UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

Escola de Química

BIOAPROVEITAMENTO DE GLICERINA BRUTA PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR *Clostridium butyricum*

Fernanda Faria Martins

Dezembro/2019

BIOAPROVEITAMENTO DE GLICERINA BRUTA PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR *Clostridium butyricum*

Fernanda Faria Martins

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS, ESCOLA DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

Tatiana Felix Ferreira, D. Sc.

Rio de Janeiro

2019

CIP - Catalogação na Publicação

M379b

Martins, Fernanda Faria
BIOAPROVEITAMENTO DE GLICERINA BRUTA PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR Clostridium butyricum / Fernanda Faria Martins. -- Rio de Janeiro, 2019.
150 f.

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

1. 1,3-propanodiol. 2. glicerina bruta. 3. Clostridium butyricum. I. Coelho, Maria Alice Zarur, orient. II. Ferreira, Tatiana Felix, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Fernanda Faria Martins

BIOAPROVEITAMENTO DE GLICERINA BRUTA PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR *Clostridium butyricum*

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS, ESCOLA DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Aprovada por:

Orientadores:

_____

Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc., EQ/UFRJ

_____

Tatiana Felix Ferreira, D. Sc., EQ/UFRJ

Banca Examinadora

_____

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D. Sc., EQ/UFRJ

_____

Rodrigo Volcan Almeida, D. Sc., IQ/UFRJ

_____

Tito Livio Moutinho Alves, D. Sc., COPPE/UFRJ

_____

Claudia Maria Soares Ribeiro, D. Sc., PETROBRAS

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial,

meu menino Bento.

AGRADECIMENTOS

À pessoa que eu mais admiro e me espelho, minha amada mãe Maria dos Prazeres. A sua força, amor, carinho, dedicação e comprometimento com a família fez desabrochar três mulheres empoderadas. Obrigada por transmitir esse amor puro e incondicional, pela confiança que deposita em mim e, principalmente, por ter me oferecido o essencial: educação.

Às minhas amadas irmãs, Fabiana e Flávia, que estão sempre ao meu lado, apoiando, incentivando e confortando. Obrigada pela paciência, união, amizade e carinho e por cuidarem tão bem da caçulinha da família.

Ao meu querido pai, Fernando Manuel, aquele que não mede esforços para nos ajudar. Obrigada por estar sempre disposto e pronto para cumprir uma missão que lhe é dada.

Ao meu amor, Flávio, que não mede esforços para me ver feliz e satisfeita. Obrigada por há 17 anos preencher os meus dias com amor, paciência e compreensão. Obrigada por ser aquela pessoa que acredita no meu potencial e pelos incentivos todas as vezes que eu penso em desistir.

À minha afilhada, Rafaela, a flor mais linda do meu jardim. Como é bom conviver com você, juntamente, com a sua inocência. Obrigada por ser essa menina tão pura, cuidadosa com a família e amigos e amorosa. Receber o seu sorriso e alegria faz o meu coração transbordar de amor!

Ao meu amor incondicional, meu Bento. Você chegou para transformar e alegrar a minha vida. Antes mesmo de nascer, já sinto a luz que vens transmitindo. Obrigada por me permitir tê-lo como meu menino!

À Deus e minha Mãezinha Maria, obrigada por guiarem meus passos nessa árdua caminhada da vida. Obrigada por proteger minha família e amigos.

Às professoras e orientadoras, Maria Alice Coelho e Tatiana Felix, sempre dispostas a ajudar, apoiar, incentivar e contribuir. Obrigada pela dedicação e ensinamentos ao longo desses 12 anos de convívio e por entenderem, principalmente nessa reta final, que precisei me dividir entre docente e discente. Saibam que vocês são parte de extrema importância da minha carreira profissional e serei eternamente grata.

À Tatiana Felix, que além da sua presença na minha vida acadêmica está também fora dela, minha amiga e uma das maiores incentivadoras. Tati, obrigada por confiar em mim para a continuidade desse projeto, pela sua atenção e carinho, e por estar sempre aberta a uma boa conversa e ao meu lado me apoiando em todas as minhas escolhas. Sua dedicação e profissionalismo são um grande exemplo para mim.

Aos amigos do grupo BIOSE: Ariane, Felipe, Vanessa, Júlio, Marselle, Ana Beatriz, Mariana, Larissa, Caê, Bernardo, Eliana, Gabriela, Roseli, Verônica, Nanci, Lenita, Priscilla. Obrigada pelo convívio diário, trocas de experiências, aprendizagem e o carinho de cada um de vocês. Vocês sabem que esse laboratório e o grupo são o meu "xodozinho", ainda estarei presente em muitos almoços e cafés da tarde.

Aos meus amigos pelos elogios, puxões de orelha, longas conversas, churrasquinhos e momentos de descontração.

Aos brilhantes professores que tive o prazer de conviver pela contribuição na minha formação.

À Petrobras pelo financiamento do projeto.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Martins, Fernanda Faria. **Bioaproveitamento de glicerina buta para produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum***. Rio de Janeiro, 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O 1,3-propanodiol (1,3-PDO) é uma molécula orgânica que possui várias potenciais aplicações na produção de polímeros, cosméticos, alimentos, lubrificantes e medicamentos. A aplicação de 1,3-PDO na indústria de polímeros aumentou significativamente nos últimos anos, isso é devido às suas propriedades físico-químicas atraentes. A estimativa é que esse mercado atinja US$ 490 milhões em 2019, com a projeção de uma taxa de crescimento anual de 12,2% entre 2019 e 2024, alcançando 870 milhões de dólares em 2024. Atualmente, vários substratos são estudados para a produção biotecnológica de 1,3-PDO, incluindo a glicerina bruta, um subproduto de baixo valor agregado oriundo da indústria de biodiesel. O presente estudo relata o uso de *C. butyricum* NCIMB 8082 para a produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta usando um meio de cultivo minimizado e propõe diferente estratégias em biorreator a fim de melhorar a produtividade do bioprocesso. Inicialmente, planejamentos experimentais do tipo PB foram utilizados com o objetivo de minimizar o meio de cultivo e, consequentemente, reduzir o custo do bioprocesso sem afetar a produtividade de 1,3-PDO. Em seguida, diferentes estratégias operacionais foram testadas em reator de 1 L e 5 L a fim de verificar a produção de 1,3-PDO. Ainda, realizou-se experimento em biorreator substituindo extrato de levedo por milhocina com o intuito de verificar o impacto desta substituição no crescimento celular e na produtividade da fermentação. Os resultados do PB permitiram reduzir de 16 para 7 o número de componentes no meio de cultivo, o que representa uma redução de 62% do custo do mesmo. Em biorreator, o estudo alcançou produtividade de 3,85 $g.L^{-1}h^{-1}$ quando se operou em regime de batelada simples, controle automático de pH 7 e meio de cultivo minimizado contendo glicerina bruta e extrato de levedo. Os resultados do presente trabalho são similares aos alcançados pela Dupont (3,50 $g.L^{-1}h^{-1}$), empresa que tem o monopólio do mercado de produção de 1,3-PDO por rota biotecnológica em escala industrial. Finalmente, foram estudados dois cenários econômicos, realista e otimista, a fim de investigar o potencial da produção industrial de

1,3-PDO no Brasil. O estudo econômico preliminar apontou que o bioprocesso em questão é economicamente viável no cenário otimista. O presente estudo pode orientar o desenvolvimento de um processo de produção de 1,3-PDO economicamente competitivo e viável.

Palavras-chave: 1,3-propanodiol, glicerina bruta, *Clostridium butyricum*

ABSTRACT

MARTINS, Fernanda Faria. **Bioconversion of crude glycerol for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum***. Rio de Janeiro, 2019. Thesis (Doctor of Science) – Chemistry School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

1,3-Propanediol (1,3-PDO) is an organic molecule that has several attractive properties, with potential uses in the production of polymers, cosmetics, foods, lubricants and medicines. The application of 1,3-PDO in the polymer industry has increased significantly in the last few years, due to its attractive physical and chemical properties. The market demand for 1,3- PDO is projected to reach US$ 870 million by 2024 from US$ 490 million in 2019, at a CAGR of 12.2%. Several substrates have been investigated for 1,3-PDO production, including crude glycerol, a low-value byproduct from the biodiesel industry. Thus, the present study reports the use of *Clostridium butyricum* NCIMB 8082 for 1,3-PDO production from crude glycerol using a simple culture medium and different strategies for improving 1,3-PDO productivity in bioreactor. In order to reduce the cost of this bioprocess without affecting 1,3-PDO productivity, PB designs were performed for culture medium minimization. Then, fermentations were carried out in a 1 L and 5 L bioreactors and 1,3-PDO production was analyzed. Additionally, an experiment conducted in bioreactor verified the impact of the yeast extract replacement by corn steep liquor on cell growth and fermentation productivity. A simpler culture medium for 1,3-PDO production from crude glycerol using the wild strain *C. butyricum* was obtained by eliminating nine components from the complex culture medium through statistical screening. PB designs resulted in the reduction of culture medium components from 16 to 7, which represents a 62% reduction of the culture medium cost. A maximum productivity of 3,85 $g.L^{-1}h^{-1}$ was obtained in bioreactor operating in batch system, automatic pH control, simple culture medium containing crude glycerol and yeast extract. These results are similar to reported by DuPont (3,50 $g.L^{-1}h^{-1}$), which has a commercial biotechnology of 1,3-PDO production operating in the industrial scale. Finally, in order to investigate the potential of 1,3-PDO production in Brazil, two economic scenarios were studied, a pessimistic and an optimistic one. Preliminary economic study pointed the economic viability of producing 1,3-PDO in the optimistic scenario. The present study supports the development of a competitive and viable 1,3-PDO production process.

Keywords: 1,3-propanediol, crude glycerol, *Clostridium butyricum*

SUMÁRIO

1 Introdução 26

2 Justificativa e Objetivos 29

2.1 Objetivos 29

2.2 Objetivos específicos 30

3. Revisão Bibliográfica 32

3.1 Matriz Energética, Biodiesel e Glicerina bruta 32

3.2 Aplicações da glicerina bruta 35

3.3 1,3-propanodiol (1,3-PDO) 38

3.3.1 Características gerais e aplicações 38

3.3.2 Rotas de produção industrial 40

3.4 Microrganismos produtores de 1,3-PDO 42

3.4.1 Características morfológicas e fisiológicas do gênero *Clostridium* 44

3.5 Produção de 1,3-PDO via rota biotecnológica 47

3.6 Influência das condições de cultivo diante a biossíntese de 1,3-PDO 53

3.6.1 Inibição metabólica pela concentração de substrato 53

3.6.2 Inibição metabólica pela concentração de produtos 54

3.6.3 Influência do pH 56

3.6.5 Estratégias operacionais de condução de processo 58

3.7 Aspectos mercadológicos 61

4. Metodologias Experimentais 67

4.1 Materiais 67

4.2. Equipamentos 68

4.3. Microrganismo 69

4.3.1. Ativação e preservação da cepa 69

4.3.2. Pré-inóculo 69

4.3.3 Condições de anaerobiose 70

4.4 Esterilização dos meios de cultivo e manobras assépticas 70

4.5 Planejamento Experimental 71

4.5.1 *Placket-Burman*: 16 variáveis 71

4.5.2 *Placket-Burman*: 11 variáveis 74

4.6 Avaliação da influência do cofator Manganês (Mn^{2+}) sobre a atividade da enzima PDOR 77

4.7 Estudo da produção de 1,3-PDO em biorreator de volume útil de 1 L 78

4.7.1 Estratégia 1: Etapa de crescimento celular em frascos agitados e produção de 1,3-PDO em biorreator por batelada simples 78

4.7.2 Estratégia 2: Etapa de crescimento celular em frascos agitados e produção de 1,3-PDO em biorreator por batelada alimentada 79

4.7.3 Estratégia 3: Etapa de crescimento celular no biorreator sem ajuste de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada alimentada e controle manual de pH (pH 7,0) 79

4.7.4 Estratégia 4: Etapa de crescimento celular em biorreator com ajuste automático de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada simples (125 $g.L^{-1}$ glicerina bruta) e controle automático de pH (pH 7,0) 80

4.7.5 Estratégia 5: Etapa de crescimento celular em biorreator com ajuste automático de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada simples (150 $g.L^{-1}$ glicerina bruta) e controle automático de pH (pH 7,0) 81

4.7.6 Estratégia 6: Crescimento celular e produção de 1,3-PDO em biorreator por batelada alimentada e ajuste automático de pH na etapa de crescimento celular e produção (pH 6,8) 81

4.8 Estudo da produção de 1,3-PDO em biorreator de volume útil de 5 L 82

4.8.1 Estratégia 7: Etapa de crescimento celular em biorreator com ajuste automático de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada alimentada e controle automático de pH (pH 7,0) 82

4.8.2 Estratégia 8: Etapa de crescimento celular em biorreator com ajuste automático de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada alimentada e controle automático de pH (pH 7,0), com adição contínua de N_2..... 83

4.8.3 Estratégia 9: Etapa de crescimento celular em biorreator com ajuste automático de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada simples e controle automático de pH (pH 7,0), com substituição do extrato de levedo por milhocina 83

4.9 Métodos Analíticos 85

4.9.1 Quantificação do crescimento celular 85

4.9.2 Quantificação de glicerol e produtos 86

4.9.3 Medida de pH 86

4.9.4 Análise de dados estatísticos 86

4.9.5 Avaliação Econômica 86

5. Resultados e Discussão 88

5.1 Planejamento Experimental 88

5.1.1 *Plackett-Burman* com 16 variáveis independentes 88

5.1.2 *Placket Burman* com 11 variáveis independentes 97

5.2 Avaliação da influência do cofator Manganês (Mn^{2+}) sobre a produção de 1,3-PDO 107

5.3 Produção de 1,3-PDO em biorreator de volume útil de 1 L 108

5.3.1 Estratégias 1 e 2 108

5.3.2 Estratégias 3 112

5.3.3 Estratégias 4 e 5 113

5.3.4 Estratégia 6 115

5.4 Produção de 1,3-PDO em biorreator de volume de 5 L 118

5.4.1 Estratégias 7 e 8 118

5.4.2 Estratégia 9 122

5.5 Comparação das estratégias em biorreator 125

5.6 Avaliação econômica preliminar de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* utilizando glicerina bruta e extrato de levedo como principais nutrientes 131

5.6.1 Simulação de estimativa econômica para o cenário realista..... 134

5.6.2 Simulação de estimativa econômica para o segundo cenário (otimista) 137

6. Conclusões finais 143

7. Sugestões para trabalhos futuros 146

8. Referências 148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Dados da Matriz Energética Brasileira. Fonte: Boletim Mensal de Energia do Núcleo de Estudos Estratégicos de Energia da Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento Energético (MME, 2019) 33

Figura 3.2 Evolução da produção brasileira de biodiesel no período de 2013 - 2018 (Fonte: ANP, 2018) 34

Figura 3.3 Exportação de glicerina bruta no Brasil no período de 2013-2018. (Fonte: ComexStat, 2019) 37

Figura 3.4 Síntese química do 1,3-PDO a partir da acroleína (tecnologia da Degussa/Dupont) (A) e do óxido de etileno (tecnologia da Shell (B) (Fonte: KRAUS, 2008) 40

Figura 3.5 Diferentes tipos de endósporos quanto à posição (Fonte: adaptado de MADIGAN et al., 2012). 45

Figura 3.6 Foto ilustrativa da bactéria *C. butyricum* NCIMB 8082 utilizando microscopia ótica corada pela técnica de Gram e com aumento total de 1000x (Fonte: imagem obtida no presente estudo). 46

Figura 3.7 Vias metabólicas da fermentação anaeróbica de glicerol por *Clostridium butyricum* (Fonte: adaptado de ZENG, 1996). O ramo redutivo da via metabólica encontra-se em destaque representado pela linha contínua, e o ramo oxidativo, em linha tracejada. 48

Figura 3.8 Ilustração da cadeia produtiva, desde a obtenção da matéria-prima para a produção de Bio-PDO™ até a utilização do polímero Sorona® na indústria de vestuário (Fonte: adaptado de DUPONT, 2019). 63

Figura 4.1 Curva de peso para quantificação do crescimento celular de *C. butyricum* NCIMB 8082 através de medidas de absorbância em espectrofotômetro Bell® modelo *SP 2000 UV*. O fator de conversão utilizado foi 0,287. 85

Figura 5.1 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 16 variáveis ao analisar como variável resposta a produção de biomassa obtida em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm. 92

Figura 5.2 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 16 variáveis ao analisar como variável resposta o consumo de glicerol obtido em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm. 92

Figura 5.3 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 16 variáveis ao analisar como variável resposta a produção de 1,3-PDO obtida em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm. 93

Figura 5.4 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 16 variáveis ao analisar como variável resposta o rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido obtido em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm. 94

Figura 5.5 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 11 variáveis ao analisar como variável resposta a produção de biomassa em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm. 99

Figura 5.6 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 11 variáveis ao analisar como variável resposta o consumo de glicerol em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm. 100

Figura 5.7 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 11 variáveis ao analisar como variável resposta a produção de 1,3-PDO em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm. 100

Figura 5.8 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 11 variáveis ao analisar como variável resposta o rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm. 101

Figura 5.9 Comparação do número de componentes do meio de cultivo e do preço do meio de cultivo antes e após cada etapa do estudo de minimização do meio de cultivo. O estudo de minimização foi realizado através da aplicação do planejamento experimental do tipo Plackett-Burman sucessivos. 106

Figura 5.10 Resultados obtidos de produção de 1,3-PDO, consumo de glicerol e crescimento celular para o estudo de diferentes concentrações de Mn^{2+} suplementado ao meio minimizado para a produção de 1,3-PDO por *C. butyricum.* Os ensaios foram realizados em frascos de soroe incubados a 37°C e 150 rpm por 24 horas. O experimento

Mn 0 representa o teste contendo meio de cultivo ausência de $MnCl_2.4H_2O$, Mn 1.5 contendo1,5 $g.L^{-1}$ de $MnCl_2.4H_2O$ e Mn 3.0 contendo 3,0 $g.L^{-1}$. 108

Figura 5.11 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, ácido butírico e ácido acético quando as células foram crescidas externamente ao biorreator de 1 L a 37°C e 200 rpm sem ajuste automático de pH e o ensaio foi realizado em regime de batelada simples utilizando meio de cultivo complexo (Estratégia 1). 111

Figura 5.12 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, ácido butírico e acético quando as células foram crescidas externamente ao biorreator de 1 L a 37°C e 200 rpm sem ajuste automático de pH e ensaio foi realizado em regime de batelada alimentada com meio de cultivo complexo (Estratégia 2). 111

Figura 5.13 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, ácido butírico e ácido acético obtidos quando as células foram crescidas diretamente em biorreator de 1 L a 37°C e 200 rpm sem ajuste automático de pH e o ensaio foi realizado em batelada alimentada com meio minimizado (Estratégia 3) 113

Figura 5.14 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO obtidos quando as células foram crescidas diretamente no biorreator de 1 L a 37°C e 200 rpm com ajuste automático de pH e o ensaio foi realizado em batelada simples com o meio de cultivo minimizado. (Estratégia 5). 115

