace* com nitrogênio por 1 min, e incubados de forma agitada a 100 rpm em incubador rotatório (TE-420, TECNAL) a  $37 \pm 1$  °C. A quantidade de glicerol inicial que foi de 40 g/L. Dessa forma, a concentração inicial do glicerol também foi avaliada frente aos experimentos do item 2.9 (20 g/L de glicerol inicial), mesmo não se utilizando os meios de cultura do item 2.9 (MP2). O tempo de processo foi de 15 dias, sendo os ensaios realizados em triplicata.

**Tabela 8.** Composição do meio de cultivo segundo Kao et al. (2013).

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	40,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,005
MnSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,015
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5x10 <sup>6</sup>
CoCl <sub>2</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,25x10 <sup>4</sup>
Extrato de levedura	4,0
Cisteína	0,5

**Tabela 9.** Composição do meio de cultivo segundo Gallardo, Alves e Rodrigues (2014).

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	40,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NH <sub>4</sub> Cl	3,0
Extrato de levedura	1,0
Cisteína	0,5
NaCl	0,01
Sol. ácida*	1,0 (mL/L)
Sol. básica**	1,0 (mL/L)

\*Tabela 10; \*\*Tabela 11.

**Tabela 10.** Solução ácida do meio de cultivo segundo Gallardo, Alves e Rodrigues (2014).

Componentes	Concentração (g/L)
HCl	1,8
MnCl <sub>2</sub>	0,06
FeCl <sub>2</sub>	0,94
CoCl <sub>2</sub>	0,06
NiCl <sub>2</sub>	0,01
ZnCl <sub>2</sub>	0,06

**Tabela 11.** Solução básica do meio de cultivo segundo Gallardo, Alves e Rodrigues (2014).

Componentes	Concentração (g/L)
NaOH	0,4
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,02

**Tabela 12.** Composição do meio de cultivo segundo Szymanowska-Powałowska, Orczyk, Leja (2014).

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	40,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,26
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,02
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
FeCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .SO <sub>4</sub>	1,23

**Tabela 13.** Composição do meio de cultivo segundo Gallazzi et al. (2015).

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	40,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de carne	10,0
Triptona	10,0
NaCl	5,0
Acetato de sódio	3,0

**Tabela 14.** Composição do meio de cultivo segundo Colin, Bories e Moulin (2000).

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	40,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	3,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3
CaCl <sub>2</sub>	0,02
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .SO <sub>4</sub>	2,0
Extrato de levedura	2,0
Cisteína	0,12
Sol. mineral*	40,0(mL/L)

\*Tabela 15

**Tabela 15.** Solução mineral do meio de cultivo segundo Colin, Bories e Moulin (2000).

Componentes	Concentração (g/L)
EDTA	5,0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,03
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,0
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaMoO <sub>4</sub>	0,03
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,036
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,005

## **2.11. Ensaio sobre os efeitos de repiques sucessivos para produção de *n*-butanol utilizando-se *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 e glicerol como substrato**

Este ensaio foi realizado visando à adaptação da cepa ao glicerol P.A. como substrato, fazendo-se um repique após o primeiro período de incubação. O meio de cultura usado foi o RCM, e, após 15 d de incubação na primeira etapa, um repique foi realizado de forma asséptica em outro meio RCM. Nesta segunda fermentação, o crescimento celular e a formação de metabólitos foram monitorados por 21 dias, sendo coletadas amostras a cada 7 dias.

Após o ajuste do pH (6,5), os meios de cultivo foram esterilizados a 110 °C por 10 min. Os ensaios foram realizados em frascos Schott de 250 mL com 100 mL de volume reacional. Após a inoculação, os frascos foram purgados na fase líquida e no *headspace* com nitrogênio por 1 min, e incubados de forma agitada a 100 rpm em incubador rotatório (TE-420, TECNAL) a 37 ± 1 °C. Devido aos baixos resultados de metabólitos dos itens 2.10, a quantidade de glicerol inicial foi novamente de 20 g/L. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## **2.12. Métodos analíticos**

### **2.12.1. Crescimento microbiano**

A quantificação da biomassa microbiana foi realizada por método espectrofotométrico. A biomassa foi separada do meio de cultivo por centrifugação (18.406,7 x *g* por 10 min) e, em seguida, ressuspenso em água destilada e convenientemente diluída. A absorbância da amostra diluída foi determinada em espectrofotômetro (Varian CARY 50) a 600 nm. Para a conversão de absorbância em biomassa seca (g/L), utilizou-se curva padrão específica para cada microrganismo, sendo a curva renovada a cada 3 meses.

### **2.12.2. Quantificação dos metabólitos**

As determinações dos ácidos acético, butírico, succínico, láctico, dos ácidos graxos (propiónico, valérico, isovalérico e hexanóico), dos álcoois *n*-butanol (1-butanol), 2-butanol, 1,3-PD, etanol, da acetona, glicose e glicerol, foram realizadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Shimadzu)

com o emprego da coluna Aminex HPX-87H (BIORAD), temperatura do forno de 65 °C, ácido sulfúrico 0,005 mM em água MiliQ como fase móvel e uma vazão de 0,6 mL/min utilizando-se o índice de refração para detecção (RID-10A, Shimadzu). O teste de diferença das médias (Teste - t) ( $\alpha = 0,05$ ) foi realizado com a utilização do *software* Statistica 7.0.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Avaliação da concentração inicial de glicose e formas de adição de vitaminas

Foi realizada uma avaliação da concentração inicial de glicose, bem como da forma de se esterilizar e adicionar as vitaminas (biotina e ácido *p*-aminobenzóico), para o processo anaeróbio de produção de *n*-butanol com a cepa *C. acetobutylicum* ATCC 824 e o meio de cultivo de acordo com Gungormusler et al. (2010). Os resultados de biomassa celular e dos metabólitos obtidos estão apresentados na Tabela 16.

De acordo com os resultados apresentados e os testes para diferença de média (Teste - t), observa-se que não há diferença significativa de valor para a produção de biomassa ( $p = 0,0547$ ), ácido acético ( $p = 0,06345$ ) e ácido butírico ( $p = 0,0516$ ) para os quatros experimentos realizados.