Figura 5.15 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, produção de ácido acético e ácido butírico quando as células foram crescidas diretamente no biorreator de 1 L a 37°C e 200 rpm com ajuste automático de pH abaixo da neutralidade e o ensaio foi realizado em batelada alimentada com o meio de cultivo minimizado (Estratégia 6). 117

Figura 5.16 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, produção de ácido acético e ácido butírico quando as células foram crescidas no biorreator de 5 L a 37°C e 200 rpm com ajuste automático de pH igual a 7,0 e o ensaio foi realizado em regime de adição de N_2 a cada amostragem e/ou alimentação e batelada alimentada utilizando o meio minimizado (Estratégia 7). 119

Figura 5.17 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, produção de ácido acético e ácido butírico quando as células foram crescidas no biorreator de 5 L a 37°C e 200 rpm com ajuste automático de pH igual a 7,0 e o ensaio

foi realizado em regime de adição contínua de N_2 e batelada alimentada utilizando o meio minimizado (Estratégia 8). 120

Figura 5.18 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, produção de ácido acético e ácido butírico quando as células foram crescidas no biorreator de 5 L a 37°C e 200 rpm com ajuste automático de pH igual a 7,0 e batelada simples utilizando o meio minimizado contendo milhocina, em substituição ao extrato de levedo (Estratégia 9). 124

Figura 5.19 Correlação entre os resultados de rendimento de produção de 1,3-PDO e relação C/N obtidos para as diferentes estratégias em biorreator 130

Figura 5.20 Diagrama de blocos do processo de produção de 1,3-PDO por *Clostridium butyricum* NCIMB 8082 a partir de glicerina bruta e extrato de levedo em biorreator de 200L sob agitação de 200 rpm e 37°C. 133

Figura 5.21 Gráfico ilustrativo do preço praticado de 1,3-PDO, em termos de US$.$Kg^{-1}$, período 2010 a 2018. (Fonte: ComexStat, 2019). 134

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 Conversão da glicerina bruta em produtos químicos via rota química e/ou fermentativa e suas aplicações. 36

Tabela 3.2 Espécie de microrganismo potencialmente produtores de 1,3-PDO a partir da metabolização da molécula de glicerol. 43

Tabela 3.3 Parâmetros cinéticos da produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta utilizando *C. butyricum* em diferentes estratégias operacionais. 60

Tabela 3.4 Dados de valores de importação de 1,3-PDO no período de 2004 a 2018. 65

Tabela 4.1 Componentes e níveis estudados no planejamento PB contendo 16 variáveis independentes utilizando temperatura de 37°C e 150 rpm. 72

Tabela 4.2 Valores reais e codificados das 16 variáveis investigadas nos experimentos realizados em frascos de soro a 37°C e 150 rpm segundo o planejamento PB. 73

Tabela 4.3 Componentes e níveis estudados no planejamento PB contendo 11 variáveis independentes e utilizando temperatura de 37°C e 150 rpm. 75

Tabela 4.4 Valores reais e codificados das 11 variáveis independente investigadas nos experimentos realizados em frascos de soro a37°C e 150 rpm segundo o planejamento PB. 76

Tabela 4.5 Meios de cultivo utilizados no estudo de diferentes concentrações de Mn^{2+}. Os ensaios foram realizados em frascos de soro e incubados a 37°C,150 rpm e 24 horas. 77

Tabela 4.6 Meio de cultivo utilizado na etapa de crescimento celular e na etapa de produção de 1,3-PDO durante a condução de experimentos em biorreator de 1 L segundo as Estratégia 1 e 2. 79

Tabela 4.7 Meio de cultivo utilizado na etapa de crescimento celular e na etapa de produção de 1,3-PDO nos experimentos realizados em biorreator 1 L segundo as Estratégias 3, 4, 5, 6, 7 e 8. 80

Tabela 4.8 Meio de cultivo utilizado na etapa de crescimento celular e na etapa de produção de 1,3-PDO do experimento realizado em biorreator 5 L (Estratégia 9) 83

Tabela 4.9 Resumo das diferentes estratégias no estudo de produção de 1,3-PDO em biorreator sob temperatura de 37ºC e agitação de 200 rpm. 84

Tabela 5.1 Resultados de crescimento celular, consumo de glicerol, produção e rendimento de 1,3-PDO utilizando *C. butyricum* após 24 horas de cultivo incubados em 37°C e 150 rpm nos ensaios do planejamento experimental *Placket-Burman* de 16 variáveis independentes 90

Tabela 5.2 Composição dos meios de cultivo usados nos ensaios E2*, E6* e Emín* 95

Tabela 5.3 Resultados de biomassa, concentração de glicerol, produção e rendimento de 1,3-PDO obtidos nas condições dos ensaios E2*, E6* e Emínimo* quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm. 96

Tabela 5.4 Resultados de crescimento celular, consumo de glicerol, produção e rendimento de 1,3-PDO obtidos do planejamento experimental PB de 11 variáveis quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm após 24 horas de cultivo. 98

Tabela 5.5 Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios F6*, F6**, F12* e Fmínimo*. 103

Tabela 5.6 Resultados de biomassa, concentração de glicerol, 1,3-PDO e rendimento em 1,3-PDO obtidos nos ensaios nomeados de F6*, F6**, F12* e Fmínimo* quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm. 105

Tabela 5.7. Parâmetros cinéticos da etapa de produção de 1,3-PDO nas Estratégias 3, 7 e 8 quando as células foram cultivadas a 37°C, 200 rpm em meio minimizado. 122

Tabela 5.8 Resumo dos resultados obtidos nas diferentes estratégias operacionais testadas. 129

Tabela 5.9 Resultados de produção de 1,3-PDO obtidos em estudos da literatura em comparação com os obtidos nesse trabalho. 131

Tabela 5.10 Custo total anual da matéria-prima do processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082 utilizando glicerina bruta e extrato de levedo em biorreator de 200 L sob agitação de 200 rpm e 37°C. 136

Tabela 5.11 Custos total anual de energia elétrica consumida durante o processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082 biorreator de 200L sob agitação de 200 rpm e 37°C. 138

Tabela 5.12 Custo total anual considerando os custos variáveis para o processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* sob agitação de 200 rpm e 37°C. 139

Tabela 5.13 Custo anual de mão de obra referente ao processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082 em reator de 200L utilizando meio de cultivo contendo glicerina bruta e extrato de levedo como fontes de nutrientes sob agitação de 200 rpm e 37ºC. 140

Tabela 5.14 Informações sobre os custos do processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082 em reator de 200 L utilizando meio de cultivo contendo glicerina bruta e extrato de levedo como fontes de nutrientes sob agitação de 200 rpm e 37ºC. 141

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

ANP - Agência Nacional de Petróleo

ATP - Adenosina trifosfato

BIOSE - Laboratório de Engenharia de Sistemas Biológicos

CMP - custo anual de matéria-prima

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DHA - dihidroxiacetona

DHAK - dihidroxiacetona fosfato quinase

DTL - DuPont Tate & Lyle BioProducts

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GDH - glicerol desidrogenase

GDHt - glicerol desidratase

LAGRO - Laboratório Agronômico S/C Ltda.

LB - Lucro bruto inicial

MME - Ministério de Minas e Energia

NCIMB - National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria

NPA - Natural Products Association

PB – planejamento experimental Plackett-Burman

PBT - Poli(tereftalato de butileno)

PDOR - 1,3-propanodiol oxidoredutase

PET -Poli(tereftalato de etileno)

PEP - fosfoenolpiruvato

PTT - Poli(tereftalato de trimetileno)

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel

$Q_{1,3\ PDO}$ - produtividade em 1,3-PDO

RCM - Reinforced Clostridial Medium

RV - retorno de venda

SOD - superóxido dismutase

UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

VVM - volume de ar por volume do meio por minuto

$Y_{1,3\ PDO}$ - rendimento da produção de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido

1,3-Propanodiol – 1,3-PDO

3-HPA - 3-hidroxipropanaldeído

1 Introdução

Os atuais problemas ambientais causados pela utilização de combustíveis fósseis são tema de amplo debate nas esferas acadêmica e industrial. Entre os problemas associados a esses combustíveis, estão o fato de não serem renováveis, apresentar oscilação de preços, além da instabilidade geopolítica nas principais regiões produtoras. Desta forma, a população mundial tem priorizado a utilização de fontes alternativas de energia, em complementação às fontes fósseis tradicionais (KAUR et al., 2012).

Os biocombustíveis, tal como o biodiesel, obtido de óleos e gorduras, estão entre as alternativas energéticas mais importantes na substituição de combustíveis derivados do petróleo. Nos últimos 10 anos, o governo brasileiro vem aprovando medidas provisórias para o aumento gradativo dos percentuais de biodiesel misturados ao diesel fóssil. A medida que entrou em vigor, em setembro do ano corrente, é de B11% (B11) de biodiesel adicionado ao diesel. Um estudo de prospecção realizado pelo Ministério de Minas e Energia (MME) estima que a produção mundial de biodiesel em 2020 alcance 14,3 bilhões de litros, gerando uma quantidade de glicerina muito acima da capacidade de absorção dos mercados mundiais (MME, 2019).

A glicerina, como subproduto oriundo da produção de biodiesel, é comumente designada de glicerina bruta (MOTA et al., 2009), e quando disposta em grande quantidade, é considerada um resíduo de impacto negativo ao meio ambiente. Em contrapartida é um subproduto de alto valor energético e baixo custo (MOTA et al, 2009; DA COSTA et al., 2010) e pode ser empregada no desenvolvimento de produtos químicos de potencial industrial. Diante desde cenário, o desenvolvimento de tecnologias nacionais a fim de converter glicerina bruta em produtos de alto valor agregado é uma necessidade urgente e uma oportunidade chave para o desenvolvimento da cadeia produtiva de biodiesel.

A glicerina bruta pode ser convertida em diversos intermediários químicos de valor industrial, tanto por síntese química, quanto por conversão biológica. A conversão microbiana da glicerina bruta apresenta algumas vantagens em relação às sínteses químicas, visto que não ocorre a geração de intermediários tóxicos, emprega-se um menor número de etapas e utiliza-se temperaturas e pressão mais brandas. Neste sentido, uma

aplicação potencial para a conversão microbiana da glicerina bruta é a produção de 1,3-propanodiol, conhecido como 1,3-PDO (SAXENA et al., 2009; KUBIAK et al., 2012).

A produção de 1,3-PDO vem crescendo nos últimos anos e, sua ascensão vertiginosa está associada a produção de polímeros de base renovável, tal como o poli(tereftalato de trimetileno) (PTT). O PTT, sintetizado a partir de dois monômeros dentre eles o 1,3-PDO, representa uma alternativa ao uso dos polímeros convencionais (LINDLBAUER et., 2017). Em 2012, a demanda global de 1,3-PDO foi de 60,2 kt que, em termos monetários, o que refere-se a US$ 157 milhões. A estimativa é que esse mercado alcance US$ 490 milhões em 2019, com a projeção de uma taxa de crescimento anual de 12,2 % entre 2019 e 2024. Além do setor petroquímico, o aumento do uso de 1,3-PDO na indústria farmacêutica e de cosmético é o que deve impulsionar o mercado nos próximos anos (MARKETS AND MARKETS, 2019).

Os processos convencionais de síntese química do 1,3-PDO são baseados no uso da acroleína e do óxido de etileno. Esses processos inicialmente possibilitaram a síntese de 1,3-PDO em escala industrial, mas necessitam de temperatura e pressão extremas, uso de catalisadores de alto custo e geração de substâncias tóxicas, fatores que traduzem condições de desvantagens ao processo. A biossíntese de 1,3-PDO através da utilização de microrganismos, por exemplo, *Citrobacter freudii*, *Klebsiella pheumonia*, e *Clostridium butyricum*, além dos organismos geneticamente modificados é o processo que, industrialmente, vem se tornando mais usual (LEE et al., 2015).

A obtenção de 1,3-PDO por via biotecnológica, utilizando matérias-primas renováveis, é especialmente atrativa quando comparada a produção por rota química. Entretanto, um dos importantes gargalos do processo biotecnológico é o elevado custo do meio de cultivo, que Segundo Wilkens et al. (2012) podem representar mais de 50% do custo total da produção. Além do preço referente aos insumos para composição do meio de cultivo, os baixos resultados de produtividade e rendimento - parâmetros cinéticos relevantes para a viabilização do processo em escala industrial - tornam o bioprocesso de produção de 1,3-PDO pouco competitivo para o emprego na indústria petroquímica e de plásticos. O volume de 1,3 PDO obtido por via biotecnológica também tem sido destinado à indústria cosmética substituindo, nas formulações cosméticas, os glicóis à base de petróleo: propilenoglicol, butilenoglicol e glicerina. Esse cenário pode vir a tornar o bioprocesso mais competitivo e interessante e justificar a implantação de unidades industriais para produção desse glicol.

No âmbito deste contexto, o principal desafio em questão é estudar o desenvolvimento de um processo de biossíntese de 1,3-PDO com potencial econômico competitivo utilizando como catalisador a cepa selvagem e anaeróbica de *Clostridium butyricum* NCIM 8082, e como principais fontes de carbono e nutrientes, glicerina bruta e milhocina, resíduos industriais de baixo custo e alto valor energético.

2 Justificativa e Objetivos

Apesar dos métodos de produção de 1,3-PDO via rota química serem totalmente consolidados, existem desvantagens da síntese química em relação a rota biológica. O processo fermentativo de produção de 1,3-PDO, considerado uma tecnologia com aporte da química verde, tem despertado interesse nos pesquisadores, visto que a produção biológica do produto é uma rota em potencial.

Atualmente, a Dupont, empresa internacional líder do mercado de 1,3-PDO, trabalha na produção do glicol empregando uma cepa geneticamente modificada de *Escherichia coli*, capaz de converter açúcar de milho no produto de interesse. No entanto, estudos apontam que o desenvolvimento da tecnologia nacional de produção de 1,3-PDO está voltado para o aproveitamento da glicerina bruta, resíduo industrial excedente da produção de biodiesel. Uma das justificativas para empregar esse resíduo na esfera fermentativa é seu baixo custo, elevada disponibilidade no mercado e alto poder energético à luz da bioquímica.

Em relação a viabilidade econômica do processo biotecnológico em questão, fatores chave podem ser considerados limitantes como, o preço dos insumos, a eficiência do processo em termos de produção, rendimento e produtividade e, ainda, o custo do processo de separação e purificação do produto. Segundo Wilkens et al. (2012), os insumos do meio de cultivo são apontados como os principais onerantes do processo, podendo representar mais de 50% do custo total da produção.

O aproveitamento de resíduos industriais, possibilitando a redução dos gastos referentes aos insumos utilizados nos meios de cultivos, em consonância com os baixos resultados obtidos para os parâmetros cinéticos da produção de 1,3-PDO e os gargalos inerentes ao trabalho em condições anaeróbica, foram os motivadores do presente estudo.

2.1 Objetivos

Neste contexto, o objetivo principal desta tese envolve o estudo de estratégias experimentais que possibilitem, através da aplicação de diferentes modos de condução de processo, melhorar a *performance* da produção biotecnológica de 1,3-PDO por

Clostridium butyricum NCIMB 8082, utilizando como principal fonte de carbono e nutrientes os resíduos industriais glicerina bruta e milhocina, respectivamente. O presente trabalho visou, através do emprego de metodologias de planejamento experimental, minimizar a composição do meio de cultivo para síntese de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta utilizando como biocatalisador o *Clostridium butyricum* NCIMB 8082. Visto que o custo referente ao meio de cultivo em um processo fermentativo é oneroso e representativo na viabilização do processo em escala industrial, a glicerina bruta foi selecionada como principal fonte de carbono devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade no mercado brasileiro. Em um segundo momento, foram testadas condições operacionais em escala de biorreator de volume útil de 1 L e 5 L a fim de avaliar o desempenho cinético do processo fermentativo em diferentes estratégias operacionais. Os estudos em biorreator foram desenvolvidos utilizando a composição do meio de cultivo, obtida a partir de ensaios utilizando técnicas de planejamento de experimentos. Ainda, avaliou-se a substituição do extrato de levedo contido no meio de cultivo, principal fonte de nitrogênio, por milhocina, resíduo de baixo valor agregado e rico em nutrientes, proveniente do processamento industrial da maceração do milho. Por fim, avaliou-se preliminarmente a viabilidade econômica do bioprocesso em questão, levando em consideração os dados obtidos no estudo.

2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral do projeto, este foi segmentado nas seguintes etapas:

- Reduzir o número de componentes do meio de cultivo, utilizando planejamento experimental do tipo *Plackett Burman* e análise estatística dos dados, visando elaborar um meio de cultivo menos oneroso para o emprego na produção de 1,3-PDO por *C. butyricum*;
- Investigar a influência da adição de íons manganês ao meio de cultivo minimizado utilizado para a produção de 1,3-PDO;
- Estudar estratégias operacionais, em biorreator, a fim de avaliar as melhores condições para a obtenção de 1,3-PDO levando em consideração os parâmetros cinéticos dos diferentes modos de condução de processo;

- Analisar o comportamento e viabilidade celular de cepas de *C. butyricum* na produção de 1,3-PDO através do aumento da escala do bioprocesso, utilizando reator de 5 L;
- Estudar a substituição do extrato de levedo, contido no meio de cultivo, por milhocina a fim de garantir a redução dos custos do meio de cultivo.
- Avaliar preliminarmente a viabilidade econômica da produção de 1,3-PDO por *C. butyricum.* A avaliação baseou-se nas condições de cultivo e nos resultados experimentais obtidos no presente trabalho.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Matriz Energética, Biodiesel e Glicerina bruta

Segundo o MME (2019), a Matriz Energética Mundial é composta, principalmente, por fontes não renováveis, tais como os derivados de petróleo e o carvão. Das fontes energéticas renováveis aquelas que contribuem significativamente para contornar os problemas do aquecimento global, os biocombustíveis, somada a energia eólica e a solar, não representam mais do que 13,8%, no que diz respeito à oferta de energia mundial. Mesmo com baixa expressividade na matriz energética mundial, se comparado às fontes não renováveis, existem incentivos e programas governamentais que visam incrementar a produção das fontes renováveis em todo o mundo.

Na esfera nacional, em 2015, as fontes renováveis no Brasil totalizaram a participação de 41,2% na matriz energética, já em 2016 esse valor aumentou para 43,6%, quase três vezes superior ao indicador mundial, de apenas 13,8%. Esses indicadores de energia renovável fazem da matriz energética brasileira uma das mais limpas do mundo (MME, 2019). Este fato, comprovadamente, traduz uma vantagem estratégica para o país no atual cenário mundial, onde as questões de segurança energética e ambientais são consideradas uma preocupação iminente. A Figura 3.1 representa a matriz energética brasileira contendo as distintas fontes energéticas e suas respectivas porcentagens para a geração de energia total.