**Tabela 16.** Metabólitos obtidos, biomassa celular produzida e glicose consumida no ensaio realizado para avaliação da concentração inicial de glicose bem como a forma de se esterilizar as vitaminas.

Experimentos	Ácido Acético (g/L)	Ácido Butírico (g/L)	Biomassa celular (g/L)	Glicose consumida (g/L)
Exp. 1	0,36±0,20	1,01±0,22	0,65±0,06	8,6±1,03
Exp. 2 (20 g/L glicose)	0,35±0,24	0,86±0,21	0,78±0,18	2,1±0,65
Exp. 2 (80 g/L glicose)	0,45±0,14	1,23±0,07	0,89±0,16	9,2±1,26
Exp. 3	0,61±0,28	1,29±0,30	0,81±0,2	10,2±1,89

Exp. 1 - vitaminas esterilizadas por calor e (80 g/L glicose); Exp. 2 - vitaminas esterilizadas por filtração; Exp. 3 - sem uso de vitaminas e (80 g/L glicose).

Provavelmente, as vitaminas podem ter sido degradadas pelo calor da esterilização no Exp. 1. Já no Exp. 2, observou-se que a solução turva de vitamina clareava ao ser filtrada; portanto, parte delas pode ter ficado retida nos filtros. O Exp. 3, sem vitaminas, serviu como controle, mostrando a mesma produção de biomassa, ácido acético e ácido butírico. Tal resultado pode indicar que os dois métodos anteriores de adição das vitaminas não foram eficientes. Outros metabólitos, como ácidos succínico, ácido lático, *n*-butanol, 1,3-PD, etanol e acetona, não foram produzidos nas condições estudadas, o que pode ser resultado da falta de nutrientes no meio de cultivo.

Observou-se um baixo consumo do substrato (glicose) em comparação com a quantidade de glicose inicial contida no meio. Também foi observada uma produção de biomassa celular inferior à citada na literatura (2,0 - 3,0 g/L) (Ezeji; Qureshi; Blaschek, 2004). Tal resultado pode indicar que existiram fatores que limitaram ou inibiram o processo como um todo (produção de biomassa celular, consumo de substrato e formação de metabólitos).

### **3.2. Avaliação do efeito do pH inicial na produção de *n*-butanol**

Segundo Monot, Engasser e Petitdemange (1984), o pH pode influenciar na produção de *n*-butanol; portanto, realizou-se um experimento de produção de *n*-butanol variando-se o pH inicial de 4,5 a 7,0. Nesta etapa, também foi avaliado o efeito da agitação, comparando-se com o ensaio reportado no item 3.1. Na Tabela 17 estão apresentados os resultados de metabólitos e biomassa celular produzida e pH final obtidos no ensaio de avaliação da influência do pH do meio de cultivo para produção de *n*-butanol, utilizando-se o *C. acetobutylicum* ATCC 824 e o meio de cultivo de acordo com Gungormusler et al. (2010).

Pode-se observar que nos meios de cultivo com pH inicial de 4,5 a 6,0 e pH 7,0 o crescimento microbiano foi reduzido. O maior crescimento microbiano ocorreu no meio de cultivo com pH 6,5. Observou-se, também, que apenas com pH inicial de 6,5 houve produção de *n*-butanol (0,41 g/L). Além disso, no meio de cultivo com pH inicial de 6,5, foram obtidos os maiores valores de ácido acético (0,79 g/L) e ácido butírico (1,17 g/L) e valor de pH final foi o mais baixo, 4,3. Portanto, o melhor valor de pH para o crescimento microbiano e produção de *n*-butanol foi 6,5, nas condições aqui estudadas.

**Tabela 17.** Produção de ácido acético, ácido butírico e biomassa celular por *C. acetobutylicum* ATCC 824 com variação do pH inicial do meio de cultivo.

pH inicial	Ácido Acético (g/L)	Ácido Butírico (g/L)	pH final	Biomassa celular (g/L)
4,5	0,46±0,14	0,00±0,00	4,8	0,11±0,01
5,0	0,13±0,01	0,00±0,00	4,9	0,09±0,01
5,5	0,13±0,00	0,20±0,04	5,0	0,08±0,02
6,0	0,16±0,00	0,12±0,01	5,1	0,08±0,01
6,5	0,79±0,04	1,17±0,21	4,3	0,81±0,03
7,0	0,15±0,00	0,07±0,01	5,9	0,06±0,02

Aparentemente, a agitação de 100 rpm utilizada neste ensaio (pH inicial de 6,5) favoreceu a produção de *n*-butanol, quando se compara estes resultados com os do item 3.1 (Exp. 2, com 80 g/L de glicose inicial), em que não se observou a produção de *n*-butanol. No entanto, a produção de biomassa celular foi a mesma nos dois ensaios, e a produção de *n*-butanol ainda ficou muito aquém dos valores (14 g/L) encontrados por Jiang et al. (2014).

### 3.3. Avaliação da produção de *n*-butanol utilizando-se cepas *C. acetobutylicum* NRRL B-519 e *C. saccharoperbutyloceticum* ATCC 27022

Após a avaliação do pH inicial do meio de cultivo, foi realizada a avaliação das cepas *C. acetobutylicum* NRRL B-519 e *C. saccharoperbutyloceticum* ATCC 27022 na produção de *n*-butanol utilizando-se meio de cultivo de acordo com Gungormusler et al. (2010). Nas Tabelas 18 e 19 estão apresentados os resultados de biomassa celular e metabólitos produzidos dos experimentos realizados em pH inicial de 4,5 e 6,5. Apesar de o ensaio anterior com a cepa ATCC 824 e pH 4,5 não favorecer a produção de *n*-butanol, esta condição foi repetida nesta etapa, conforme recomendado por Monot et al. (1982) para produção de *n*-butanol, pois o pH inicial ótimo pode ser diferente para cada cepa microbiana.

**Tabela 18.** Metabólitos e biomassa celular produzida durante o processo biológico anaeróbico com a cepa *C. acetobutylicum* NRRL B-519.

pH inicial	Ácido Acético (g/L)	1,3-PD (g/L)	Acetona (g/L)	<i>n</i> -butanol (g/L)	Etanol (g/L)	Biomassa celular (g/L)
4,5	0,21±0,04	0,42±0,02	0,66±0,08	0,71±0,11	1,12±0,12	1,27±0,02
6,5	0,16±0,01	0,38±0,01	1,02±0,17	1,44±0,32	1,79±0,24	2,17±0,13

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 18, pode-se observar uma produção de acetona, *n*-butanol e etanol nos experimentos com a cepa *C. acetobutylicum* NRRL B-519, conhecida por fermentação ABE (Ezeji; Qureshi; Blaschek, 2004). Por outro lado, não se observou a produção de acetona e nem de *n*-butanol quando se utilizou a cepa *C. saccharoperbutyloceticum* ATCC 27022 (Tabela 19), descaracterizando a fermentação ABE.

Não foi observada a produção de ácido butírico em até 72 h nos dois processos. Entretanto, de acordo com Li, Baral e Jha (2014), o ácido butírico é produzido e pode ser reassimilado pelo microrganismo *C. acetobutylicum* para produção do *n*-butanol. Os valores médios de pH final foram de 4,5±0,4 para os experimentos com a cepa NRRL B-519.

**Tabela 19.** Metabólitos e biomassa celular produzida durante o processo biológico anaeróbico com a cepa *C. saccharoperbutyloceticum* ATCC 27022.

pH inicial	Ácido Acético (g/L)	1,3-PD (g/L)	Etanol (g/L)	Ácido Succínico (g/L)	Biomassa celular (g/L)
4,5	0,71±0,24	0,82±0,25	2,28±0,32	0,00±0,00	3,77±0,55
6,5	0,79±0,09	1,02±0,41	0,08±0,01	0,16±0,02	2,21±0,07

Portanto, a cepa NRRL B-519 foi a única que produziu *n*-butanol e cujos resultados se aproximaram aos da literatura em relação à produção de biomassa celular (2,0 - 3,0 g/L) e à fermentação ABE (Ezeji; Qureshi; Blaschek, 2004). Todavia, a quantidade de *n*-butanol produzido foi bem abaixo do já encontrado por Jiang et al. (2014) (14 g/L). O valor inicial de pH em 6,5 foi o que mais favoreceu o processo.

Para os resultados dos experimentos com a cepa *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27022 (Tabela 19), pode-se observar uma maior produção de ácido acético, 1,3-PD, etanol e biomassa celular quando comparado com os resultados da cepa NRRL B-519; porém, esta linhagem não produziu *n*-butanol. Foi observada, também, uma produção de ácido succínico (Chayabutra; Wu; Ju, 2001). Os valores médios de pH final foram de  $4,0 \pm 0,6$  para os experimentos com a cepa ATCC 27022, e o pH inicial de 4,5 foi o que mais favoreceu a produção de ácido acético, 1,3-PD e etanol, bem como a biomassa celular. Já o valor inicial de pH 6,5 foi o que propiciou a formação de ácido succínico.

### 3.4. Avaliação da produção de *n*-butanol utilizando-se o meio de cultivo RCM

O uso de meios de cultura sintéticos testados não promoveu aumento na produção de *n*-butanol. Provavelmente, houve deficiência nutricional. Isso pode ser resolvido usando-se o meio RCM, que contém substratos complexos como extrato de carne, levedura e peptona, fontes de minerais, vitaminas e aminoácidos, favorecendo o crescimento das linhagens de *Clostridium*, que são bactérias exigentes em termos nutricionais (Li; Baral; Jha, 2014).

Mesmo não tendo bons resultados de *n*-butanol com a cepa ATCC 824 e melhores resultados com a cepa NRRL B-519 nos ensaios anteriores, neste ensaio escolheu-se a linhagem ATCC 824 para os experimentos, pois esta é a cepa mais citada na literatura para produção de *n*-butanol, inclusive com estudo de rotas metabólicas (Girbal et al., 1995). Na Tabela 20 estão apresentados os resultados dos metabólitos produzidos no ensaio com meio RCM e a cepa *C. acetobutylicum* ATCC 824 em dois valores de pH inicial.

**Tabela 20.** Metabólitos e biomassa celular produzida durante o processo biológico anaeróbio para produção de *n*-butanol com a cepa *C. acetobutylicum* ATCC 824 e o meio RCM.

pH inicial	Ácido Butírico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	1,3-PD (g/L)	Etanol (g/L)	Biomassa celular (g/L)
4,5	0,22±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	3,77±0,55	0,17±0,02
6,5	2,04±0,41	2,33±0,01	0,02±0,02	2,21±0,07	2,17±0,99

Pode-se observar uma produção de ácidos orgânicos e álcoois no processo em que se utiliza meio RMC como fonte de nutrientes. No experimento com pH inicial de 6,5, foram produzidas quantidades significativas de ácido butírico quando comparadas com a literatura, na qual é citado que a quantidade de ácido butírico precisa ser de 1,9 g/L para que ocorra o produção do *n*-butanol (Monot; Engasser; Petitdemange, 1984). Também houve produção de ácido láctico, produto com valor de mercado relativamente elevado (Guilherme et al., 2012), e uma discreta produção de 1,3-PD no experimento com pH inicial de 6,5. O etanol também foi produzido, porém com maior valor no experimento com pH inicial de 4,5.

Quando se compara este resultado de 2,17 g/L de biomassa celular com experimentos realizados anteriormente com a cepa ATCC 824 em meios de cultura sintéticos, em que se obteve no máximo 0,8 g/L de biomassa celular, pode-se deduzir que o fator “nutrientes” influenciou nos resultados. Os valores de biomassa aqui alcançados corroboram a literatura (2,0 - 3,0 g/L) (Ezeji; Qureshi; Blaschek, 2004).