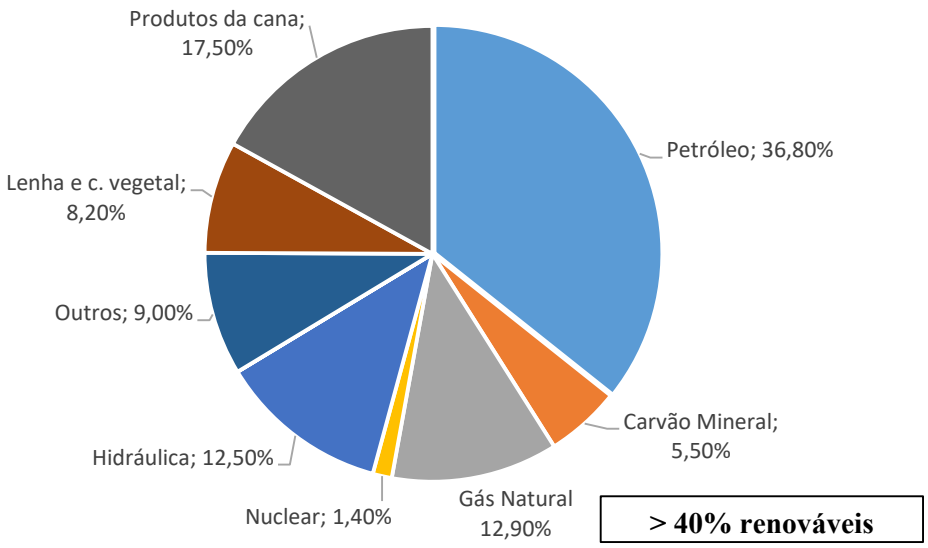

Figura 3.1 Dados da Matriz Energética Brasileira. Fonte: Boletim Mensal de Energia do Núcleo de Estudos Estratégicos de Energia da Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento Energético (MME, 2019).

Os biocombustíveis se distinguem dos combustíveis fósseis por serem gerados a partir de fontes renováveis e por propiciar um menor impacto ambiental. Os principais biocombustíveis líquidos utilizados no Brasil são o etanol e o biodiesel, ambos derivados de matéria-prima renovável (MME,2019).

O biodiesel (ésteres de ácidos graxos) é um combustível biodegradável, não-tóxico, produzido a partir de matéria-prima renovável e, em vista disso, o seu uso tem se tornado cada vez mais atraente (MARCHETTI et al., 2007). Pode ser produzido a partir de gorduras animais ou óleos vegetais, existindo dezenas de espécies vegetais no Brasil que podem ser utilizadas para tal uso, tais como mamona, dendê, girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso e soja, dentre outras. Atualmente, a maior parte do biodiesel produzido no Brasil é proveniente de óleo de soja, devido a disponibilidade desta oleaginosa (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, ANP, 2017).

O biodiesel, parte de um elenco de respostas à substituição dos combustíveis fósseis, já tem seu emprego mandatório em alguns países, inclusive no Brasil. Desde 2004 o governo brasileiro implementou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que regulamenta a produção e distribuição do biodiesel brasileiro e, atualmente, exige o uso de 11% (B11) de biodiesel na composição do diesel. (BIODIESELBR, 2019).

Se, por um lado, projetos como o PNPB colocam nosso país na vanguarda do uso de combustíveis alternativos, eles também reforçam a necessidade de se encontrar utilizações comerciais para os subprodutos da produção do biodiesel, como a glicerina bruta. Segundo Mota e colaboradores (2009), em geral, 10 % em massa do produto de transesterificação são representados pela glicerina residual, a qual apresenta diversas impurezas como: água, sais inorgânicos, residuos de catalisador, álcool e material orgânico não glicerol, o que confere a essa glicerina baixo valor comercial. Sendo assim, na produção industrial do biocombustível, para cada 90 m^3 de biodiesel produzidos por transesterificação são gerados, aproximadamente, 10 m^3 de glicerina bruta.

A glicerina bruta, que contém impurezas convencionais do processo de produção de biodiesel, se constitui atualmente em um produto vendável de baixo valor agregado e em constante decaimento, com preço de venda médio em torno de 0,25 US$/Kg (COMEXSTAT, 2019). Entretanto, a grande preocupação é a quantidade excessiva que é gerada na produção de biodiesel. Em 2018, a produção de B100 no país cresceu 12,9% em relação ao ano anterior atingindo o montante de 5,3 milhões de m^3 (Figura 3.2), sendo a principal matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel o óleo de soja (65%), seguido do sebo bovino (12%). A quantidade de glicerina bruta avaliada através de produção ultrapassou o montante de 0,5 milhões de m^3 em 2019 e a prospecção é que o crescimento aconteça a uma taxa de 6,4% ao ano até 2023 (Anuário Estatístico, ANP, 2018).

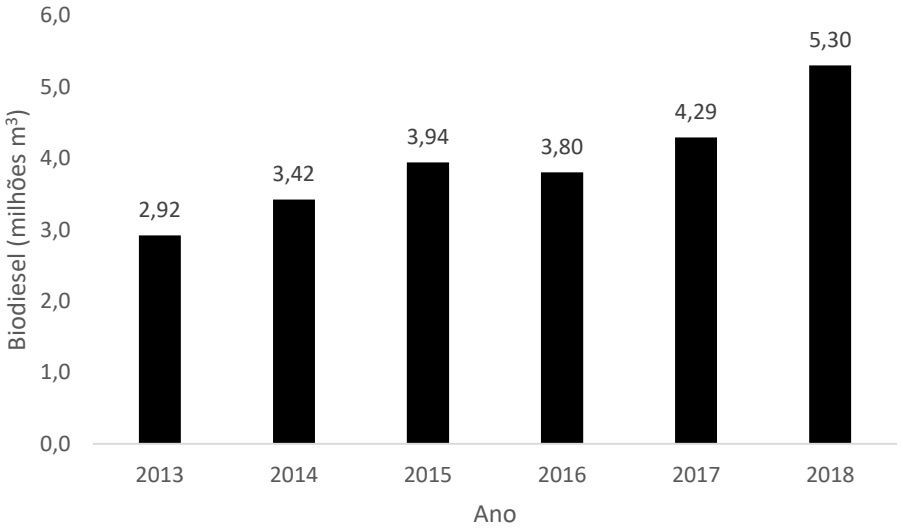

Figura 3.2 Evolução da produção brasileira de biodiesel no período de 2013 - 2018 (Fonte: ANP, 2018).

Tendo em vista a produção de biodiesel, a glicerina bruta requer a absorção desse insumo pelo mercado. Sendo considerada, a glicerina bruta, como um produto de baixo valor comercial, torna-se essencial o desenvolvimento de processos voltados para a conversão desse material em produtos que apresentem valor e competitividade no mercado.

3.2 Aplicações da glicerina bruta

Com o intuito de melhorar a sustentabilidade da cadeia produtiva do biodiesel faz-se necessário converter a glicerina bruta em produtos de alto valor econômico. A produção de produtos com alto valor agregado propicia novos usos para a glicerina bruta e contribui para minimizar os impactos ambientais negativos gerados pelo seu descarte e acúmulo (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). Nesse sentido, o desenvolvimento de tecnologias para a valorização da glicerina bruta é fundamental e gera oportunidades para a ampliação da cadeia produtiva do biodiesel.

A glicerina bruta, em diferentes níveis de pureza, tem sua absorção usual em setores como a indústria de cosméticos e fármacos, poliésteres e polióis, revenda, alimentos e bebidas e tabaco (MOTA et al, 2009). No entanto, conforme já mencionado o grande excesso gerado ultrapassa em muito a demanda do mercado e exigiria etapas de purificação dispendiosas para seu uso, principalmente nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos, que demandam um produto com pureza elevada. Além desses setores industriais a glicerina bruta também pode ser queimada como combustível, entretanto a queima gera emissões muito elevadas de partículas de acroleína (STEINMETZ et al., 2013). Outro uso possível é seu emprego na dieta para ruminantes até concentração de 10% em matéria seca (SCHRÖDER & SÜDEKUM, 2015).

Ademais, a glicerina bruta pode ser empregada na conversão via rota química e biológica na geração de uma variedade de produtos químicos de interesse industrial. Os processos de produção biotecnológica baseados no uso da glicerina bruta demonstram que esse insumo é fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano, fato que a constitui como um insumo promissor para a indústria microbiológica. Diante da microbiologia industrial, um dos usos possíveis da glicerina bruta é a geração de produtos químicos de valor comercial, entre eles encontra-se o 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, butanol, ácido succínico, etanol, ácido cítrico, dihidroxiacetona, pigmentos e biosurfactantes, polióis e bioóleo (GALLARDO et al,

2014; METSOVITI et al., 2012; SAXENA et al., 2009). A Tabela 3.1 apresenta diferentes produtos químicos obtidos a partir da glicerina bruta via rota química e/ou biológica e suas principais aplicações.

Tabela 3.1 Conversão da glicerina bruta em produtos químicos via rota química e/ou fermentativa e suas aplicações.

Produto Químico	Aplicação
1,3-propanodiol	Produção de polímeros, cosméticos, anticongelantes para motores automobilísticos (SAXENA et al., 2009)
n-butanol	Biocombustíveis (GALLARDO et al., 2014)
2,3-butanodiol	Obtenção de produtos químicos como metil-etil-cetona que é usada como aditivos em combustíveis (METSOVITI et al., 2012)
Eritritol	Indústria farmacêutica e alimentícia usado como aditivo e edulcorante (NASCIMENTO, 2016)
Ácido cítrico	Indústria alimentícia e farmacêutica usado como acidulante, conservante, antioxidante e ajustador de pH (SILVA, 2010)
Ácido butírico	Indústria alimentícia, farmacêutica e química (AI et al., 2014)
Bioóleo	Biocombustíveis
Dihidroxiacetona (DHA)	Intermediário para produção de polímeros (MOTA et al., 2009)
Biossurfactantes	Indústria de petróleo, farmacêutica, alimentícia para estabilização de emulsões (FONTES et al., 2008)
Acroleína	Intermediário para produção de ácido acrílico que é utilizado na produção de polímeros absorventes para uso em fraldas descartáveis, tintas, adesivos (MOTA et al., 2009)
Epicloridina	Produção de resinas epóxi, síntese de elastômeros e aditivos na indústria do papel (MOTA et al., 2009)
Éteres, acetais, ésteres	Indústria de combustíveis (MOTA et al., 2009)
Ácido fórmico	Indústria petroquímica e curtume (BIODIESELBR, 2014)
Gás de síntese (mistura CO e H_2)	Síntese de metanol (que pode entrar na cadeia do biodiesel), produção de hidrocarbonetos por Fischer Tropsch (MOTA et al., 2009)
Propeno	Intermediário na obtenção de polipropileno que pode ser moldado apenas com aquecimento, sendo aplicado desde brinquedos até materiais automotivos (MOTA et al., 2009)
Manitol	Indústria alimentícia para uso como edulcorante (CORRÊA, 2017)

Além desses mercados supracitados para aplicação da glicerina bruta, parte considerável do excedente da produção nacional é escoado para a atividade de exportação. Ao analisar a

Figura 3.3, a qual apresenta a quantidade de glicerina bruta exportada pelo Brasil, observa-se que o montante exportado girou, em média, em torno de 0,23 milhões de m^3 entre os anos de 2013 e 2018. Ao comparar esses dados com a média total de resíduo gerado ao longo do período - 0,395 milhões de m^3 - pode-se dizer que 58% desse subproduto foi destinado ao setor de exportação, porcentagem essa que se torna significativa e expressiva frente a quantidade de glicerina bruta gerada. Segundo BiodieselBr (2019), a principal fonte de informações *on line* sobre o mercado de biodiesel, a exportação de glicerina bruta pelo Brasil alcançou *recorde* no mês de maio de 2019, crescendo 57% em relação ao ano anterior.

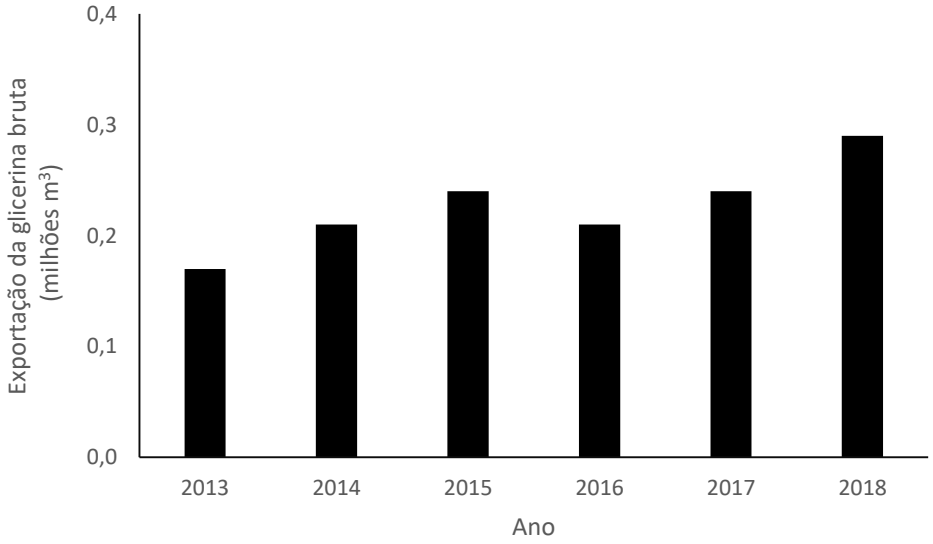

Figura 3.3 Exportação de glicerina bruta no Brasil no período de 2013-2018. (Fonte: ComexStat, 2019).

Diante da Figura 3.2 observa-se uma crescente produção de biodiesel, e consequentemente de glicerina bruta. No entanto, a exportação desse material não é uma alternativa interessante para o país. Segundo BiodieselBr (2019), a glicerina bruta nacional exportada é utilizada para a fabricação de produtos químicos de maior valor agregado, produtos esses que de forma indireta são importados pelo Brasil. O país exporta a glicerina bruta por um valor comercial muito baixo e importa os produtos fabricados com a glicerina bruta por um alto valor, fenômeno que contribui para o déficit comercial na economia brasileira.

O ácido fórmico é um exemplo de produto que é gerado a partir da glicerina bruta nacional que é exportada. A China utiliza a glicerina bruta brasileira para a produção do ácido fórmico, sendo atualmente uma grande produtora e exportadora desse produto químico. Logo, a glicerina exportada para a China retorna ao Brasil na forma de ácido fórmico, com um preço

mais elevado em comparação ao valor de venda da material exportado. O ácido fórmico poderá ser usado pela indústria petroquímica para a produção de plásticos ou pela indústria do curtume no preparo de couro (BiodieselBr, 2014).

Diante do cenário atual, o desenvolvimento de oportunidades que integrem a cadeia produtiva de biodiesel e propiciem a conversão da glicerina bruta em produtos químicos com valor comercial devem ser vistos como prioridade na esfera acadêmica e industrial. Sendo assim, um dos produtos que podem ser produzidos através da utilização da glicerina bruta e que é foco de estudo no presente trabalho é o 1,3-propanodiol.

3.3 1,3-propanodiol (1,3-PDO)

O 1,3-propanodiol (1,3-PDO) vem ganhando importância e valor industrial devido às suas propriedades que garantem o seu uso como monômero na síntese de polímeros por reação de condensação (KAUR et al., 2012; LEE et al., 2015). 1,3-PDO, que atualmente tem sua produção industrial via rota biológica, juntamente com o ácido tereftálico, são monômeros na produção de poliésteres, um bioplástico com propriedades de alto desempenho e interesse industrial.

3.3.1 Características gerais e aplicações

1,3-PDO ($C_3H_8O_2$), também conhecido como trimetilenoglicol ou propano-1,3-diol, é um composto orgânico pertencente ao grupo dos dióis, com dois grupos hidroxila localizados no primeiro e terceiro átomo de carbono. O intermediário químico tem característica líquida, incolor, inodora e sua interessante propriedade química é a miscibilidade em água, éter e álcoois (SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2014; FERREIRA, 2014). Devido a sua alta temperatura de ebulição em torno de 217 ºC, ele reage com ácidos a alta temperatura para a formação de ésteres. O composto orgânico é de fácil biodegradabilidade, inflamável, não explosivo, não tóxico à exposição humana e considerado estável a temperatura ambiente e as condições de estocagem (DUPONT, 2019).

A principal aplicação industrial de 1,3-PDO é como monômero para produção de plásticos com propriedades particulares, como poliésteres e poliéteres. Entretanto, além de ser

um intermediário químico da síntese de plásticos biodegradáveis, esse composto possui uma série de aplicações industriais interessantes em produtos como: solventes, adesivos, lubrificantes, anticongelantes, aditivos de resinas e produtos da indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (SAXENA et al., 2009; KAUR et al., 2012).

Atualmente, o poliéster denominado poli(tereftalato de trimetileno) (PTT), é a principal aplicação - em termos quantitativos - do 1,3-PDO. O desenvolvimento de polímeros a base de matérias-primas renováveis, vem despertando o interesse da produção de 1,3-PDO; isso porque o crescimento da produção de PTT está associado a ampliação da escala de produção de 1,3-PDO. O PTT, poliéster formado por meio de reações de condensação entre o 1,3-PDO e o ácido tereftálico ou dimetil tereftalato, é um bioplástico particularmente atraente para produção de fibras para a indústria têxtil, empregado principalmente na produção de carpete e vestuário (KAUR et al., 2012). O alto desempenho do PTT nas propriedades de elasticidade, estabilidade, capacidade de coloração e resistência estática e ultravioleta, em comparação com os poliésteres convencionais, poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(tereftalato de butileno) (PBT) e nylon, fazem com que esse material seja uma opção interessante comercialmente (CHATZIFRAGKOU et al., 2011, DUPONT, 2019).

Embora o processo de produção de PTT tenha sido patenteado no início da década de 1940, sua comercialização só foi efetivada em 1995 pela empresa Shell com o produto de nome comercial Corterra®. A comercialização tardia deve-se principalmente ao elevado custo dos insumos necessários para produção deste polímero, o 1,3-PDO.

Tradicionalmente, ao iniciar a produção o intermediário químico foi classificado como uma especialidade química, produto considerado de alto valor de mercado. Em 2009, Saxena et al classificaram o produto como uma c*ommoditie* química. No âmbito industrial, essa transição deve-se ao crescimento da produção de PTT, diretamente ligada a ampliação da escala de produção de 1,3-PDO via rota química e aliada a redução do seu custo de produção (FERREIRA, 2014). Contudo, atualmente, o produto não possui uma classificação química bem definida, visto que se apresenta no mercado em diferentes graus de pureza e especificações, dependendo do setor ao qual será destinado.

3.3.2 Rotas de produção industrial

O diol de interesse pode ser produzido industrialmente via duas rotas, a química e a biológica (CHO et al., 2006; SAXENA et al., 2009).