Não foi detectada a produção de *n*-butanol nem tampouco de acetona, descaracterizando a fermentação ABE. Uma hipótese para este fato pode ser um tempo de processo reduzido (72 h). Dessa forma, ensaios com maior tempo de processo foram realizados e os resultados estão apresentados no item 3.5.

### **3.5. Determinação do tempo de processo para produção de *n*-butanol**

Diante dos resultados encontrados anteriormente, foram observadas quantidades de biomassa microbiana compatível com a literatura (2,0 - 3,0 g/L) ((Ezeji; Qureshi; Blaschek, 2004) para o *C. acetobutylicum* NRRL B-519 crescido em meio de cultivo de acordo com Gungormusler et al. (2010); e para o *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescido em meio de cultivo RCM. Também foi com a cepa NRRL B-519, crescida em meio de cultivo segundo Gungormusler et al. (2010), que se conseguiu produzir *n*-butanol até o presente momento. Portanto, a partir destes resultados, foi realizado um ensaio com estas duas cepas, crescidas nestes dois meios e adicionando-se glicose (80 g/L) como fonte de carbono e pH inicial de 6,5, com um tempo

maior de processo, visando à produção de *n*-butanol. Os valores de glicose inicial e pH foram baseados em experimentos anteriores nos quais se observou a produção de *n*-butanol e biomassa celular.

Este ensaio durou 10 dias com o propósito de favorecer esta rota metabólica, aumentando-se o tempo de processo, pois foi observada uma produção de ácido butírico no experimento com a cepa *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescida em meio RCM por 3 d (item 3.4); no entanto, não foi observada a reassimilação deste ácido para produção de *n*-butanol (Li; Baral; Jha, 2014). Na Tabela 21 estão os resultados dos metabólitos e biomassa celular para o processo biológico de produção de *n*-butanol ocorrido por 10 dias.

**Tabela 21.** Produção de metabólitos e biomassa celular durante o processo para produção de *n*-butanol com duração de 10 d.

Experi- mentos	Ác. Butírico (g/L)	<i>n</i> -butanol (g/L)	Acetona (g/L)	Biomassa celular (g/L)
A	3,15±0,29	0,0±0,0	0,0±0,0	0,92±0,08
B	0,57±0,07	0,0±0,0	0,0±0,0	0,72±0,23
C	1,53±0,01	4,6±0,37	2,6±0,07	0,4±0,16
D	1,13±0,1	0,03±0,1	0,0±0,0	0,55±0,2

A: *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescido em meio de cultivo RCM; B: *C. acetobutylicum* ATCC 824 crescido em meio de cultivo de acordo com Gungormusler et al. (2010); C: *C. acetobutylicum* NRRL B-519 crescido em meio de cultivo RCM; D: *C. acetobutylicum* NRRL B-519 crescido em meio de cultivo de acordo com Gungormusler et al. (2010).

Pode-se observar uma produção de 4,6 g/L de *n*-butanol utilizando-se a cepa *C. acetobutylicum* NRRL B-519 crescida em meio de cultivo RCM. Também foram obtidos 2,6 g/L de acetona, não sendo detectada a produção de etanol no mesmo experimento. A utilização do meio de cultivo RCM proporcionou os melhores resultados em *n*-butanol. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de o meio RCM ser rico em vitaminas, especialmente aquelas pertencentes ao complexo B, minerais e aminoácidos, o que pode ter induzido a produção dos metabólitos.

O tempo de processo também parece ter influenciado a produção de *n*-butanol. Neste processo biológico, os ácidos acético e butírico são produzidos na fase *Log*, também chamada de acidogênese. Em seguida,

estes ácidos são reassimilados na fase estacionária para produção dos solventes acetona, *n*-butanol e etanol, denominada fase de solventogênese (Li; Baral; Jha, 2014). De acordo com Tortora, Funke e Case (2012), os processos anaeróbios se caracterizam por terem crescimento microbiano mais lento, quando comparados com os aeróbios, devido às suas características bioquímicas e formação de ATP. Portanto, o tempo de reação estendido para 10 d parece ter sido fundamental para a produção de *n*-butanol aqui obtida.

Pode-se observar que as quantidades de ácido butírico foram maiores quando o processo foi realizado em meio RCM, mais um indicativo que este meio favorece a rota da fermentação ABE. Todavia, a linhagem ATCC 824, que produziu as maiores quantidades deste ácido, não foi capaz de produzir o *n*-butanol. Dessa forma, algum fator limitante ou inibitório (ou ambos) está atuando nesta rota metabólica, o qual ainda não foi elucidado neste trabalho.

Para a produção de biomassa celular, foram observados valores abaixo dos encontrados por outros autores (2 g/L). Provavelmente, no tempo de processo de 10 d parte das células já se encontrava em lise ou na forma de esporos, o que diminui o valor de leitura da absorbância. Os valores finais de pH ficaram em  $5,0 \pm 0,5$ . O consumo de substrato foi muito aquém da quantidade adicionada (80 g/L de glicose inicial), e este fato foi observado em todos os ensaios realizados até esta etapa.

### **3.6. Avaliação da produção de *n*-butanol utilizando-se glicerol como substrato**

Este ensaio consistiu em avaliar o glicerol como principal substrato para a produção de *n*-butanol. Foram realizadas fermentações com o *C. acetobutylicum* NRRL B-519 utilizando-se o meio de cultivo RCM como suplemento de nutrientes. A combinação da cepa NRRL B-519 e o meio RCM foi o que produziu maiores quantidades de *n*-butanol (4,6 g/L) no ensaio anterior, usando-se glicose como fonte de carbono, por isso eles foram escolhidos para este ensaio.

De acordo com Andrade e Vasconcelos (2003), as cepas de *C. acetobutylicum* só consomem glicerol quando em mistura com glicose. Assim, foi usado apenas o glicerol P.A. ou uma mistura de glicerol e glicose, como principal fonte de carbono e energia, para se averiguar esta afirmativa. Nas

Tabelas 22 e 23 estão apresentados os resultados de biomassa celular e metabólitos obtidos nos ensaios de utilização do glicerol como substrato, ou mistura de glicerol e glicose no meio de cultivo, para produção de *n*-butanol, bem como a quantidade de substrato consumido.

Os experimentos 1, 2 e 3 foram realizados apenas com glicerol como substrato; já os experimentos 4, 5 e 6 foram realizados com uma mistura de glicose e glicerol como principais substratos, de acordo com as concentrações indicadas na Tabela 5, item 2.8.

**Tabela 22.** Produção de metabólitos e biomassa celular obtida com a cepa *C. acetobutylicum* NRRL B-519 com variação do substrato (glicerol e glicose).

Exp.	Ácido Butírico (g/L)	Ácido Succínico (g/L)	<i>n</i> -butanol (g/L)	Biomassa celular (g/L)
1	4,31±0,58	0,28±0,01	0,0±0,0	0,45±0,01
2	4,06±0,42	0,22±0,02	0,0±0,0	0,47±0,01
3	4,05±0,35	0,44±0,04	0,0±0,0	0,43±0,02
4	3,21±0,21	0,0±0,0	0,31±0,02	0,78±0,01
5	3,13±0,41	0,0±0,0	2,0±0,17	1,23±0,13
6	2,94±0,11	0,0±0,0	0,78±0,1	0,89±0,02

**Tabela 23.** Consumo do substrato no processo de produção de *n*-butanol com a cepa *C. acetobutylicum* NRRL B-519 e variação do substrato (glicerol e glicose).

Exp.	Glicerol consumido (g/L)	Glicose consumida (g/L)
1	0,52±0,01	-
2	1,32±0,01	-
3	1,52±0,02	-
4	0,0±0,0	4,21±1,38
5	0,0±0,0	9,99±2,31
6	0,0±0,0	4,35±0,98

Para os experimentos utilizando-se apenas glicerol como substrato, não se observa produção de *n*-butanol. A partir dos resultados dos experimentos 4, 5 e 6, observa-se produção do ácido butírico e do *n*-butanol. Pode-se observar que o ácido butírico foi produzido em todos os ensaios, independentemente do substrato e da concentração utilizada. Utilizando-se apenas glicerol, houve produção de ácido succínico.

Observa-se que a produção de biomassa celular foi maior para o experimento 5, no qual foi utilizada maior concentração de glicose inicial (40 g/L), indicando uma preferência por este substrato pela *C. acetobutylicum* NRRL B-519. Já a produção de *n*-butanol foi de 2,0 g/L, metade do resultado encontrado quando se usou 80 g/L glicose inicial (Exp. C, Tabela 21, item 3.5).

O consumo dos substratos foi muito abaixo da quantidade inicial adicionada no meio de cultivo, tanto para glicerol como para a glicose. Nos experimentos com a mistura de glicerol e glicose, não se observa o consumo do glicerol. Os processos estudados aqui apresentaram baixas conversões. Tais resultados de baixo rendimento de *n*-butanol levaram à aquisição de uma nova cepa para a realização de novos ensaios.

### **3.7. Avaliação da produção de *n*-butanol utilizando-se *C. pasteurianum* ATCC 6013 e glicerol como substrato**

Após vários ensaios com as cepas de *C. acetobutylicum* e *C. saccharoperbutyloceticum*, usando-se glicose e glicerol como substratos, meios de cultura sintéticos e complexos como suplemento nutricional, não foram obtidos rendimentos elevados em *n*-butanol comparáveis aos encontrados por outros autores (14 g/L) (Jiang et al., 2014). Diante disso, uma nova linhagem foi estudada a fim de se produzir *n*-butanol a partir de glicerol como fonte de energia e carbono em meio de cultura contendo outros nutrientes.

Neste primeiro ensaio, a cepa de *C. pasteurianum* ATCC 6013 foi crescida em meio MP2, segundo descrito na metodologia do item 2.9. Foram realizados três experimentos: no primeiro, adicionaram-se as vitaminas tiamina e biotina e o ácido *p*-aminobenzóico; no segundo, não houve adição de vitaminas a fim de se reduzir o custo do processo; e no terceiro ensaio foi testado o meio MP2 otimizado para a produção de *n*-butanol, segundo (Moon et al., 2011).

De acordo com Monot et al. (1982), o *C. acetobutylicum* necessitam de, no mínimo, 40 g/L de glicose inicial para existirem as fases de acidogênese e solventogênese e produzir *n*-butanol. Este fenômeno está em acordo com o efeito Crabtree positivo (Crabtree, 1928), no qual altas concentrações do substrato ativam uma rota metabólica. No entanto, o metabolismo desta linhagem ainda não foi totalmente elucidado. O glicerol apresenta um poder redutor 2 vezes maior do que a glicose (Girbal et al., 1995). Dessa forma, fazendo uma analogia, poderia se pensar que com o uso da cepa *C. pasteurianum* ATCC 6013 e uma concentração de 20 g/L de glicerol inicial seria suficiente para a produção de *n*-butanol. Na Tabela 24 estão os resultados dos metabólitos e da produção de biomassa celular para o ensaio com o emprego da cepa ATCC 6013 crescida em meio MP2, bem como o glicerol consumido.

**Tabela 24.** Metabólitos e biomassa celular produzida e glicerol consumido durante o ensaio usando a cepa ATCC 6013 crescida em meio MP2.

Exp.	1-butanol (g/L)	2-butanol (g/L)	Etanol (g/L)	Biomassa celular (g/L)	Glicerol consumido (g/L)
1	0,03±0,02	0,14±0,0	1,75±0,55	0,84±0,61	5,42±1,63
2	0,05±0,0	0,22±0,0	2,38±0,08	2,21±0,07	13,82±0,86
3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,56±0,02	0,46±0,05	0,8±0,0

A partir desta etapa do processo, também foi quantificado por CLAE o composto 2-butanol para complementar os resultados, e o composto *n*-butanol foi denominado 1-butanol. No entanto, observa-se uma baixa produção de 1 e 2-butanol. A cepa produziu etanol, mas não foi detectada produção de ácidos orgânicos. O pH inicial do processo foi de 6,5, enquanto o final foi de 5,0. O crescimento celular foi maior para o experimento sem a presença de vitaminas. Provavelmente, a ausência de vitaminas, que podem ser utilizadas como cofator enzimático para alguma rota para formação de algum metabólito, limitou esta rota metabólica e as células desviaram seu metabolismo para sua multiplicação.