A produção química de 1,3-PDO é feita a partir de derivados do petróleo como, óxido de etileno e acroleína (CHATZIFRAGKOU et al., 2011; CHO et al., 2006). No processo químico, desenvolvido em parceria das empresas Degussa/Dupont, a acroleína é hidratada a 3-hidroxipropionaldeído e, posteriormente, hidrogenada cataliticamente a 1,3-PDO (CHATZIFRAGKOU E AGGELIS et al., 2011). A tecnologia Degussa/Dupont não apresenta rendimentos maiores do que 40% (SAXENA et al., 2009). Por outro lado, a produção de 1,3-PDO patenteado pela empresa Shell Chemical Company, tem óxido de etileno reagindo com monóxido de carbono na presença de um catalisador organometálico (por exemplo, cobalto) e produzindo hidroxialdeído, esse último é finalmente reduzido ao diol por hidrogenação (WILKENS et al., 2012). Saxena et al. (2009) relataram que este último processo tem rendimento em torno de 80%. A Figura 3.4 ilustra as reações referentes as duas rotas de produção química mencionadas.

Há inúmeros desvantagens na utilização destas rotas químicas convencionais, tais como a exigência de condições operacionais extremas (elevadas pressões e temperaturas na etapa de hidrogenação), uso de catalisadores de alto custo, geração de intermediários tóxicos ao meio ambiente, dependência de insumos não renováveis e equipamentos de alto custo (CHATZIFRAGKOU E AGGELIS, et al., 2011; WILKENS et al., 2012; ZHU et al., 2016).

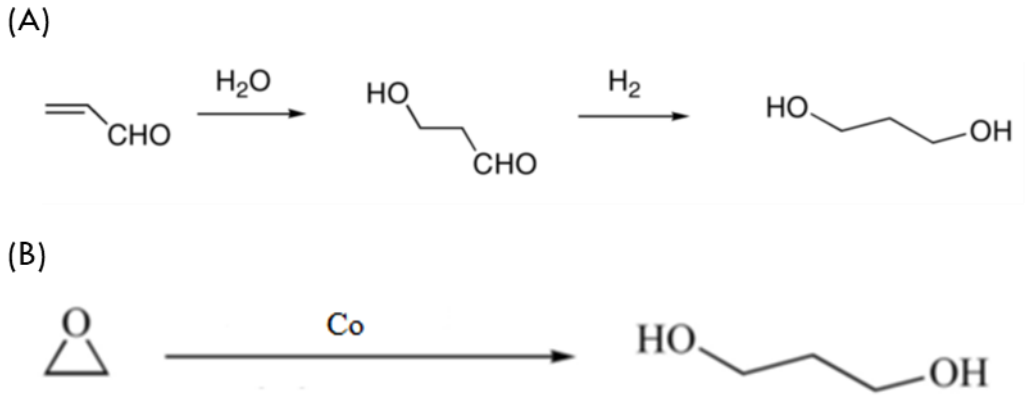

Figura 3.4 Síntese química do 1,3-PDO a partir da acroleína (tecnologia da Degussa/Dupont) (A) e do óxido de etileno (tecnologia da Shell (B) (Fonte: KRAUS, 2008).

Apesar dos métodos de produção de 1,3-PDO via rota química serem totalmente consolidados, Zhu et al. (2016) relatam que a demanda do mercado e as desvantagens da síntese química frente a rota biológica, essa última considerada uma tecnologia com aporte da química verde, tem direcionado as pesquisas para a produção biotecnológica de 1,3-PDO. Atualmente, a planta fermentativa de produção de 1,3-PDO é a única ativa na produção de 1,3-PDO para fins comerciais.

Os elevados custos de produção do 1,3-PDO alcançados pelas rotas petroquímicas, as primeiras a serem desenvolvidas, limitaram fortemente o uso dos derivados de 1,3-PDO (NAKAMURA E WHITED, 2003). A limitação foi a motivação pela qual, em 2006, a empresa Dupont iniciou um bioprocesso para produção de 1,3-PDO, utilizando uma cepa modificada geneticamente de *Escherichia coli*, capaz de converter glicose proveniente da hidrólise do milho no diol de interesse. O produto fabricado pela Dupont via rota biotecnológica foi designado comercialmente de Bio-PDO^{TM}. Os resultados relacionados aos parâmetros cinéticos da fermentação em batelada obtidos com o organismo modificado são: rendimento de 0,62 mol PDO/mol glicose, produtividade igual a 3,50 $g.L^{-1}.h^{-1}$ e concentração final de 1,3-PDO igual a 135,0 $g.L^{-1}$ (NAKAMURA E WHITED, 2003; SABRA et al., 2015).

A rota bioquímica é particularmente atraente, uma vez que tem a possibilidade de usar como substrato matérias-primas renováveis, não depende de catalisadores metálicos, há geração de produtos poluentes em baixa concentração, e trabalha em condições brandas de pressão e temperatura. O processo biotecnológico consome 40% menos energia quando comparado com as rotas químicas e reduz em cerca de 20% os gases de efeito estufa. Esses dados impactam na redução do custo de produção, promovendo assim, um aumento na fatia de mercado de todos os seus derivados. A comprovação destes dados pode ser vista pela acelerada ampliação do parque industrial do BioPDO^{TM} pela multinacional DuPont, que iniciou a operação em novembro de 2006 com capacidade instalada de 45.000 $toneladas.ano^{-1}$ e, no ano de 2011, sofreu uma ampliação de 35% da planta de produção, atingindo a capacidade de aproximadamente 63.000 $toneladas.ano^{-1}$ (DUPONT, 2019).

No Brasil, não há plantas de produção de 1,3-PDO (ABIQUIM, 2014), porém existe o interesse de empresas que vem investindo em pesquisa e desenvolvimento com a finalidade de consolidar um bioprocesso economicamente viável para produção desta biomolécula.

3.4 Microrganismos produtores de 1,3-PDO

Os microrganismos naturalmente capazes de produzir 1,3-PDO pertencem ao grupo das bactérias e utilizam exclusivamente o glicerol como fonte de substrato. Não se conhece qualquer organismo selvagem capaz de converter, diretamente, açúcares a 1,3-PDO. Dentre as espécies capazes de produzir o 1,3-PDO a partir de glicerol estão os gêneros *Klebsiella, Clostridium, Lactobacillus, Enterobacter* e *Citrobacter* (GUNGORMUSLER-YILMAZ et al., 2014; KUBIAK et al., 2012; DA SILVA, et al., 2014; ZHU et al., 2016). Bactérias anaeróbicas facultativas tais como *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Citrobacter freundii, Citrobacter werkmanii, Escherichia blattae, Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter (Pantoea) agglomerans*; e estritamente anaeróbicas como *Clostridium beijerinckii, Clostridium butyricum, Clostridium diolis, Clostridium pasteurianum* e *Lactobacillus diolivorans,* são os microrganismos naturais mais estudados para a produção de 1,3-PDO a partir do catabolismo de glicerol (GUNGORMUSLER e YILMAZ et al., 2014). Recentemente, novos microrganismos produtores de 1,3-PDO a partir de glicerol vem sendo reportados na literatura, como exemplo tem-se o gênero *Trichococcus* e cepas de *Hafnia alvei, Halanaerobium saccharolyticum* e *Shimwelllia blattae* (ZHU et al. 2016). Um resumo das cepas potencialmente produtoras de 1,3-PDO a partir da metabolização da molécula de glicerol encontra-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Espécie de microrganismo potencialmente produtores de 1,3-PDO a partir da metabolização da molécula de glicerol.

Cepas	1,3-PDO ($g.L^{-1}$)	$Y_{1,3\text{-PDO}}$ ($g.g^{-1}$)	$Q_{1,3\text{-PDO}}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Referências
C. butyricum DSP1	54,2-62,0	~ 0,53	0,76 – 1,55	(SZYMANOWSKA-POWALOWSKAS 2014)
C. butyricum VPI 3266	65,0	0,57	1,2	(GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2004)
C. acetobutylicum DGI (pSPD5)	60,0	0,53	3,0	(GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2004)
Citrobacter freundii FMCC-B 294 (vk-19)	68,1	0,40	0,8	(METSOVITI et al., 2013)
K. pneumoniae	83,5	0,62	1,6	(SAXENA et al., 2009)
L. reuteri	65,0	0,97	1,2	(AMIN et al., 2013)
L. diolivorans	84,5	0,55	1,7	(LINDLBAUER et al., 2017)

1,3-PDO produzido ($_{1,3\text{-PDO}}$); rendimento da produção de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido ($Y_{1,3\ PDO}$); produtividade em 1,3-PDO ($Q_{1,3\ PDO}$).

Dentre os microrganismos selvagens mencionados, os que se destacam como as espécies mais estudadas na área de interesse deste trabalho são *C. butyricum* e *K. pneumoniae,* devido ao alto rendimento, produtividade volumétrica e a apreciável tolerância ao substrato (WILKENS et al. 2012b). Embora *C. butyricum* participe do grupo dos microrganismos anaeróbios estrito e, *K. pneumoniae*, seja classificada como anaeróbio facultativo (o que o torna mais facilmente manipulável), espécies de *Clostridium* são as mais visadas nas aplicações industriais devido sua manipulação possui riscos biológicos menos severos do que *K. pneumoniae*.

Os riscos biológicos, avaliados em função do poder patogênico do agente infeccioso, são fatores que demandam atenção ao manipular microrganismos industrialmente, visto que a exposição dos colaboradores a esses agentes podem provocar inúmeras doenças de via cutânea ou percutânea, respiratória, conjuntiva ou via oral. Ao comparar as duas cepas com maiores potenciais para produção do metabólito de interesse, pode-se dizer que *C. butyricum* não requer especiais precauções de segurança, já que é considerado um microrganismo não patogênico. Em se tratando de *K. pneumoniae*, uma cepa patogênica, a manipulação exige medidas de biossegurança de classe 2, tipo esse que sinaliza que o organismo é um agente de risco

moderado para o manipulador e fraco para a comunidade (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, FIOCRUZ, 2019).

Além do risco de patogenicidade da espécie *K. pneumonie* inclui-se a dependência da vitamina B12 pela enzima glicerol desidratase (GDHt) (E.C. 4.2.1.30), presente na via metabólica de produção de 1,3-PDO (NAKAMURA E WHITE, 2003). A vitamina B_{12} deve ser suplementada ao meio de fermentação ao se trabalhar com *K. pneumonie* como biocatalisador. Vitaminas são insumos de alto custo, o que implicaria na elevação do custo de produção de 1,3-PDO. A bactéria *Clostridium butyricum*, todavia, possui uma via metabólica independente de vitamina B_{12}, tornando-se uma opção mais atraente para as aplicações industriais (FERREIRA, 2014).

No presente projeto, selecionou-se uma cepa de *C. butyricum* para ser utilizada como biocatalisador da produção de 1,3-PDO. Um dos critérios utilizados na seleção foi as vantagens mencionadas da estirpe *C. butyricum* comparada com *K. pneumoniae.*

3.4.1 Características morfológicas e fisiológicas do gênero *Clostridium*

Tradicionalmente, o gênero *Clostridium*, pertencente ao grupo das bactérias anaeróbias estritas, é descrito como bacilos formadores de endósporos e ausentes de cadeia respiratória e catalase (KAWASAKI et al. 1998).

Morfologicamente, bactérias do gênero *Clostridium* são gram-positivas, embora algumas espécies, especialmente quando em culturas mais velhas, descorem facilmente e apresentem-se como gram-negativas, tais como *C. ramosum* e *C. clostridioforme*.

A formação de estruturas chamadas endósporos confere à bactéria *C. butyricum* a capacidade de sobreviver em condições adversas por longos períodos de tempo, sendo o endósporo resistente a estresse químico e físico. A maior parte das espécies são produtoras de endósporos ovais ou esféricos, subterminais ou centrais e que podem deformar a parede celular, distendendo a célula (BERGEY'S MANUAL, 2005). A Figura 3.5 representa os tipos de endósporos de acordo com seu posicionamento.

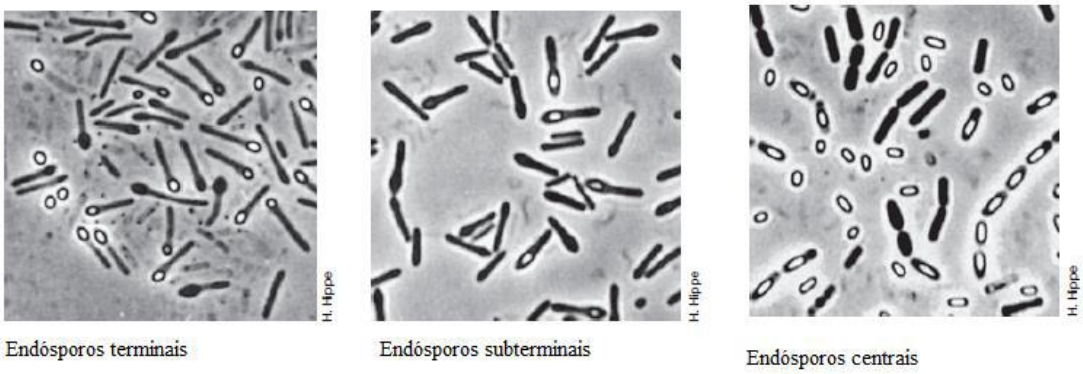

Figura 3.5 Diferentes tipos de endósporos quanto à posição (Fonte: adaptado de MADIGAN et al., 2012).

Bactérias pertencentes ao gênero *Clostridium* não possuem capacidade de redução de sulfato e são usualmente quimiorganotróficos, que dependem basicamente da fosforilação em nível de substrato para a geração de ATP. Quase todas as espécies consideradas do gênero *Clostridium* sensu stricto consomem carboidratos e produzem butirato como um dos principais produtos de fermentação (BERGEY'S MANUAL, 2005). Entretanto, como já se sabe, a heterogeneidade do gênero faz com que as rotas metabólicas e os produtos gerados sejam os mais diversos possíveis.

Os microrganismos anaeróbios estritos são aqueles que não crescem ou perdem viabilidade na presença de O_2. Muitas razões para a inibição do crescimento da classe *Clostridia* vem sendo reportada, uma das principais hipóteses é a falta de um sistema de eliminação do oxigênio e de seus derivados, tais como superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxi. O oxigênio molecular reage com proteínas ferro-enxofre, flavoproteínas e citocromos reduzindo-se a H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e O_2^- (superóxido), sendo essas moléculas oxidantes fortes, podendo destruir polímeros celulares, incluindo moléculas como DNA e RNA, causando danos letais as células. Especialmente, quase toda classe *Clostridia* carece de enzimas capazes de catalisar reações de quebra do O_2^- e do H_2O_2, superóxido dismutase (SOD) e catalase, respectivamente. A ausência destas enzimas vem sendo defendida como uma das principais razões para a sensibilidade ao O_2 pelos microrganismo anaeróbios estritos (KAWASAKI et al., 1998; KIM E GADD, 2008). No entanto, a atividade dessas enzimas foi identificada em alguns anaeróbios estritos e genes relacionados a proteínas semelhantes foram encontrados em seu genoma. Apesar de alguns anaeróbios estritos possuírem atividade das enzimas SOD e catalase, eles não crescem em condições aeróbias em laboratório. Quase todas

as espécies de *Clostridium* são catalase-negativas, embora possam ser detectados pequenos traços de catalase em algumas linhagens (BERGEY'S MANUAL, 2005).

C. butyricum é considerada a espécie representativa do gênero. Quando cultivadas em meio ágar em placa, as colônias têm de 1 a 6 μm de diâmetro e aspecto circular a irregular, translúcidas, esbranquiçadas, brilhosas e lisas. O crescimento em meio líquido confere turbidez ao meio, podendo observar sedimento ligeiramente floculento e o pH geralmente é de 4,6 a 5 após 5 dias de incubação. A temperatura e pH ótimos de crescimento estão nas faixas de 30 a 37°C e 6,5 a 7,0 (BERGEY'S MANUAL, 2005). As linhagens possuem uma enzima com centro ferro-enxofre, envolvida na redução de ferredoxina por piruvato e é usualmente encontrada em solo e trato intestinal de humanos e animais.

Portanto, por apresentar a habilidade de utilizar diversas fontes de carbono e produzir metabólitos de interesse industrial, além de apresentar tolerância a compostos tóxicos e baixo risco biológico, a espécie *C. butyricum* é bastante estudada e seus produtos metabólicos apresentam uma gama de aplicações biotecnológicas (LI et al., 2016).

A Figura 3.6 ilustra a microscopia de *C. butyricum* NCIMB 8082, cepa com potencial de metabolizar glicerol como principal fonte de substrato para a produção de 1,3-PDO.

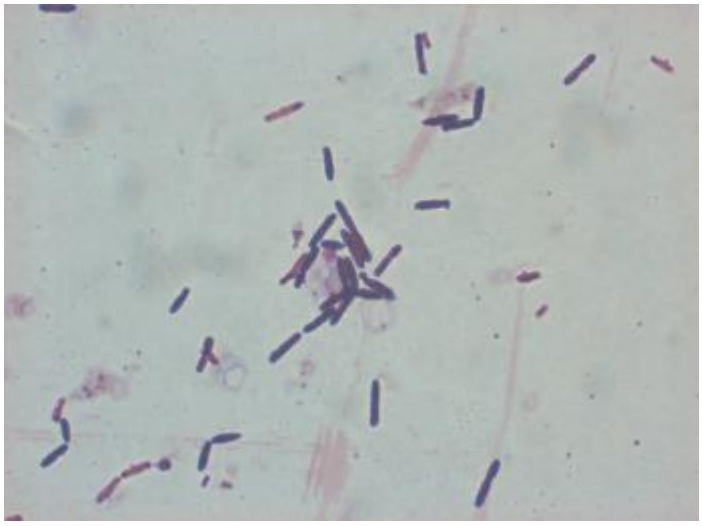

Figura 3.6 Foto ilustrativa da bactéria *C. butyricum* NCIMB 8082 utilizando microscopia ótica corada pela técnica de Gram e com aumento total de 1000x (Fonte: imagem obtida no presente estudo).

3.5 Produção de 1,3-PDO via rota biotecnológica

A conversão microbiana de glicerol a 1,3-PDO e a outros produtos finais da fermentação, tais como etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido lático é conhecida desde o início de 1930. Apesar disso, somente a partir de meados da década de 80 as vias metabólicas e a cinética enzimática da produção de 1,3-PDO tem sido estudada e detalhada por grupos de pesquisa com interesse neste diol. Estes estudos têm sido realizados devido aos avanços da ciência, principalmente no ramo da bioquímica, e têm proporcionado a compreensão da rede metabólica e seus fluxos pela comunidade acadêmica e industrial. Com base nas pesquisas bibliográficas, descrita nos parágrafos seguintes, será elucidada a bioquímica de produção de 1,3-PDO e seus fluxos metabólicos.

O metabolismo para a produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* envolve duas vias paralelas, a redutiva, via na qual efetivamente ocorre a produção do diol; e a via oxidativa, ramificação em que o glicerol é metabolizado em piruvato pela via glicolítica, produzindo assim, energia e poder redutor. A fim de garantir a manutenção do balanço redox faz-se necessário que o microrganismo utilize as duas vias paralelamente, proporcionando assim as atividades enzimáticas ideais e o fluxo metabólico constante e equilibrado (CHATZIFRAGKOU E MAKRI et al., 2011; HUANG et al, 2013; LI et al., 2016; ZENG, 1996).