O glicerol foi mais consumido durante o processo de multiplicação celular, mais acentuado no experimento 2. No experimento com o meio otimizado (Exp. 3) para produção de *n*-butanol, segundo Moon et al.

(2011), não foram obtidos bons resultados para este metabólito, sendo este resultado discrepante com o do próprio autor, que afirma ter produzido 15 g/L de *n*-butanol seguindo as mesmas condições de processo usadas neste trabalho. Diante destes resultados, pode-se concluir que é preciso explorar diferentes meios de cultivo a fim de se encontrar o mais adequado para produção de *n*-butanol.

### 3.8. Avaliação da produção de *n*-butanol utilizando-se diferentes meios de cultura, *C. pasteurianum* ATCC 6013 e glicerol como substrato

Em virtude dos resultados apresentados no item anterior, foi feito um ensaio variando-se os meios de cultura, bem como a quantidade de glicerol adicionada como fonte de carbono (40 g/L), com o objetivo de se obter melhores rendimentos em *n*-butanol. Os meios de cultura utilizados foram preparados segundo Kao et al. (2013) (Exp. 1); (Gallardo, Alves e Rodrigues (2014) (Exp. 2); Szymanowska-Powałowska, Orczyk e Leja (2014) (Exp. 3); Gallazzi et al. (2015) (Exp. 4); e Colin, Bories e Moulin (2000) (Exp. 5), conforme as Tabelas de 8 a 15 item 2.10. Um sexto meio utilizado foi o RCM (Tabela 1, item 2.2) (Exp. 6). Na Tabela 25 estão apresentados os resultados da produção de metabólitos para os experimentos realizados com diferentes meios cultivo.

**Tabela 25.** Metabólitos e biomassa celular produzida e glicerol consumido durante o ensaio usando a cepa ATCC 6013 crescida em diferentes meios de cultivo.

Exp.	Ác. Succínico (g/L)	Ác. Láctico (g/L)	Ác. Acético (g/L)	1-butanol (g/L)	2-butanol (g/L)	Glicerol consumido (g/L)
1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,11±0,03	0,3±0,01	0,5±0,01
2	0,08±0,03	0,0±0,0	0,0±0,0	0,09±0,02	0,07±0,03	4,5±0,22
3	0,11±0,02	0,12±0,02	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,01
4	0,0±0,0	0,06±0,0	0,18±0,04	0,61±0,02	0,45±0,06	15,0±1,25
5	0,12±0,02	0,0±0,0	0,0±0,0	0,07±0,05	0,0±0,0	0,4±0,01
6	0,0±0,0	0,0±0,0	-*	0,73±0,02	0,48±0,02	13,0±1,58

\*Não quantificado.

Pode-se observar baixas produções de metabólitos, inclusive o 1-butanol, para todos os meios utilizados. A produção de biomassa foi em torno de  $0,3 \pm 0,02$  g/L para todos os ensaios. A produção de 1-butanol foi maior nos experimentos 4 e 6, que fazem uso de meios complexos contendo extrato de carne, extrato de levedura, triptona e/ou peptona, e nestes mesmos experimentos também foi visto o maior consumo de substrato. No meio RCM, Exp. 6, também se produziu etanol, 2,43 g/L.

Com os resultados de baixos rendimentos em metabólitos e biomassa celular e um consumo significativo de substrato para os experimentos 4 e 6, decidiu-se fazer a detecção de mais metabólitos que poderiam estar sendo produzidos, baseando-se em processos anaeróbios similares a este. Portanto, foi pesquisada a produção de ácidos propiônico, valérico, isovalérico e hexanóico. Os resultados destes metabólitos estão apresentados na Tabela 26.

**Tabela 26.** Produção de ácidos graxos voláteis de cadeia média durante o ensaio usando a cepa ATCC 6013 crescida em diferentes meios de cultivo.

Exp.	Ác. Propiônico (g/L)	Ác. Valérico (g/L)	Ác. Isovalérico (g/L)	Ác. Hexanóico (g/L)
1	0,18±0,0	0,09±0,0	0,18±0,0	ND
2	0,08±0,03	0,06±0,0	0,18±0,0	ND
3	0,03±0,02	0,05±0,02	0,03±0,0	ND
4	1,16±0,0	0,14±0,0	0,35±0,04	ND
5	0,11±0,02	0,06±0,0	0,16±0,0	ND
6	0,86±0,0	0,29±0,0	0,0±0,0	ND

ND - não detectado.

Apesar dos baixos rendimentos em ácidos graxos voláteis, observa-se que as maiores produções foram nos meios de formulação complexa, Exp. 4 e 6 (meios ricos em nutrientes). Isto reforça a hipótese de que existe uma carência nutricional no sistema aqui estudado, talvez não só quantidade, mas qualidade ou mesmo falha na dosagem correta de alguns nutrientes. O efeito inibitório da concentração de glicerol inicial foi descartado, visto que para concentrações iniciais de glicerol de 40 g/L houve consumo de até 15 g/L deste composto nos Exp. 4 e 6, quando se compara esta etapa com a etapa

anterior (item 3.7), em que se estudou a concentração inicial de 20 g/L de glicerol. Supõe-se que outros metabólitos possam ter sido produzidos, porém não são detectados por meio do método analítico utilizado. Nos processos anaeróbios também existe a produção de gases, o que poderia ajudar a fechar o balanço de massa dos Exp. 4 e 6, uma vez que a produção de metabólitos e de biomassa celular foi baixa. Entretanto, nestes ensaios não foi medida a quantidade de gases produzidos.

### **3.9. Adaptação microbiana por repiques sucessivos para produção de *n*-butanol utilizando-se *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 e glicerol como substrato**

Um último ensaio visando à produção de *n*-butanol foi realizado fazendo-se repiques da cepa ATCC 6013 em meios contendo glicerol, de forma a tentar adaptar a este substrato tanto os esporos como as novas células microbianas germinadas. Estes experimentos foram feitos baseando-se nos estudos e conceitos de engenharia evolutiva, em que podem ser feitos repiques sucessivos de microrganismos (célula ou esporos) em um meio, repetindo-se uma determinada condição de cultivo, de forma a aumentar a adaptação deste às condições desejadas, seja ela de inibição a partir de um metabólito ou mesmo a presença de um substrato novo (Almario; Reyes; Kao, 2013; Lee; Kim, 2015).

Uma primeira incubação foi feita em meio RCM durante 15 d. O RCM foi escolhido porque foi neste meio que esta cepa produziu maior quantidade de 1-butanol em ensaios anteriores (Exp. 6, Tabela 26, item 3.8). O tempo de 15 d foi escolhido levando-se em conta a possível formação dos esporos após este tempo de processo. Isto porque a cepa de *Clostridium* na forma esporulada é menos sensível à presença de oxigênio, que estará presente durante o repique. Além disto, de acordo com Almario, Reyes e Kao (2013), e Lee e Kim (2015), que estudaram engenharia evolutiva, os esporos, ao se formarem e germinarem em situações como esta (glicerol como substrato), poderiam formar bactérias mais adaptadas às condições desejadas. Após a incubação por 15 d, um repique foi realizado e uma fermentação foi feita durante 21 d, sendo coletadas amostras a cada 7 d. Nas Tabelas 27 e 28 estão apresentados os resultados de metabólitos e de biomassa celular produzidos para o ensaio com repiques sucessivos, bem como o consumo de substrato.

No experimento inicial com meio RCM e 15 d de processo (Exp. A), foram utilizados 20 g/L de glicerol inicial. Em posse destes resultados, pode-se fazer uma comparação com o mesmo experimento realizado, porém partindo-se de 40 g/L de glicerol inicial (Exp. 6, Tabelas 25 e 26, item 3.8). O consumo de substrato foi bem maior para o experimento partindo de 40 g/L de glicerol. Entretanto, a produção de biomassa celular foi a mesma para os dois processos. A produção de 1-butanol foi maior no experimento em que se usou 40 g/L de glicerol inicial, reforçando a hipótese do efeito Crabtree positivo (Crabtree, 1928) neste processo, similar ao processo com a cepa *C. acetobutylicum*, que necessitam de, no mínimo, 40 g/L de glicose inicial para existirem as fases de acidogênese e solventogênese e produzir *n*-butanol, de acordo com Monot et al. (1982). No entanto, verifica-se que diferentes metabólitos em diferentes concentrações foram produzidos nos dois processos.

**Tabela 27.** Metabólitos produzidos durante o ensaio usando a cepa ATCC 6013 crescida em meio RCM para o ensaio com repiques sucessivos.

Exp.	Ácido Succínico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Etanol (g/L)	1-butanol (g/L)	2-butanol (g/L)
A	0,08±0,02	0,08±0,05	3,84±0,01	ND	0,25±0,07
B1	0,12±0,03	0,06±0,02	5,62±0,01	0,5±0,0	0,31±0,01
B2	0,12±0,02	0,08±0,02	6,7±1,54	0,46±0,08	0,42±0,05
B3	0,1±0,0	0,14±0,03	4,42±0,04	0,47±0,04	0,34±0,06

Exp. A: primeira incubação por 15 d; B1: repique para outro meio e incubação por 7 d; B2: incubação por 14 d; B3: incubação por 21 d. ND – não detectado.

Fazendo-se um somatório das concentrações dos metabólitos totais produzidos, tem-se 5,16 e 5,43 g/L para os experimentos partindo de 40 e 20 g/L de glicerol inicial, respectivamente. Se os resultados de metabólitos e produção de biomassa celular foram iguais para os dois processos e no processo partindo de 20 g/L de glicerol inicial só foi consumido 1,81 g/L deste, pode-se concluir que outros compostos de cadeia carbônica, como as proteínas presentes no extrato de carne, extrato de levedura e peptona, serviram como fonte de carbono para formação destes metabólitos.

**Tabela 28.** Produção de ácidos graxos voláteis de cadeia média, biomassa celular produzida e glicose consumida durante o ensaio usando a cepa ATCC 6013 crescida em meio RCM para o ensaio com repiques sucessivos.

Exp.	Ácido Propiônico (g/L)	Ácido Valérico (g/L)	Ácido Isovalérico (g/L)	Glicerol consumido (g/L)	Biomassa celular (g/L)
A	0,15±0,05	0,34±0,08	0,62±0,04	1,81±0,12	0,35±0,03
B0	0,87±0,03	0,7±0,0	0,28±0,0	8,21±0,0	1,13±0,42
B1	0,93±0,02	0,55±0,02	0,3±0,0	11,2±1,5	0,83±0,08
B2	1,08±0,04	0,27±0,07	0,51±0,01	11,2±0,95	0,8±0,04

Exp. A: primeira incubação por 15 d; B1: repique para outro meio e incubação por 7 d; B2: incubação por 14 d; B3: incubação por 21 d.

Para o experimento de repique em um novo meio RCM (Exp. B2 e B3), observa-se uma maior adaptação da cepa ao meio, pois se obtém maior consumo de substrato, maior produção de metabólitos como etanol e *n*-butanol, bem como biomassa celular. Pelo resultado deste ensaio, conclui-se que projetar novos ensaios aplicando técnicas de engenharia evolutiva poderia favorecer um aumento nos rendimentos do processo.

## 4. Conclusão

Face ao apresentado durante o processo anaeróbico aqui estudado, o que pode ser observado é a ativação e inativação de diferentes rotas metabólicas para produção de ácidos orgânicos e álcoois de acordo com as condições de cultivo, como meio de cultura, fonte de energia e carbono (glicose e glicerol), pH inicial e cepa utilizada. Todavia, os rendimentos para os metabólitos foram baixos, inclusive para o *n*-butanol, devido a algum fator limitante (como a carência de algum macro ou microelemento) ou algum fator inibidor (como algum metabólito produzido). Portanto, até o presente momento a condição próxima do ótimo de produção de *n*-butanol ainda não foi encontrada. Não obstante, estes resultados são importantes para dar continuidade ao principal objetivo deste trabalho e servir como base para pesquisas similares com processos anaeróbios com a utilização de linhagens de *Clostridium* sp e o uso do glicerol como substrato.