A Figura 3.7 ilustra a rede metabólica envolvida na conversão do glicerol a 1,3-PDO e outros bioprodutos por *Clostridium butyricum.* Destacado em linha contínua, está a ramificação redutiva e, em linha tracejada, a ramificação oxidativa da via metabólica. Segundo relatos da literatura, as enzimas mais importantes do metabolismo de glicerol para a produção de 1,3-PDO por meio de bactérias são glicerol desidratase (GDHt) (E.C.4.2.1.3.0), 1,3-propanodiol oxidoredutase (PDOR) (E.C.1.1.1.202), glicerol desidrogenase (GDH) e dihidroxiacetona fosfato quinase (DHAK) (SAXENA et al. 2009).

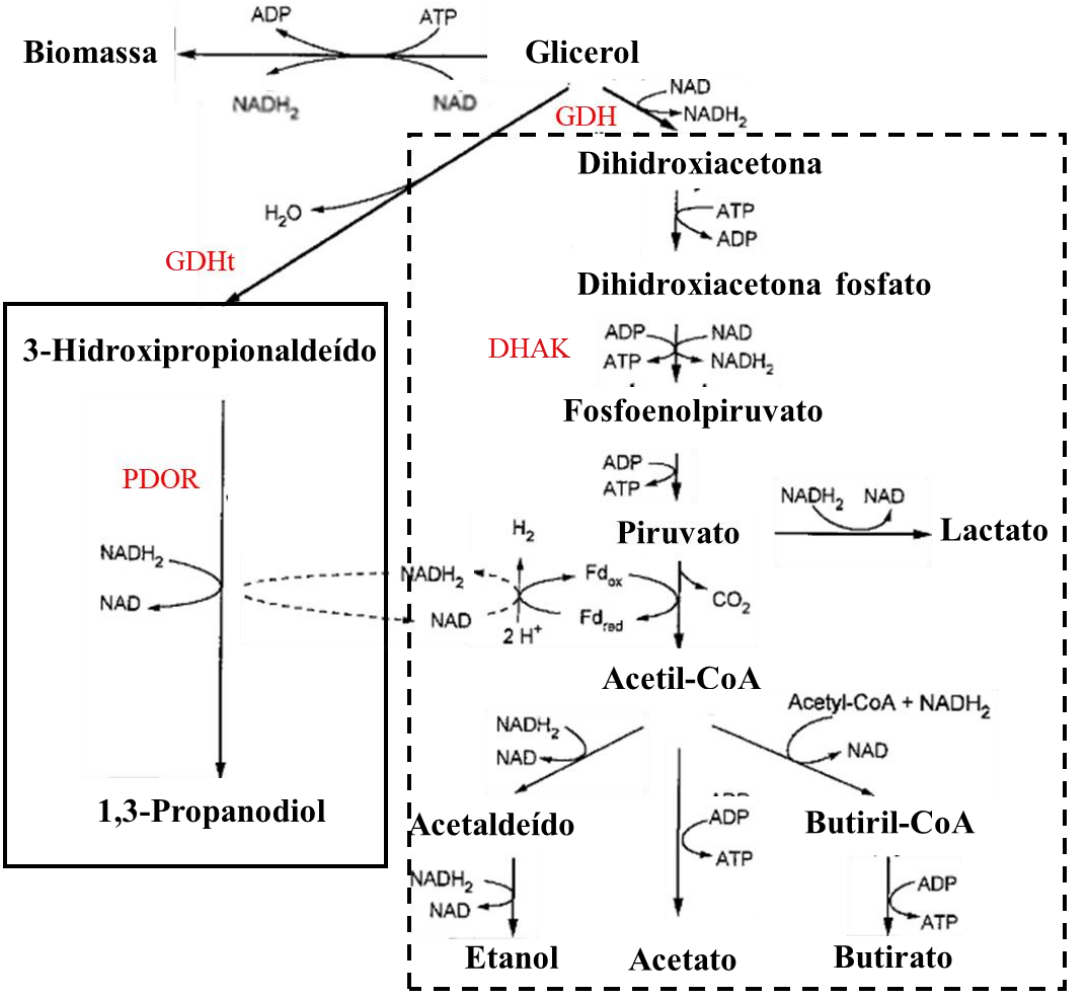

Figura 3.7 Vias metabólicas da fermentação anaeróbica de glicerol por *Clostridium butyricum* (Fonte: adaptado de ZENG, 1996). O ramo redutivo da via metabólica encontra-se em destaque representado pela linha contínua, e o ramo oxidativo, em linha tracejada.

A molécula de glicerol[1], transportada através da membrana citoplasmática por difusão passiva ou via proteína facilitadora de glicerol (glicerol permease) (DA SILVA et al., 2009), segue sua metabolização via ramificação redutiva e oxidativa (vide Figura 3.7). Na via redutiva, composta por duas etapas enzimáticas, primeiramente a molécula de glicerol sofre desidratação gerando como intermediário o composto 3-hidroxipropanaldeído (3-HPA), reação catalisada pela enzima glicerol desidratase (GDHt). Na sequência, o 3-HPA é reduzido a 1,3-PDO, através da enzima 1,3-propanodiol oxidoredutase (PDOR), dependente de $NADH_2$ como poder redutor (ZENG, 1996; KAUR et al, 2012).

[1] Normalmente, somente 5% do glicerol é utilizado para a produção de biomassa, quando o mesmo é a única fonte de carbono (Sabra et al., 2015).

Por outro lado, em se tratando de via oxidativa, ocorre a reação de desidrogenação da molécula de glicerol a dihidroxiacetona (DHA) por glicerol desidrogenase (GDH), enzima que necessita de NAD^+ para executar a sua função de desidrogenação. Este por sua vez, é convertido a fosfoenolpiruvato (PEP) através da enzima dihidroxiacetona fosfato quinase, liberando então na reação uma molécula de $NADH_2$. PEP, finalmente é convertido a piruvato, sendo este último direcionado a produção de vários ácidos orgânicos, dentre eles o acético, o butírico e o lático (SABRA et al., 2015; ZENG, 1996). Além da capacidade de gerar poder redutor, o ramo oxidativo é responsável pela geração de energia, sendo essa energia gerada pela molécula de ATP (KUBIAK et al. 2012).

A primeira enzima da fermentação do glicerol pela ramificação redutiva, GDHt (glicerol desidratase) requer adenosilcobalamina. Por um mecanismo envolvendo radicais livres, adenosilcobalamina tem a capacidade de remover uma molécula de água do glicerol a fim de gerar o intermediário 3-HPA. GDHt sofre um mecanismo de inativação pelo glicerol durante a catálise. A inativação por glicerol foi demonstrada e descrita através da clivagem irreversível da ligação Co-C da coenzima B_{12}, formando 5'-desoxiadenosina e uma espécie de cobalamina. A inativação irreversível da enzima se dá devido a sua forte ligação com a coenzima modificada. Haloenzima de GDHt também sofre inativação por O_2, e na ausência de substrato, a formação de OH-Cbl após inativação indica que esta é causada pela reação da ligação ativa Co-C da coenzima com O_2. GDHt em células permeabilizadas (*in situ*) de *K. pneumoniae* sofre reativação rápida por troca da coenzima modificada para adenosilcobalamina intacta na presença de ATP e de Mg^{2+} ou Mn^{2+} (SAXENA et al. 2009).

A segunda enzima do metabolismo de glicerol via redução, é a PDOR, que catalisa a transferência de equivalente redutor do $NADH_2$ para o 3-HPA, promovendo a formação de 1,3-PDO. Essa enzima foi sintetizada por *L. brevis* e *L.buchneri* durante a co-fermentação de glicerol e açúcar e observou-se que a mesma necessita de íon Mn^{2+}como cofator, sendo-a um octâmero com massa molecular igual a 350 kDa (SAXENA et al. 2009). Malaoui e Marczak (2000) em seus estudos também afirmam que a enzima PDOR necessita somente de Mn^{2+} para completa atividade junto ao metabolismo de 1,3-PDO. Ainda, Barbirato et al. (1996) purificaram PDOR a partir de *E. agglomerans* CNCM 1210 e observaram que a enzima tem atividade enzimática ótima em pH 7-8 e é inibida de forma competitiva por NAD^+. Quando a enzima foi testada como uma hidrogenase, o substrato preferido foi o 3-HPA.

Barbirato et al. (1996) relataram que a acumulação do 3-HPA tem a capacidade de inibir a metabolização do glicerol e o crescimento celular devido a toxicidade da molécula de 3-HPA

à célula. Valores de 12,45 mM de 3-HPA provocam a inativação da enzima glicerol desidratase que, por consequência, diminuem a atividade de 1,3-PDO oxidoredutase (ZHENG et al. 2008).

Abbad-Andaloussi e colaboradores (1996) reportaram que a enzima glicerol desidratase impede a acumulação intracelular de 3-HPA, dado que, esse é um metabólito tóxico à célula. Por isso, a importância de ter uma elevada atividade da enzima PDOR com o objetivo de aumentar a produção de 1,3-PDO. De acordo com os autores, a reação catalisada pela enzima glicerol desidratase é apontada como ponto de controle desta via metabólica, isso porque quando há excesso de $NADH_2$ e baixa atividade dessa enzima ocorre a diminuição da atividade de 1,3-PDO desidrogenase.

O papel fisiológico da ramificação redutiva é regenerar o equivalente redutor, por exemplo, a molécula de nicotinamida adenosina dinucleotídeo - $NADH_2$. A regeneração de nicotinamida adenosina dinucleotídeo oxidada (NAD^+) requer a formação de um produto final de maior poder redutor, como o 1,3-PDO, que tem o papel de aceptor final de elétrons (GUNGORMUSLER-YIILMAZ et al., 2014; ZENG, 1996). Diante disso, é possível prever que o fluxo de carbono através do ramo redutor é regulado também pela disponibilidade de $NADH_2$ intracelular.

Diante da Figura 3.7 é possível notar que na ramificação oxidativa da via de metabolização de glicerol por *C. butyricum* (destacada em linha tracejada da Figura 3.7), o piruvato pode ser convertido em diferentes subprodutos, tais como ácido acético, ácido butírico, ácido lático, etanol, H_2 e CO_2. Segundo Zeng (1996), em condições normais de cultivo os principais produtos da fermentação do piruvato são ácido acético e ácido butírico. Para a produção de 1,3-PDO a via de formação de ácido acético como subproduto é sinalizada como a mais atrativa, sendo o rendimento de formação do produto 30% mais elevado quando o mesmo é formado na ausência de ácido butírico.

Conforme Zeng (1996), as estequiometrias para obtenção de biomassa, ácido acético, ácido butírico e 1,3-propanodiol por *Clostridium* spp. a partir de glicerol, podem ser descritas de acordo com as reações bioquímicas seguintes:

1) Crescimento celular

$$4\ C_3H_8O_3 + 3\ NH_3 + 35\ ATP \rightarrow 3\ C_4H_7O_2N + 4\ NADH_2 + 6\ H_2O$$

2) Produção de ácido acético

$$C_3H_8O_3 \rightarrow C_2H_4O_2 + 2\ NADH_2 + 2\ ATP + CO_2 + H_2 + H_2O$$

3) Produção de ácido butírico

$2\ C_3H_8O_3 \rightarrow C_4H_8O_2 + 3\ ATP + 2\ CO_2 + 2\ H_2$

4) Produção de 1,3-propanodiol

$C_3H_8O_3 + NADH_2 \rightarrow C_3H_8O_2 + H_2O$

Zeng (1996) estudou a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol por *C. butyricum* e descreveu que o rendimento teórico máximo de 1,3-PDO, na presença de ácido acético e ausência de butírico, é de 0,72 mol PDO/mol glicerol, ou seja 0,60 g 1,3-PDO/g glicerol. Caso não haja produção de ácido butírico e a produção de H_2 seja máxima, esse rendimento teórico diminui para 0,65 mol PDO/mol glicerol. Já, ao abordar o rendimento máximo teórico na presença de ácido butírico e H_2 o rendimento é de 0,50 mol PDO/mol glicerol. Além disso, vale salientar que a partir da degradação de um substrato específico os rendimentos e produtividades desejados de um bioprocesso só são alcançados se o ganho de ATP e a eficiência termodinâmica do sistema forem favorecidas.

Teoricamente, a formação de ácido acético gera 2 mols $NADH_2$ /mol ácido formado. Já, a síntese dos ácidos butírico e lático resulta em 1 mol $NADH_2$ /mol ácido formado, logo considera-se que a produção desses últimos ácidos citados, butírico e lático, gera uma menor oferta de $NADH_2$ (SABRA et al., 2015). Através das reações bioquímicas e identificando que o ácido butírico compete com o 1,3-PDO por $NADH_2$ durante sua biossíntese, é possível entender o motivo pelo qual o ácido acético é sinalizado como subproduto mais atraente para a produção de 1,3-PDO. (ZENG, 1996).

Ademais, os pesquisadores que se dedicam ao estudo da produção de 1,3-PDO através de processos fermentativos apontam que a quantidade de H_2 molecular liberado pela célula também tem influência sobre o rendimento do bioprocesso. H_2 é um produto da reoxidação da enzima piruvato-ferredoxina-oxirredutase (PFOR), proteína com centro ferro-enxofre[2]. Essa reação, gera ferredoxina reduzida, que age como doador de elétrons para reduzir NAD^+ a $NADH_2$, com a produção de gás H_2. Gungormusler-Yilmaz et al. (2014) mediram a concentração de H_2 liberado quando células de *C. butyricum* DSM 10702 cresceram em diferentes concentrações de glicerol, e os dados experimentais mostraram que na presença de H_2 a produção de ácido butírico foi significativamente mais alta do que a de ácido acético. Ao

[2] O ferro é um mineral importante, visto que a conversão de piruvato a acetil-CoA é feita por uma enzima ferredoxina-oxirredutase (Lee et al., 2008).

aumentar a evolução de H_2, aumenta-se, consequentemente, a produção de $NADH_2$, caso não haja quantidade suficiente de 3-HPA para ser convertido em 1,3-PDO, ou quando a enzima PDOR está com sua atividade incompleta, como por exemplo, a limitação devida a falta de nutrientes no meio de cultivo, esse $NADH_2$ será desviado para a produção de ácido butírico. Dentro da maquinaria celular, o desvio para a produção de ácido butírico é ocasionado com o intuito da célula manter o balanço redox. Logo, segundo Zeng (1996) esse resultado pode ser evitado com a manutenção de NAD^+/NADH intracelular.

A literatura vem reportando que a razão entre as concentrações de ácido acético e butírico (acético:butírico) afeta diretamente a produção de 1,3-PDO, sendo este parâmetro dependente das condições ambientais, dentre elas, pH, concentração de substrato e concentração de demais nutrientes. Gungormusler-Yilmaz et al. (2014) afirmam que a variação da razão acético:butírico pode indicar alterações nos níveis de crescimento microbiano, sendo o parâmetro utilizado para sinalizar o *status* do metabolismo da célula.

A produção de 1,3-PDO e o seu rendimento a partir da metabolização do glicerol pode ser melhorado utilizando ferramentas da engenharia genética e metabólica. Esses sistemas apresentam várias vantagens de produção biológica, taxa reacional, taxa de conversão de produtos, tolerância a substratos ou produtos tóxicos, superando desta forma um dos gargalos dos processos fermentativos (SAXENA et al. 2009). No entanto, o custo das técnicas de engenharia genética e a necessidade de profissionais altamente qualificados, aliado a alta tecnologia necessária para a obtenção de microrganismos modificados geneticamente estáveis nas condições da fermentação, algumas vezes, limitam ou até mesmo restringem o uso de tais sistemas em escala industrial.

Conforme citação de Biebl (2001) a taxa com que os metabólitos são produzidos em um bioprocesso depende diretamente das condições nutricionais e, também, dos parâmetros operacionais. Com o propósito de melhorar o desempenho do metabolismo celular de glicerol direcionando-o para maiores rendimentos no diol de interesse, diversos estudos sobre a influência da concentração e composição dos nutrientes do meio de cultivo, estudos de inibição pela concentração de substrato, produto principal e subprodutos e estratégias operacionais vem sendo discutidos ao longo dos últimos anos. No âmbito desta abordagem, serão apresentadas a seguir as questões pertinentes e primordiais sobre o assunto.

3.6 Influência das condições de cultivo diante a biossíntese de 1,3-PDO

Processos biotecnológicos são particularmente atrativos, uma vez que são passíveis do uso de matérias-primas renováveis e reduzem a produção de subprodutos tóxicos ao meio ambiente. No entanto, a fim de conduzir uma fermentação com desempenho satisfatório é necessário analisar os aspectos intrínsecos ao processo, visto que em todo sistema biológico existem as limitações peculiares de um sistema vivo.

O processo industrial de fermentação de 1,3-PDO leva a exposição do microrganismo a estresses químicos que podem vir a influenciar diretamente o crescimento celular e os fluxos metabólicos. Neste contexto, a fim de entender melhor a dinâmica do bioprocesso em questão abordaremos algumas questões nutricionais e operacionais da metabolização do glicerol por *C. butyricum*, com o propósito de melhorar a produtividade do diol de interesse.

3.6.1 Inibição metabólica pela concentração de substrato

O efeito inibitório da molécula de glicerol pode ser descrito principalmente com respeito à sua ação sobre as enzimas da via de formação do 1,3-PDO, particularmente a enzima que tem a função de converter o glicerol a 3-HPA, GDHt. A inativação de GDHt pela presença de glicerol é baseada na clivagem irreversível da ligação Co-C da coenzima ligada à enzima. Além disso, esse efeito inibitório também pode ser atribuído ao fato de altas concentrações de glicerol causarem uma modificação no arranjo da membrana celular, alterando sua permeabilidade e limitando a entrada de nutrientes (KAUR et al. 2012).

Em estudos preliminares realizados com a cepa *C. butyricum* NCIMB 8082 (cepa utilizada no presente trabalho) cultivadas em frasco de soro, foi observado que para uma faixa de concentração inicial de glicerina bruta variando de 25 $g.L^{-1}$ a 125 $g.L^{-1}$, a concentração de biomassa apresentou comportamento similar. Se considerar a glicerina bruta contendo aproximadamente 80% m/m de glicerol, a faixa estudada representa 12,5 a 100,0 $g.L^{-1}$ de glicerol. Esse fenômeno traduz como resultado que, na faixa de concentração estudada, a cepa não sofre inibição metabólica causada pela presença dessa fonte de carbono (RIBEIRO et al., 2016). A espécie *C. butyricum* F2b também apresentou-se tolerante a altas concentrações de glicerol, demonstrando crescimento celular e produção de 1,3-PDO significativos quando submetida a meio de cultivo com concentração inicial de 90 $g.L^{-1}$ de glicerol. No estudo foi

utilizada como fonte de carbono a glicerina proveniente do processo de produção de biodiesel contendo 65% m/m de glicerol (PAPANIKOLAOU et al., 2000).

No estudo de Zhu et al. (2016), um modelo cinético foi proposto com a finalidade de estudar o efeito de diferentes condições da fermentação sobre o comportamento cinético de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* M01. A partir da estimativa do parâmetro C_S (concentração crítica do substrato para o qual o crescimento celular é completamente inibido), determinado pelo modelo cinético, foi possível notar que o valor da concentração crítica de glicerol sensível a inibição foi igual a 80 $g.L^{-1}$.

Szymanowska-Powałowska (2014) realizou experimentos utilizando a cepa *Clostridium butyricum* DSP1 em reator com volume útil de 2 L, controle de pH em 7,0 e concentrações iniciais de glicerina bruta variando de 50 a 170 $g.L^{-1}$. Neste estudo, foi observado que a cepa demonstrou inibição metabólica a partir de 110 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta no meio de cultivo.

Kubiak et al. (2012) relataram que concentração inicial de glicerol ótima para a fermentação de 1,3-PDO por *C. butyricum* é 20 $g.L^{-1}$. No trabalho de Gungormusler-Yilmaz et al. (2014) foi observado que a taxa de consumo de glicerol foi mais alta ao trabalhar com uma corrente de alimentação contendo uma concentração de glicerol considerada baixa ($\leq$ 20 $g.L^{-1}$), fato esse que vem corroborar os resultados obtidos por Kubiak et al em 2012.

É válido salientar que mudanças observadas no crescimento celular, em meio de cultivo contendo altas concentrações de glicerol, pode ser explicada pela condição de estresse ambiental. Diante de meio de cultivo contendo elementos em altas concentrações, o estresse é causado pela elevação da pressão osmótica imposta pela concentração de solutos no meio de fermentação.

3.6.2 Inibição metabólica pela concentração de produtos

A toxicidade de metabólitos produzidos pelos microrganismos pode ser a nível intracelular ou extracelular. Por isso, o efeito de vários produtos finais sintetizados durante a degradação oxidativa de glicerol por *C. butyricum*, ou adicionados externamente ao meio de cultivo possuem concentrações críticas diferentes (BARBIRATO et al., 1996; COLIN et al., 2000). É necessário levar em consideração que o efeito da inibição provocado pelas altas concentrações do produto adicionado de uma única vez ao meio de cultivo é, na grande maioria dos casos, mais severo em comparação com a condição de acumulo gradativo, à medida que

vai sendo sintetizado pelas células (COLIN et al., 2010). A acumulação gradativa do produto gerado permite que a célula seja submetida à evolução adaptativa, fenômeno biológico no qual a população se molda segundo as pressões impostas pelas interações bióticas ou abióticas entre os organismos e o meio extracelular.

1,3-PDO produzido pela fermentação do glicerol por *Clostridium* spp é um metabólito tóxico, sendo a concentração crítica tolerada por estirpes selvagens em torno de 60 $g.L^{-1}$ a 80 $g.L^{-1}$. Colin e colaboradores (2000) avaliaram o efeito da adição externa e da síntese biológica de 1,3-PDO sobre o crescimento do microrganismo. Os autores concluíram que células da cepa *C. butyricum* CNCM 1211 têm maior resistência a altas concentrações de 1,3-PDO sintetizado (~84 $g.L^{-1}$) do que ao produto adicionado ao meio de fermentação (65 $g.L^{-1}$).

Chatzifragkou e Papanikolaou (2011) estudaram o efeito da tolerância máxima de 1,3-PDO quando testes foram realizados em batelada e batelada alimentada contínua utilizando culturas de *C. butyricum* VPI 1718. Os resultados obtidos mostraram que o metabolismo da cepa estudada foi completamente inibido quando as células foram crescidas em concentrações de 1,3-PDO na faixa de 70 $g.L^{-1}$.

Wilkens et al. (2012) isolaram duas estirpes de *C. butyricum* codificadas por AKR91b e AKR102a, espécies capazes de crescer e sintetizar 1,3-PDO em um meio de cultivo contendo uma concentração inicial de 1,3-PDO igual a 60 $g.L^{-1}$. Neste estudo, foi observado que *C. butyricum* AKR102a cresceu até uma concentração limite de 1,3-PDO de 77 $g.L^{-1}$. Logo, percebe-se a cepa foi capaz de crescer em um meio de cultivo contendo 1,3-PDO inicialmente e, ainda, produziu 17 $g.L^{-1}$, no entanto, a produção foi limitada pela concentração de produto no meio de cultivo.

A cepa de *C. butyricum* utilizada nesta pesquisa, quando crescida em diferentes concentrações iniciais de 1,3-PDO (adicionado ao meio de cultivo), apresentou inibição do metabolismo celular em concentrações de 1,3-PDO próximas de 32 $g.L^{-1}$ (RIBEIRO et al., 2016).

Um estudo publicado por Biebl (2001) reportou que concentrações de ácido acético, ácido butírico e 1,3-PDO a partir de 27 $g.L^{-1}$, 19 $g.L^{-1}$ e 60 $g.L^{-1}$, respectivamente, foram inibitórias para a espécie de *C. butyricum* em questão. Por outro lado, em se tratando de ácido acético, Colin et al (2000) testaram seu efeito na fermentação do glicerol usando *C. butyricum* e, com a adição de 12,2 $g.L^{-1}$ de ácido acético ao meio de cultivo, observaram um aumento de 45% no valor de $\mu_{máx}$ (taxa específica máxima de crescimento) e de 18% na concentração final

de células. Entretanto, o rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido foi afetado neste estudo. Heyndrickx et al. (1991) sugerem que o acetato age como receptor de elétrons durante as fases iniciais da fermentação, competindo com o butirato, fato esse que explica a diminuição do rendimento em termos de 1,3-PDO.

A inibição da fermentação devido à presença de 1,3-PDO e os ácidos orgânicos gerados por meio da via de metabolização de glicerol, segundo relatos da literatura, resulta não apenas de um aumento da concentração de íons H^+ em torno da célula, mas também na penetração desses ácidos e sua dissociação intracelular (GUNGORMUSLER-YILMAZ et al. 2014). Outrossim, a presença dos produtos em alta concentração pode ocasionar inibição das proteínas de membrana, como a ATPase, e influenciar, também, nos mecanismos de transporte (KAUR et al., 2012).

Diante deste estudo bibliográfico foi possível observar a importância de contornar os efeitos de inibição metabólica causadas por 1,3-PDO, ácidos orgânicos produzidos e por altas concentrações de substrato. Todavia, as características de cada estirpe em conjunto com as diversas condições de cultivo proporcionam respostas celulares distintas à presença dessas moléculas inibidoras.

3.6.3 Influência do pH

Assim como a concentração inicial de substrato e a temperatura da fermentação, o pH é uma variável que demanda um controle rigoroso. Isso porque no decorrer da metabolização da molécula de glicerol por *Clostridium spp*. tem-se a produção de ácidos, metabólitos que alteram significativamente o pH do meio de fermentação (TEE et al., 2017). A falta de um adequado e confiável controle de pH afeta diretamente o rendimento do cultivo, pois ocasiona uma mudança do fluxo metabólico e geração de produtos indesejáveis, ou ainda, a perda de viabilidade celular.

No estudo de Zhu et al. (2016), investigou-se a influência da variação de pH em relação a produtividade de 1,3-PDO por *C. butyricum*. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa ao trabalhar com o pH igual a 6,5 e 7,0. Contudo, quando a variável foi ajustada para 7,5 os estudos revelaram que a fermentação foi negativamente afetada, sendo a produtividade diminuída de 2,50 $g.L^{-1}.h^{-1}$, em pH 7,0, para 2,12 $g.L^{-1}.h^{-1}$, em pH 7,5. Além disso, a concentração de ácido butírico aumentou significativamente de 6,90 $g.L^{-1}$ para 8,50 $g.L^{-1}$.

Ao trabalhar com diferentes valores de pH do meio de cultivo, Zeng (1994) descreveu que em pH igual a 7,5 os resultados apresentaram performance negativa, em comparação ao pH de 6,5 e 7,0. Em pH 7,5 houve uma diminuição do valor de $\mu_{máx}$. O autor afirma que uma provável razão do fenômeno é a inibição da atividade das enzimas envolvidas no crescimento da célula com o aumento do pH. Geralmente, o pH é um fator que influencia diretamente a atividade enzimática, sendo a constante de dissociação da enzima (Km) muito maior em pH 6,5 e 7,5, sinalizando que a assimilação do glicerol foi muito mais difícil nesses dois valores de pH. No estudo de Zeng (1994), a célula só trabalhou no seu estado de plena atividade, definido pelo autor de estado ótimo, com o pH do meio de cultivo ajustado para o pH neutro.

O controle automático de pH quando o bioprocesso é realizado em escala de reator apresentou-se como uma variável crucial para a fermentação de bactérias capazes de produzir 1,3-PDO a partir de glicerina bruta (GUNGORMUSLER-YILMAZ et al, 2014). No decorrer da metabolização de glicerol quando se trabalhou na ausência de controle de pH, o pH do meio de cultivo alcançou valores mais baixos do que as constantes de dissociação de acetato (pKa=4,76) e butirato (pKa=4,80), o que resultou na forma não dissociada dos ácidos em equilíbrio. Consequentemente, os ácidos não dissociados são difundidos através da membrana para dentro da célula e dissociados na região intracelular. As espécies aniônicas dos ácidos são incapazes de atravessar a membrana celular, permanecendo assim nos fluidos intracelular. Logo os íons H^+ devem ser removidos por bombas de prótons e uma grande quantidade de energia é utilizada para a manutenção do pH interno da célula. Como resultado, tem-se a fermentação inibida e a produção de 1,3-PDO interrompida (TEE et al., 2017). Colin et al. (2000) também relataram que ácido acético e butírico não dissociados proporcionaram uma redução na biomassa do sistema e na produção do diol, respectivamente.

Segundo Barbirato et al. (1996), o pH do meio de cultivo também influencia a acumulação de 3-HPA, que conforme relatado é um intermediário que provoca toxicidade a nível celular. Ao estudar a produção de 1,3-PDO por fermentação em pH 6,0, os autores observaram a acumulação de 3-HPA seguida pela diminuição da atividade biológica da população de *Enterobacter agglomerans*.

A grande maioria dos pesquisadores com o propósito de minimizar as variações de pH ao longo do bioprocesso trabalham com meio de cultivo contendo tampão fosfato. Contudo, a utilização de um tampão para controle de pH é uma alternativa viável particularmente quando a fermentação é realizada em frascos agitados (TEE et al., 2017). Em reatores, o ajuste de pH é normalmente feito com a adição de ácidos ou bases, existindo neste caso o risco de diluição do

meio de fermentação, alterando consequentemente, o fator de diluição do experimento – parâmetro que deve ser considerado nas fermentações.

Na tentativa de minimizar os efeitos de diluição e controlar efetivamente o pH da fermentação, um reagente de baixo custo e fácil manipulação que vem sendo utilizado é o carbonato de cálcio (AI et al., 2014). No decorrer de um *screening* realizado com *Clostridium diolis* 15410, 1,0 $g.L^{-1}$ de carbonato de cálcio foi usado com a função de tamponar o meio de cultivo. A adição de $CaCO_3$ manteve o pH dos meios de cultivos em um intervalo de 5 a 9, mesmo quando adicionado em excesso. O excesso de $CaCO_3$ não conduzirá ao aumento do pH, mas sim ao aumento da capacidade tamponante à medida que os ácidos vão se formando (AI et al. 2014).

Tee et al (2017) trabalharam com a adição de $CaCO_3$ como controlador de pH em um cultivo utilizando *C. butyricum* JKT37 como biocatalisador para a produção de 1,3-PDO. Como resultados, o grupo de pesquisa verificou que a concentração ótima de $CaCO_3$ nas condições do estudo e sem afetar o rendimento da fermentação, atingiu a faixa de 15 $g.L^{-1}$ $CaCO_3$. No estudo de Tee et al (2017) o rendimento da fermentação contendo a adição de $CaCO_3$ como agente tamponante foi similar ao experimento em reator, sendo que no experimento em reator trabalhou-se somente com a adição de base como agente controlador do pH do meio de cultivo.

A adição de soluções de base e/ou ácido para manutenção do pH, quando se trabalha em reator, pode ser uma variável que altera o fator de diluição da fermentação e pode tornar-se uma questão-problema para o processo fermentativo. Sendo assim, a adição do reagente $CaCO_3$ pode ser, na prática, um agente de manobra para as questões relacionadas as variações de pH.

3.6.5 Estratégias operacionais de condução de processo

Na seleção de uma cepa capaz de produzir o metabólito de interesse, 1,3-PDO, deve-se levar em consideração não só características vitais, tais como resistência a pressões osmóticas, estresse mecânico ou manutenção de capacidade de crescimento sob as condições de escala industrial. Mas também, é importante considerar e garantir a execução do bioprocesso levando em consideração os custos operacionais de produção. A escolha de uma condição ideal de fermentação é principalmente determinada pelo custo do meio de fermentação, incluindo principalmente os substratos. Além disso, segundo Szymanowska-Powalowska (2015) as condições relativas a cinéticas da fermentação, dentre elas produtividade, rendimento e

seletividade são parâmetros chaves e determinantes na seleção da metodologia adequada para um bioprocesso.

Diferentes modos operacionais em reatores, incluindo batelada, batelada alimentada, batelada repetida e sistema contínuo têm sido investigados na conversão da molécula de glicerol a 1,3-PDO via fermentação anaeróbica.

Comparando a estratégia desenvolvida em batelada simples e batelada alimentada, a batelada simples é a operação mais implementada no estudo de seleção de novas estirpes, sendo tratada como uma ferramenta de investigação primária. Já, a aplicação da batelada alimentada fornece uma estratégia ideal auxiliando na regulação da taxa de alimentação de nutrientes, assegurando a disponibilidade adequada de substrato. A batelada alimentada minimiza o fenômeno de inibição resultante da adição de altas concentrações do substrato (KAUR et al. 2012; LEE et al., 2015; SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2014). Nesta condição, altas concentrações de nutrientes podem ser convertida no produto de interesse, sem a preocupação com a inibição causada pela elevada pressão osmótica do meio de cultivo. Diferentes estratégias de alimentação podem ser estudadas: adição intermitente de substrato (SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2014), alimentação de substrato acoplada ao consumo de base (KAUR et al., 2012), alimentação por pulsos (CHATZIFRAGKOU et al., 2011) dentre outras.

A batelada repetida é uma opção empregada em uma variedade de aplicações biotecnológicas industriais, suas principais vantagens incluem o uso de um único fermentador, não há a limitação de volume relacionada a capacidade do reator, além disso, elimina o estresse osmótico e a inibição por concentrações de produto. O estudo de Szymanowska-Powalowska (2014) empregou três ciclos de batelada repetida em um cultivo de *C. butyricum* DSP1 para a produção do 1,3-PDO. A produção final de 1,3-PDO foi de 62 $g.L^{-1}$ e a produtividade máxima, alcançada durante o segundo ciclo, foi de 1,68 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Esse trabalho emprega uma estratégia de fermentação interessante, isso porque a mesma evita a fase de adaptação do microrganismo e elimina a etapa de crescimento de inóculo, reduzindo assim o tempo de fermentação (SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2014). Chatzifragkou e Aggelis (2011) também avaliaram o processo em batelada repetida utilizando glicerina bruta e *C. butyricum* VPI 1718, entretanto, adicionaram hidrolisado de farinha de colza como meio de cultivo sintético. No quarto ciclo do experimento, a concentração de 1,3-PDO foi de 65,5 $g.L^{-1}$ e a produtividade total de 1,15 $g.L^{-1}.h^{-1}$.

O processo contínuo é, predominantemente, o mais interessante quando os estudos já estão em um estágio mais avançado. A produtividade ao trabalhar com o sistema contínuo é

mais elevada, quando comparada com o processo em batelada e batelada alimentada, visto que o modo contínuo diminui as inibições inerentes as altas concentrações de substrato e/ou produto (LUO, et al,, 2016). Estudos na literatura vem demostrando que a produtividade é aumentada por um fator de quatro (4x) quando o processo contínuo é conduzido conjuntamente com reciclo de células (SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2014).

A Tabela 3.3 demonstra os resultados mais representativos da literatura que tratam da metabolização de glicerina bruta a 1,3-PDO por *C. butyricum* em diferentes estratégias operacionais.

Tabela 3.3 Parâmetros cinéticos da produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta utilizando *C. butyricum* em diferentes estratégias operacionais.

Estratégia	Espécie	Substrato (% glicerol)	1,3-PDO ($g.L^{-1}$)	$Y_{1,3\text{-}PDO}$ ($g.g^{-1}$)	Q ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Referências
Batelada	*C. butyricum* F2b	65	47,1	0,53	1,12	(PAPANIKOLAOU et al., 2008)
	C. butyricum CNCM1211	65	63,4	0,57	1,85	(BARBIRATO et al, 1998)
Batelada alimentada	*C. butyricum* AKR102	55	76,2	0,51	2,30	(WILKENS et al., 2012b)
	C. butyricum VPI1718	81	67,9	0,55	0,78	(CHATZIFRAGKOU et al., 2014)
	Clostridium sp IK124	ND	80,1	0,56	1,80	(*apud* CHATZIFRAGKOU et al., 2014)
	C. butyricum DSP1	85,6	54,2	0,54	1,55	(SZYMANOWSKA-POWALOWSKA 2014)
Contínuo	*C. butyricum* F2b	65	41-46	0,53	3,40	(PAPANIKOLAOU et al. 2000)
	C. butyricum VPI 3266	65	31,5	0,50	3,15	(GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2004)
Batelada repetida	*C. butyricum* VPI1718	81	65,5	0,52	1,15	(CHATZIFRAGKOU et al. 2014)
	C. butyricum DSP1	85,6	62	0,53	0,76	(SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2014)

Substrato - % de glicerol encontrado na glicerina bruta utilizada, 1,3-PDO – concentração final de 1,3-PDO, $Y_{1,3\text{-}PDO}$ - rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido, Q -produtividade de 1,3-PDO.

Fonte: adaptado de LUO et al., 2016; SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2014).

Diante dos resultados publicados na literatura, a maior produtividade volumétrica de 1,3-PDO alcançada foi de 3,40 $g.L^{-1}.h^{-1}$. A metabolização de glicerina bruta a 1,3-PDO foi conduzida pela implementação do processo em modo contínuo a partir de estirpe de *C. butyricum* F2b. Ainda, vale ressaltar que essa alta produtividade foi alcançada utilizando um meio de cultivo complexo contendo 15 componentes: K_2HPO_4 1 $g.L^{-1}$, KH_2PO_4 0.5 $g.L^{-1}$, extrato de levedo 1,0 $g.L^{-1,}$ $MgSO_4.7H_2O$ 0,2 $g.L^{-1}$, $(NH_4)_2SO_4$ 2,0 $g.L^{-1}$ $CaCl_2$ 15,0 $mg.L^{-1}$, $FeSO_4.7H_2O$ 5$mg.L^{-1}$ e solução de micro-minerais SL7 2,0 $mL.L^{-1}$. A solução SL7 contém: $ZnCl_2$ 70,0 $mg.L^{-1}$, $MnCl_2.4H_2O$ 100,0 $mg.L^{-1}$, H_3BO_3 60,0 $mg.L^{-1}$, $CoCl_2.2H_2O$ 200,0 $mg.L^{-1}$, $CuCl_2.2H_2O$ 20,0 $mg.L^{-1}$, $NiCl_2.6H_2O$ 25,0 $mg.L^{-1}$, Na_2MoO_4 $.2H_2O$ 35,0 $mg.L^{-1}$, HCl 37% 0,9 $mL.L^{-1}$ (PAPANIKOLAOU et al., 2000).

Para as aplicações industriais, o emprego de células imobilizadas oferece vantagens adicionais as demais estratégias de operação. O uso de metodologias com células imobilizadas apresenta *performance* satisfatória ao serem aplicadas nos processos biotecnológicos, uma vez que podem ser utilizadas repetidamente para a produção da molécula desejada, sendo as células facilmente removidas do meio de produção. A aplicação de células imobilizadas em sistemas contínuos pode aumentar a produtividade em até 10 vezes, quando comparado ao sistema empregando células livres (SAXENA et al. 2009). No caso da produção de 1,3-PDO usando células imobilizadas ainda existem poucos trabalhos na literatura. No entanto, ao analisar o estudo de Veras et al., (2019) nota-se um aumento expressivo e significativo da produtividade em comparação com os dados da Tabela 3.3. Veras et al. (2019), ao trabalharem com consórcio microbiano em meio de cultivo contendo glicerol P.A, biorreator UASB ("*Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*" - Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente) em processo contínuo e biomassa suportada em mangueira de silicone, obtiveram como resultado uma produtividade de 1,3-PDO de 7,5 $g.L^{-1}.h^{-1}$.

3.7 Aspectos mercadológicos

Historicamente, 1,3-PDO é um produto que apresenta propriedades desejáveis como, solvente, humectante, emoliente, anticongelante (KAUR et al, 2012). Produtos obtidos pela polimerização de 1,3-propanodiol são caracterizados por uma boa biodegradabilidade, uma melhor especificidade e maior segurança industrial, do que os produzidos a partir de 1,2-propanodiol, etilenoglicol ou butanodiol (SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2014).

A produção comercial de PTT iniciou-se por volta de 1995 com as empresas Shell e DuPont. Contudo, a capacidade de produção das fibras de PTT depende da disponibilidade do monômero 1,3-PDO, já que o outro monômero, o ácido tereftálico, já é comercializado em grandes escalas há décadas.

Inicialmente, a empresa DuPont produzia o monômero 1,3-PDO a partir da hidratação da acroleína. Por outro lado, a empresa a Shell trabalhava com a reação da hidroformilação do óxido de etileno para a produção deste monômero. O processo a partir da acroleína apresenta menor custo de capital, mas um custo muito alto com a matéria-prima. Embora ambos os processos sejam comerciais, a via a partir da hidroformilação do óxido de etileno gerava um produto final mais competitivo no mercado (SRI CONSULTING, 2000).

Em novembro de 2006 surgiu um novo *player* no mercado de 1,3-PDO, sendo denominada de DuPont Tate & Lyle BioProducts (DTL), uma *join venture* entre DuPont e Tate & Lyle. A DTL iniciou a produção de 1,3-propanodiol por uma rota biotecnológica denominada Bio-PDO *process*, na qual sintetizaria o produto comercialmente denominado de Bio-PDO™. A empresa é pioneira na fabricação de 1,3-PDO a partir de matéria prima renovável. A unidade de produção do Bio-PDO™ custou 100 milhões de dólares e foi instalada em Loudon, uma cidade do estado norte americano do Tennessee, apresentando capacidade de 45.000 toneladas por ano. Em maio de 2011, a empresa anunciou a ampliação de sua planta, e atualmente, apresenta a capacidade de 63.500 toneladas por ano. Segundo a DTL, a expansão foi impulsionada pela forte demanda do produto diante do mercado. O Bio-PDO™ é utilizado na fabricação de três marcas comerciais criadas pela *joint venture*, suas aplicações vão desde cosméticos até formulações de fluidos de perfuração e polímeros. O processo de produção do Bio-PDO™ utiliza 30% menos energia e reduz as emissões de gases de efeito estufa em 63%, ao comparar com o processo de produção do Nylon 6, produto de base não renovável. Ao comparar com a produção de Nylon 6,6 pode-se dizer que o processo da DuPont Tate & Lyle BioProducts consome 40% menos de energia e reduz as emissões de gases de efeito estufa em 56%. Os produtos gerados pela DTL são comercialmente chamados de propanodiol Zemea®, propanodiol Susterra® e o polímero Sorona® (DUPONT, 2019).

O propanodiol Zemea® é um ingrediente de base renovável, alto nível de pureza e que não causa irritação à pele utilizado principalmente em formulações cosméticas e de cuidados pessoais. Estudos vem mostrando que o Zemea® aumenta a eficácia da conservação e reduz a quantidade de conservantes necessários na formulação do produto final. Propanodiol Zemea® possui certificado de produto natural emitido pela instituição *Natural Products Association*

(NPA) e é considerado um ingrediente derivado de matéria-prima orgânica sobre as definições da ISSO 16128-1 (DUPONT, 2019).

O propanodiol Susterra® é considerado um *building block* que oferece uma alternativa não-petrolífera, sem afetar o desempenho e a qualidade do produto final de base biológica. Quando aplicado em composições de fluidos de transferência de calor pode substituir diretamente o propilenoglicol, pois funciona como um glicol seguro para processos de aquecimento e resfriamento, apresenta resultado satisfatório sobre a durabilidade e flexibilidade do produto final. (DUPONT, 2019).

A maior parte do produto Bio-PDO™ é direcionada para a produção de Sorona®, o polímero de origem renovável e alto desempenho fabricado pela empresa DTL. O seu uso é destinado majoritariamente para o desenvolvimento de fibras utilizadas em produtos da indústria de vestuário e carpete, sendo seus principais benefícios: proporcionar proteção contra manchas, suavidade e durabilidade em fibras de carpete. Na indústria de vestuário apresenta a vantagem de oferecer maciez, elasticidade, resistência aos raios ultravioleta e repetidos ciclos de lavagem. A Figura 3.8 ilustra a cadeia produtiva, desde a obtenção da matéria-prima para a produção de Bio-PDO™ até a aplicação do polímero Sorona® na fabricação do artefato final (DUPONT, 2019).

Sorona® é o resultado da reação entre o ácido tereftálico com Bio-PDO™ gerando uma produto que contém entre 20% e 37% de materiais de fontes renováveis. O produto Sorona® oferece características de moldagem e rendimento similares ao PTT de alto rendimento. Atualmente a maior compradora do produto Sorona® é a empresa Mohawk Industries, aplicando-o na indústria de carpetes residenciais (DUPONT, 2019).

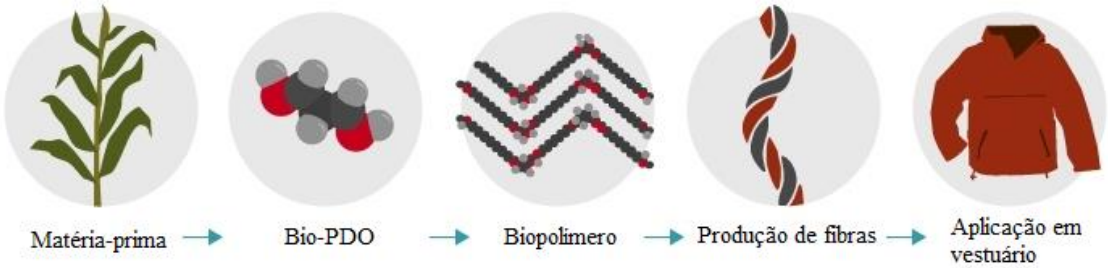

Figura 3.8 Ilustração da cadeia produtiva, desde a obtenção da matéria-prima para a produção de Bio-PDO™ até a utilização do polímero Sorona® na indústria de vestuário (Fonte: adaptado de DUPONT, 2019).

Com relação ao 1,3-PDO proveniente da indústria biotecnológica, um estudo realizado por Markets and Markets (2019) revela que, o mercado atingirá uma estimativa de 870 milhões de dólares em 2024. Ainda, de acordo com o estudo, a principal força que alavancará este crescimento de demanda é o potencial que o 1,3-PDO fabricado a partir da via fermentativa possui para se inserir no mercado de novas aplicações comerciais, além do crescimento populacional e aumento do consumo de produtos de origem biotecnológica. Tendo em vista este mercado promissor, dominado pela DTL, novas empresas já iniciaram a comercialização do produto, como a francesa METabolic Explorer, e as chinesas Zhangjiagang Glory Biomaterial Co. Ltd e Zouping Mingxing Chemical Co. Ltd (MARKETS AND MARKETS, 2019).

METabolic Explorer, uma empresa especializada no desenvolvimento e aplicação de processos bioquímicos sustentáveis, anunciou em 2010 a instalação da primeira unidade piloto de produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta, na região da Malásia. Em 2014, validou a execução do projeto de implantação e anunciou a assinatura do acordo de licença exclusiva com a SK Chemicals para a produção e comercialização de 1,3- PDO (METABOLIC EXPLORER, 2019).

A METabolic Explorer, juntamente com a sua subsidiária METEX NOOVISTA, anunciou a construção da planta de produção de 1,3-PDO e ácido butírico em Moselle. A empresa acredita que a planta entre em operação no segundo semestre de 2020 (METABOLIC EXPLORER, 2019)

Zhangjiagang Glory Biomaterial Co. está localizada no Parque Industrial da província de Jiangsu e é uma *join venture* fundada por Zhangjiagang Glória Chemical Industry Co., Ltd. e SB China Venture Capital. A empresa produz o 1,3-PDO a partir de matéria-prima renovável e possui instalações com capacidade anual de 65.000 toneladas de 1,3-PDO e 2,3 butanodiol (2,3-BDO) (ZHANGJIAGANG GLORY BIOMATERIAL, 2019).

Buscas por informações sobre a empresa Zouping Mingxing Chemical foram realizadas, no entanto, não se identificou as diretrizes da produção do intermediário 1,3-PDO pela referida empresa. Diante do *marketing* que as empresas habitualmente realizam através dos meios eletrônicos, acredita-se que a mesma não apresenta uma vertente voltada para a química verde, logo, é factível pensar que a produção não é via rota biotecnológica.

Em termos geográficos de mercado do 1,3-PDO, a América é o maior consumidor do produto, seguido pela Ásia-Pacífico, Europa, Oriente Médio e África. A região Ásia-Pacífico

registra maiores crescimentos, a expectativa é que o mercado tenha uma expansão de aproximadamente 11 vezes até o final de 2019. No mercado mundial, atualmente, 90% da produção de 1,3-PDO é destinado a produção de PTT (MARKETS AND MARKETS, 2019).

Para elucidar os preços praticados no mercado brasileiro sobre a importação de 1,3-PDO nos últimos anos, foi realizada uma pesquisa utilizando o sistema de informações do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços, denominado Comex Stat. Para realização da pesquisa foi utilizado o código NCM 29053920, relativo ao trimetilenoglicol (1,3-propanodiol). A Tabela 3.4 ilustra os preços de 1,3-PDO praticados no período de 2004 a 2018.

Tabela 3.4 Dados de valores de importação de 1,3-PDO no período de 2004 a 2018.

Ano	Peso líquido (Kg)	US$/Kg
2004	2	22,00
2005	201	41,04
2006	1	71,00
2007	0	0,00
2008	23502	2,09
2009	0	0,00
2010	401	4,27
2011	3613	6,39
2012	2215	85,25
2013	3041	11,20
2014	599	10,95
2015	1	60,00
2016	4801	5,85
2017	26	13,69
2018	56	7,39

(Fonte: ComexStat, 2019).

O 1,3-PDO importado nos anos de 2004 e 2005 foi advindo do processo executado sob a rota petroquímica, visto que a planta biotecnológica só iniciou sua operação no final de 2006. Apesar do aumento da quantidade importação de 1,3-PDO no ano de 2008 pelo mercado brasileiro, é possível verificar uma descontinuidade no volume das importações do mesmo ao longo do período compreendido entre os anos de 2008 a 2018 (Tabela 3.4). Em 2012, o preço

desse produto foi significativamente superior as demais importações realizadas, o que pode ter relação com o seu grau de pureza, por exemplo. De acordo com os dados obtidos na plataforma *on line* Comex Stat, percebe-se que existe um déficit na balança comercial com relação a esse produto, fato que está diretamente relacionado a ausência de planta brasileira de produção de 1,3-PDO.

Após exposição dos dados mercadológicos, disponibilizados por Markets and Markets (2019), observa-se que o mercado mundial de 1,3-PDO tende a alavancar. Esse cenário será impulsionado principalmente pela sua crescente utilização como monômero na síntese de PTT, poliéster que ganha cada vez mais mercado devido às suas propriedades físico-químicas desejáveis e a sua aplicação. No entanto, também pode-se dizer essa tendência relaciona-se a aplicação desse produto na indústria farmacêutica e cosméticos.

4. Metodologias Experimentais

4.1 Materiais

Os sais minerais e o extrato de levedo utilizados no preparo dos meios de cultivo foram adquiridos na empresa Sigma Aldrich (RJ, Brasil).

O meio de cultivo sintético *Reinforced Clostridial Medium* (RCM - Oxoid, USA) foi utilizado na etapa de reativação e pré-inóculo quando se trabalhou com a cepa *Clostridium butyricum* NCIMB 8082. O RCM contém 10 $g.L^{-1}$ de extrato de carne, 10 $g.L^{-1}$ de peptona, 5 $g.L^{-1}$ de cloreto de sódio, 5 $g.L^{-1}$ de dextrose, 3 $g.L^{-1}$ de extrato de levedo, 3 $g.L^{-1}$ de acetato de sódio, 1 $g.L^{-1}$ de amido solúvel, 0,5 $g.L^{-1}$ L-cisteína HCl, 0,5 $g.L^{-1}$ de ágar e pH 6,8 +/- 0,2 a 25ºC.

A glicerina bruta utilizada foi gentilmente cedida pela empresa Petróleo Brasileiro S/A (Petrobras), proveniente da planta piloto de geração de biodiesel. Uma pré-caracterização desta glicerina bruta foi realizada no Laboratório de Engenharia de Sistemas Biológicos (BIOSE) da Escola de Química/UFRJ. Diante dos dados obtidos a matéria-prima empregada neste estudo apresenta, aproximadamente, 82,0 % m/m de glicerol e pH igual a 6,7.

A milhocina, proveniente da etapa de maceração do milho e considerada também um subproduto industrial, foi fornecida pela empresa Ingredion Brasil Ing. Ind. LTDA (RJ, Brasil). Sua composição foi determinada através da análise realizada pelo Laboratório Agronômico S/C Ltda. (LAGRO) e está disponível no Quadro 1.

Quadro 1. Composição da milhocina obtida da Ingredion Brasil Ing. Ind. LTDA (RJ, Brasil) determinada pelo Laboratório Agronômico S/C Ltda (LAGRO).

Minerais		Vitaminas		Propriedades	
Nitrogênio	3,41%	**Biotina**	0,30 mg/kg	**Carbono Orgânico Total**	16,72%
Fósforo Total	1,12%	**Cholina**	3500,00 mg/kg	**Relação C/N**	4,90
Potássio	2,90%	**Inositol**	6000,00 mg/kg	**pH**	4,00
Cálcio	2,00%	**Niacina**	80,00 mg/kg	**Condutividade elétrica**	1,52 mS/cm
Magnésio	0,95%	**Ácido Pantotênico**	15,00 mg/kg	**Densidade**	1,15 g/cm
Enxofre	0,25%	**Piridoxina**	9,00 mg/kg		
Ferro	647,50 mg/kg	**Riboflavina**	6,00 mg/kg		
Manganês	7,50 mg/kg	**Tiamina**	3,00 mg/kg		
Cobre	2,50 mg/kg				
Zinco	152,20 mg/kg				
Boro	0,08%				
Sódio	0,08%				

4.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho encontram-se listados abaixo:

1) Autoclave vertical Prismatec® modelo *CS-75*;

2) Capela de fluxo laminar equipada com luz UV – BioFlux II 90A;

3) Ultrafreezer a – 50°C;

4) Centrífuga Eppendorf® modelo *Centrifuge 5804R*;

5) Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Shimadzu® modelo *Prominence LC-20AD* acoplado a detector de índice refrativo modelo *RID-10A* 43

6) Espectrofotômetro Bell® modelo *SP 2000 UV;*

7) Incubadora-*shaker* Tecnal® modelo TE-420;

8) Microscópio ótico Nikon® modelo *Eclipse E200*;

9) pHmetro de bancada digital Digimed® modelo *DM-22*;

10) Biorreator Tecnal® modelo TEC-Bio-1,5;

11) Biorreator Biostat®B;

12) Protótipo de uma câmara anaeróbica desenvolvida e projetada pela professora Dra. Tatiana Felix Ferreira e colaboradores.

13) Liofilizador Terroni modelo Enterprise I.

4.3. Microrganismo

A cepa selvagem de *Clostridium butyricum* NCIMB 8082, previamente adquirida liofilizada do banco de culturas da *National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria* (NCIMB), foi utilizada como biocatalisador no presente trabalho. O mesmo foi adquirido por meio de recursos financeiros fruto da parceria do grupo de pesquisa BIOSE/EQ/UFRJ com a empresa PETROBRAS/SA.

4.3.1. Ativação e preservação da cepa

A fim de ativar a espécie, o microrganismo liofilizado foi suspenso no meio de cultivo *Reinforced Clostridial Medium* (RCM) e, em seguida, a solução foi transferida para frascos de soro (volume útil 60 mL), sob condições anaeróbicas. Os frascos de soro foram incubados a 37°C e 150 rpm por aproximadamente 48 horas.

Para preservação da cepa adquirida, alíquotas de meio de cultivo contendo as células crescidas foram transferidas para criotubos e adicionou-se uma solução contendo 20% m/m de glicerol P.A. Em seguida, as amostras contidas em criotubo foram liofilizadas e mantidas em ultrafreezer a -50°C.

4.3.2. Pré-inóculo

Na preparação do pré-inóculo, aproximadamente 3 mL de células previamente crescidas foram transferidas para frasco de soro contendo 50 mL de meio de cultivo RCM. O procedimento foi realizado dentro da câmara anaeróbica. Em seguida, as células foram

incubadas a 37°C, 150 rpm e após 16 horas de fermentação, os frascos de soro contendo as células crescidas foram armazenados em geladeira a 4°C.

4.3.3 Condições de anaerobiose

Para garantir a atmosfera anaeróbica nos frascos de soro, o gás N_2 foi adicionado no meio de cultivo e *headspace*, com auxílio de um filtro Whatman com retenção de partículas de até 0,2 μm. Após 5 minutos com uma vazão de gás de aproximadamente 0,3 VVM (volume de ar por volume do meio por minuto), os frascos foram tampados com borracha butílica e lacrados com lacre de alumínio. Posteriormente, foram autoclavados a 1 atm (121ºC) por 15 minutos.

No reator, a condição anaeróbica inicialmente foi estabelecida com a adição de N_2 em torno de 0,5 vvm por 10 minutos. A cada amostragem e/ou alimentação realizava-se também a adição de N_2 para garantir a atmosfera anaeróbica. Toda adição de gás no biorreator, tanto na etapa inicial quanto nas amostragens e alimentações foram realizadas manualmente.

4.4 Esterilização dos meios de cultivo e manobras assépticas

A esterilização dos meios de cultivo em frasco de soro e em biorreator foram realizadas utilizando a autoclave. O tempo e a temperatura de esterilização foram baseados na especificidade de cada meio de cultivo utilizado na fermentação. Os materiais utilizados no preparo dos meios de cultivo estéreis e no manuseio de microrganismos foram autoclavados a 1 atm por 15 minutos.

Todo o manuseio dos microrganismos e materiais estéreis foi realizado obedecendo as manobras assépticas, logo, utilizou-se a câmara de fluxo laminar. Somente na preparação do pré-inóculo que o protótipo da câmara anaeróbica foi usado.

4.5 Planejamento Experimental

Diversos trabalhos na literatura estudam o desempenho da produção de 1,3-PDO a partir de glicerol ou glicerina bruta por *C. butyricum*. No entanto, os trabalhos utilizam meios de cultivo contendo uma grande quantidade de componentes, denominados assim de meios complexos (CHATZIFRAGKOU et al., 2011; WILKENS et al., 2012; ZHU et al., 2016). Diante disso, de forma a diminuir o número de componentes do meio de cultivo para a produção de 1,3-PDO e, consequentemente, o custo do bioprocesso utilizou-se a ferramenta de planejamento experimental. O *design* experimental do tipo *Placket-Burman* (PLACKETT E BURMAN, 1946), conhecido como PB, foi adotado como uma técnica valiosa para a seleção prévia das variáveis independentes mais importantes do meio de cultivo. O *software* Statistica 7.0 foi utilizado para o desenvolvimento dos experimentos e análise dos dados experimentais.

4.5.1 *Placket-Burman*: 16 variáveis

Uma pesquisa inicial sobre os componentes contidos nos meios de cultivo em trabalhos da literatura foi efetuada e, por consequência, selecionou-se os 15 componentes mais utilizados para serem trabalhados neste estudo. Os 15 componentes selecionados, juntamente com o pH inicial do meio de cultivo, resultaram num primeiro PB contendo 16 variáveis independentes. As variáveis e os níveis utilizados no PB encontram-se descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Componentes e níveis estudados no planejamento PB contendo 16 variáveis independentes utilizando temperatura de 37°C e 150 rpm.

Variáveis independentes	Unidade	-1	0	1
pH inicial do meio de cultivo	n.a.	6,5	7,5	8,5
KH_2PO_4	$g.L^{-1}$	1,0	2,0	3,0
NH_4Cl	$g.L^{-1}$	1,0	2,0	3,0
$MgSO_4.7H_2O$	$g.L^{-1}$	0,0	0,15	0,3
$CaSO_4.2H_2O$	$g.L^{-1}$	0,0	0,01	0,02
Ácido cítrico	$g.L^{-1}$	0,0	0,25	0,5
Extrato de levedo	$g.L^{-1}$	1,0	3,0	5,0
H_3BO_3	$mg.L^{-1}$	0,0	4,0	8,0
$CoCl_2.2\ H_2O$	$mg.L^{-1}$	0,0	1,5	3,0
$ZnCl_2$	$mg.L^{-1}$	0,0	0,75	1,5
$MnCl_2.4H_2O$	$mg.L^{-1}$	0,0	0,75	1,5
$NaMoO_4.2H_2O$	$mg.L^{-1}$	0,0	0,075	0,15
$NiCl_2.6H_2O$	$mg.L^{-1}$	0,0	0,2	0,4
$CuCl_2$	$mg.L^{-1}$	0,0	0,15	0,3
$FeSO_4.7H_2O$	$mg.L^{-1}$	0,0	10,0	20,0
$Na_2SeO_3.5H_2O$	$mg.L^{-1}$	0,0	0,15	0,3

n.a.: não aplicável.

O PB descrito utilizando as 16 variáveis independentes consiste em 20 experimentos mais 4 repetições no ponto central, totalizando 24 ensaios (Tabela 4.2). Após 24 horas de fermentação, as variáveis respostas estudadas foram: crescimento celular, produção de 1,3-PDO, consumo de glicerol e rendimento em relação ao 1,3-PDO produzido.

Tabela 4.2 Valores reais e codificados das 16 variáveis investigadas nos experimentos realizados em frascos de soro a 37°C e 150 rpm segundo o planejamento PB.

Ensaios	pH inicial do meio de cultura	KH_2PO_4	NH_4Cl	$MgSO_4.7H_2O$	$CaSO_4.2H_2O$	Ácido cítrico	Ext. levedo	H_3BO_3	$CoCl_2.2H_2O$	$ZnCl_2$	$MnCl_2.4H_2O$	$NaMoO_4.2H_2O$	$NiCl_2.6H_2O$	$CuCl_2$	$FeSO_4.7H_2O$	$Na_2SeO_3.5H_2O$
1	1 (8,5)	-1 (1)	1 (3)	1 (0,3)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (1)	-1 (0)	1 (3)	-1 (0)	1 (1,5)	-1 (0)	1 (0,4)	1 (0,3)	1 (20)	1 (0,3)
2	1 (8,5)	1 (3)	-1 (1)	1 (0,3)	1 (0,02)	-1 (0)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1,5)	-1 (0)	1 (0,15)	-1 (0)	1 (0,3)	1 (20)	1 (0,3)
3	-1 (6,5)	1 (3)	1 (3)	-1 (0)	1 (0,02)	1 (0,5)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1,5)	-1 (0)	1 (0,4)	-1 (0)	1 (20)	1 (0,3)
4	-1 (6,5)	-1 (1)	1 (3)	1 (0,3)	-1 (0)	1 (0,5)	1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 0,15)	-1 (0)	1 (0,3)	-1 (0)	1 (0,3)
5	1 (8,5)	-1 (1)	-1 (1)	1 (0,3)	1 (0,02)	-1 (0)	1 (5)	1 (8)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,4)	-1 (0)	1 (20)	-1 (0)
6	1 (8,5)	1 (3)	-1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	1 (0,5)	-1 (1)	1 (8)	1 (3)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,3)	-1 (0)	1 (0,3)
7	1 (8,5)	1 (3)	1 (3)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,5)	1 (5)	-1 (0)	1 (3)	1 (1,5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (20)	-1 (0)
8	1 (8,5)	1 (3)	1 (3)	1 (0,3)	-1 (0)	-1 (0)	1 (5)	1 (8)	-1 (0)	1 (1,5)	1 (1,5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,3)
9	-1 (6,5)	1 (3)	1 (3)	1 (0,3)	1 (0,02)	-1 (0)	-1 (1)	1 (8)	1 (3)	-1 (0)	1 (1,5)	1 (0,15)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)
10	1 (8,5)	-1 (1)	1 (3)	1 (0,3)	1 (0,02)	1 (0,5)	-1 (1)	-1 (0)	1 (3)	1 (1,5)	-1 (0)	1 (0,15)	1 (0,4)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)
11	-1 (6,5)	1 (3)	-1 (1)	1 (0,3)	1 (0,02)	1 (0,5)	1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1,5)	1 (1,5)	-1 (0)	1 (0,4)	1 (0,3)	-1 (0)	-1 (0)
12	1 (8,5)	-1 (1)	1 (3)	-1 (0)	1 (0,02)	1 (0,5)	1 (5)	1 (8)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1,5)	1 (0,15)	-1 (0)	1 (0,3)	1 (20)	-1 (0)
13	-1 (6,5)	1 (3)	-1 (1)	1 (0,3)	-1 (0)	1 (0,5)	1 (5)	1 (8)	1 (3)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,15)	1 (0,4)	-1 (0)	1 (20)	1 (0,3)
14	-1 (6,5)	-1 (1)	1 (3)	-1 (0)	1 (0,02)	-1 (0)	1 (5)	1 (8)	1 (3)	1 (1,5)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,4)	1 (0,3)	-1 (0)	1 (0,3)
15	-1 (6,5)	-1 (1)	-1 (1)	1 (0,3)	-1 (0)	1 (0,5)	-1 (1)	1 (8)	1 (3)	1 (1,5)	1 (1,5)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,3)	1 (20)	-1 (0)
16	-1 (6,5)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	-1 (0)	1 (5)	-1 (0)	1 (3)	1 (1,5)	1 (1,5)	1 (0,15)	-1 (0)	-1 (0)	1 (20)	1 (0,3)
17	1 (8,5)	-1(1)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,5)	-1 (1)	1 (8)	-1 (0)	1 (1,5)	1 (1,5)	1 (0,15)	1 (0,4)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,3)
18	1 (8,5)	1 (3)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (5)	-1 (0)	1 (3)	-1 (0)	1 (1,5)	1 (0,15)	1 (0,4)	1 (0,3)	-1 (0)	-1 (0)
19	-1 (6,5)	1 (3)	1 (3)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (1)	1 (8)	-1 (0)	1 (1,5)	-1 (0)	1 (0,15)	1 (0,4)	1 (0,3)	1 (20)	-1 (0)
20	-1 (6,5)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)
21 (PC)	0 (7,5)	0 (2)	0 (2)	0 (0,15)	0 (0,15)	0 (0,25)	0 (3)	0 (4)	0 (1,5)	0 (0,75)	0 (0,75)	0 (0,075)	0 (0,2)	0 (0,15)	0 (10)	0 (0,15)
22 (PC)	0 (7,5)	0 (2)	0 (2)	0 (0,15)	0 (0,15)	0 (0,25)	0 (3)	0 (4)	0 (1,5)	0 (0,75)	0 (0,75)	0 (0,075)	0 (0,2)	0 (0,15)	0 (10)	0 (0,15)
23 (PC)	0 (7,5)	0 (2)	0 (2)	0 (0,15)	0 (0,15)	0 (0,25)	0 (3)	0 (4)	0 (1,5)	0 (0,75)	0 (0,75)	0 (0,075)	0 (0,2)	0 (0,15)	0 (10)	0 (0,15)
24 (PC)	0 (7,5)	0 (2)	0 (2)	0 (0,15)	0 (0,15)	0 (0,25)	0 (3)	0 (4)	0 (1,5)	0 (0,75)	0 (0,75)	0 (0,075)	0 (0,2)	0 (0,15)	0 (10)	0 (0,15)

As células crescidas em frascos de soro contendo 50 mL de RCM e conservadas a 4°C foram incubadas a 37°C durante 30 minutos em agitador rotatório a 250 rpm. Posteriormente, foram inoculados 5 mL do pré-inóculo em cada frasco de soro contendo 50 mL do meio de cultivo a ser estudado, de acordo com a composição determinada pela matriz do planejamento PB. Todos os experimentos foram realizados com uma concentração inicial de 12,5 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta, e as amostragens foram realizadas em 0h, 12h, 18h, 24h, 36h e 42h. Os ensaios foram destrutivos e realizados em triplicata, descartando-se um frasco de soro a cada amostragem. A cada amostragem foram realizadas análises do consumo de glicerol, produtos formados, crescimento celular e pH. As condições de esterilização e anaerobiose foram mantidas conforme o item 4.3.3 e 4.4.

4.5.2 *Placket-Burman*: 11 variáveis

Dando continuidade ao estudo dos componentes do meio de cultivo para produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta utilizando *C. butyricum*, foi realizado um segundo planejamento experimental do tipo PB. De acordo com os resultados anteriores, 10 componentes do meio de cultivo e o pH inicial do meio de cultivo apresentaram relevância para bioprocesso estudado. Com isso, o segundo planejamento experimental visou o estudo destas 11 variáveis independentes. As variáveis e suas respectivas faixas de estudo no segundo PB encontram-se descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Componentes e níveis estudados no planejamento PB contendo 11 variáveis independentes e utilizando temperatura de 37°C e 150 rpm.

Variáveis independentes	Unidade	-1	0	1
pH inicial do meio de cultivo	n.a.	6,5	7,5	8,5
KH_2PO_4	$g.L^{-1}$	1,0	2,0	3,0
NH_4Cl	$g.L^{-1}$	0,0	0,5	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	$g.L^{-1}$	0,0	0,15	0,3
$CaSO_4.2H_2O$	$g.L^{-1}$	0,0	0,01	0,02
Extrato de levedo	$g.L^{-1}$	1,0	3,0	5,0
$ZnCl_2$	$mg.L^{-1}$	0,0	0,75	1,5
$NaMoO_4.2H_2O$	$mg.L^{-1}$	0,0	0,075	0,15
$CuCl_2$	$mg.L^{-1}$	0,0	0,15	0,3
$FeSO_4.7H_2O$	$mg.L^{-1}$	0,0	10,0	20,0
$Na_2SeO_3.5H_2O$	$mg.L^{-1}$	0,0	0,15	0,3

n.a.: não aplicável

O planejamento foi composto por um total de 19 experimentos, sendo 3 repetições no ponto central (Tabela 4.4). Todos esses experimentos foram realizados com uma concentração inicial de 12,5 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta. Após 24 horas de fermentação, as variáveis respostas estudadas foram crescimento celular, produção de 1,3-PDO, consumo de glicerol e rendimento em 1,3-PDO.

O procedimento experimental foi executado de acordo com o descrito no item 4.5.1. Sendo que, neste caso, as amostragens foram realizadas em 0 e 24h. Isso porque se verificou que após esse tempo de experimento a fonte de carbono havia esgotado.

Tabela 4.4 Valores reais e codificados das 11 variáveis independente investigadas nos experimentos realizados em frascos de soro a37°C e 150 rpm segundo o planejamento PB.

Ensaios	pH inicial do meio de cultivo	KH_2PO_4	NH_4Cl	$MgSO_4.7H_2O$	$CaSO_4.2H_2O$	Ext. levedo	$ZnCl_2$	$NaMoO_4.2H_2O$	$CuCl_2$	$FeSO_4.7H_2O$	$Na_2SeO_3.5H_2O$
F1	1 (8,5)	-1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,02)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,15)	1 (0,3)	-1 (0)	1(0,3)
F2	1 (8,5)	1 (3)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,3)	1 (20)	-1 (0)
F3	1 (8,5)	1 (3)	1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1,5)	-1 (0)	-1 (0)	1 (20)	1 (0,3)
F4	1 (8,5)	1 (3)	1 (1)	1 (0,3)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,15)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,3)
F5	-1 (6,5)	1 (3)	1 (1)	1 (0,3)	1 (0,02)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,3)	-1 (0)	-1 (0)
F6	1 (8,5)	-1 (1)	1 (1)	1 (0,3)	1 (0,02)	1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (20)	-1 (0)
F7	-1 (6,5)	1 (3)	-1 (0)	1 (0,3)	1 (0,02)	1 (1)	1 (1,5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,3)
F8	1 (8,5)	-1 (1)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	1 (1)	1 (1,5)	1 (0,15)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)
F9	1 (8,5)	1 (3)	-1 (0)	1 (0,3)	-1 (0)	1 (1)	1 (1,5)	1 (0,15)	1 (0,3)	-1 (0)	-1 (0)
F10	-1 (6,5)	1 (3)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,02)	-1 (0)	1 (1,5)	1 (0,15)	1 (0,3)	1 (20)	-1 (0)
F11	-1 (6,5)	-1 (1)	1 (1)	1 (0,3)	-1 (0)	1(1)	-1 (0)	1 (0,15)	1 (0,3)	1 (20)	1 (0,3)
F12	1 (8,5)	-1 (1)	-1 (0)	1 (0,3)	1 (0,02)	-1 (0)	1 (1,5)	-1 (0)	1 (0,3)	1 (20)	1 (0,3)
F13	-1 (6,5)	1 (3)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,02)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,15)	-1(0)	1 (20)	1 (0,3)
F14	-1 (6,5)	-1 (1)	1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1)	1 (1,5)	-1 (0)	1 (0,3)	-1 (0)	1 (0,3)
F15	-1 (6,5)	-1 (1)	-1 (0)	1 (0,3)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1,5)	1 (0,15)	-1(0)	1 (20)	-1 (0)
F16	-1 (6,5)	-1 (1)	-1(0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)
F17 (PC)	0 (7,5)	0 (2)	0 (0,5)	0 (0,15)	0 (0,01)	0 (0,5)	0 (0,075)	0 (0,075)	0 (0,15)	0 (10)	0 (0,15)
F18 (PC)	0 (7,5)	0 (2)	0 (0,5)	0 (0,15)	0 (0,01)	0 (0,5)	0 (0,075)	0 (0,075)	0 (0,15)	0 (10)	0 (0,15)
F19 (PC)	0 (7,5)	0 (2)	0 (0,5)	0 (0,15)	0 (0,01)	0 (0,5)	0 (0,075)	0 (0,075)	0 (0,15)	0 (10)	0 (0,15)

4.6 Avaliação da influência do cofator Manganês (Mn^{2+}) sobre a atividade da enzima PDOR

Estudo apontado na revisão bibliográfica relata que 1,3-propanodiol oxidoredutase (PDOR), enzima que catalisa a conversão de 3-HPA a 1,3-PDO, necessita somente de Mn^{2+} para exercer completa atividade (SAXENA et al., 2009). A fim de verificar a influência desse cofator na produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082, estudou-se a adição de sais de $MnCl_2.4H_2O$ ao meio de cultivo, conforme disposto na Tabela 4.5. Nesse sentido, o controle do balanço redox da célula a fim de melhorar o rendimento de 1,3-PDO e aumentar a produção de ácido acético foi proposto pelo estudo da adição do íon Mn^{2+} ao meio de cultivo minimizado. Devido a hipótese de limitação da PDOR, pela ausência deste íon no meio de cultivo, o estudo foi proposto com o objetivo de elevar a atividade da referida enzima.

As células crescidas em frascos de soro contendo 50 mL de RCM e conservadas a 4°C foram incubadas a 37°C durante 30 minutos em agitador rotatório mantendo a rotação a 250 rpm. Posteriormente, foram inoculados 5 mL do pré-inóculo em cada frasco de soro contendo 50 mL do meio de cultivo (vide Tabela 4.5). Os experimentos foram incubados a 37ºC e 150 rpm por 24 horas e as amostragens foram realizadas em 0h e 24h. Os ensaios foram destrutivos e executados, no mínimo, em triplicata. Neste estudo, analisaram-se o consumo de glicerol, formação de 1,3-PDO e crescimento celular. As condições de esterilização e anaerobiose foram mantidas conforme descritas no item 4.3.3 e 4.4.

Tabela 4.5 Meios de cultivo utilizados no estudo de diferentes concentrações de Mn^{2+}. Os ensaios foram realizados em frascos de soro e incubados a 37°C e 150 rpm por 24 horas.

Reagentes	Unidade	Mn 0	Mn 1,5	Mn 3,0
KH_2PO_4	$g.L^{-1}$	1,0	1,0	1,0
NH_4Cl	$g.L^{-1}$	1,0	1,0	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	$g.L^{-1}$	0.3	0.3	0.3
$CaSO_4.2H_2O$	$g.L^{-1}$	0.02	0.02	0.02
$FeSO_4.7H_2O$	$mg.L^{-1}$	20,0	20,0	20,0
Ext. levedo	$g.L^{-1}$	1,0	1,0	1,0
$MnCl_2.4H_2O$	$mg.L^{-1}$	0,0	1,5	3,0
Glicerina bruta	$g.L^{-1}$	12,