## 5. Agradecimentos

---

Os autores agradecem o apoio financeiro da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), Edital 0017/11, e ao CNPq pelas bolsas DTI, ambos recursos vinculados ao projeto intitulado “Estratégias Genômicas e Agregação de Valor para a Cadeia Produtiva do Dendê”.

## 6. Referências

---

ADHAMI, L.; GRIGGS, B.; HIMEBROOK, P.; TACONI, K. Liquid-liquid extraction of Butanol from dilute aqueous solutions using soybean-derived biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 11, p. 1123-1128, 2009.

ALMARIO, M. P.; REYES, L. H.; KAO, K. C. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 10, p. 2616-2623, 2013.

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

BIEBL, H. Comparative investigations of growth and solvent formation in “*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*” DSM 2152 and *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 115-120, 1999.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*-batch and continuous culture studies. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18-26, 2001.

CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, L. K. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 41-48, 2001.

COLIN, T.; BORIES, A.; MOULIN, G. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 201-205, 2000.

CRABTREE, H. G. The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. **Biochemical Journal**, v. 22, n. 5, p. 1289-1298, 1928.

DAMS, R. I.; GUILHERME, A. A.; VALE, M. S.; NUNES, V. F.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T. Fermentation of residual glycerol by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 in pure and mixed

cultures. **Environmental Technology**, v. 37, n. 23, p. 2984-2992, 2016.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Butanol fermentation research: Upstream and downstream manipulations. **Chemical Record**, v. 4, n. 5, p. 305-314, 2004.

EZEJI, T.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 1460-1469, 2007.

GALLARDO, R.; ALVES, M.; RODRIGUES, L. R. Modulation of crude glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 towards the production of butanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 71, p. 134-143, 2014.

GALLAZZI, A.; BRANSKA, B.; MARINELLI, F.; PATAKOVA, P. Continuous production of n-butanol by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 using suspended and surface-immobilized cells. **Journal of Biotechnology**, v. 216, p. 29-35, 2015.

GIRBAL, L.; CROUX, C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, n. 3, p. 287-297, 1995.

GUILHERME, A. A.; SILVEIRA, M. S.; FONTES, C. P. M. L.; FERNANDES, F. A. N. Modeling and optimization of lactic acid production using cashew apple juice as substrate. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 8, p. 3151-3158, 2012.

GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; OZDEMIR, G.; AZBAR, N. 1,3-Propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 782-788, 2010.

HIRSCH, A.; GRINSTED, E. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese, with observations on the effect of nisin. **Journal of Dairy Research**, v. 21, n. 1, p. 101-110, 1954.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260-265, 2005.

JIANG, M.; CHEN, J.; HE, A.; WU, H.; KONG, X.; LIU, J.; YIN, C.; CHEN, W.; CHEN, P. Enhanced acetone/butanol/ethanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH control strategy. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1238-1244, 2014.

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

- 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*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 491-501, 2010.
- KAO, W. C.; LIN, D. S.; CHENG, C. L.; CHEN, B. Y.; LIN, C. Y.; Enhancing butanol production with *Clostridium pasteurianum* CH4 using sequential glucose-glycerol addition and simultaneous dual-substrate cultivation strategies. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 324-330, 2013.
- KEIS, S.; SHAHEEN, R.; JONES, D. T. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2095-2103, 2001.
- KHANNA, S.; GOYAL, A.; MOHOLKAR, V. S. Production of n-butanol from biodiesel derived crude glycerol using *Clostridium pasteurianum* immobilized on Amberlite. **Fuel**, v. 112, p. 557-561, 2013.
- LEE, S. Y.; KIM, H. U. Systems strategies for developing industrial microbial strains. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 1061-1072, 2015.
- LI, J.; BARAL, N. R.; JHA, A. K. Acetone-butanol-ethanol fermentation of corn stover by *Clostridium* species: Present status and future perspectives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 1145-1157, 2014.
- LIN, Y. S.; WANG, J.; WANG, X. M.; SUN, X. H. Optimization of butanol production from corn straw hydrolysate by *Clostridium acetobutylicum* using response surface method. **Chinese Science Bulletin**, v. 56, n. 14, p. 1422-1428, 2011.
- MONOT, F.; MARTIN, J. R.; PETITDEMANGE, H.; GAY, R. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 1318-1324, 1982.
- MONOT, F.; ENGASSER, J. M.; PETITDEMANGE, H. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 422-426, 1984.
- MOON, C.; LEE, C. H.; SANG, B. I.; UM, Y. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10561-10568, 2011.
- PIGHINELLI, A. L.; QUIRINO, B. F.; SOUTO, B. M.; POTETTO, C. M.; FARINAS, C. S.; MACHADO, C. M. M.; BARRETO, C. C.; RODRIGUES, D. S.; PINTO, G. A. S.; BERGMANN, J. C.; ALMEIDA, J. R. M.; DIAS, J. M. C. S.; SOUSA, K. A.; FÁVARO, L. C. L.; DAMASO, M.

C. T.; PARACHIN, N. S.; COSTA, O. Y. A.; FRANCO, P. F.; GONÇALVES, S. B.; MENDES, T. D.; SALUM, T. F. C.; PACHECO, T. F. **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília-DF: Embrapa, 2013.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. 2. ed. Wallingford: CABI Publishing, 1994.

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D.; ORCZYK, D.; LEJA, K. Biotechnological potential of *Clostridium butyricum* bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 892-901, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VASCONCELOS, E. A. F.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T. Factors that affect bacterial ecology in hydrogen-producing anaerobic reactors. **Bioenergy Research**, v. 9, n. 4, p. 1260-1271, 2016.



---

*Agroindústria Tropical*



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO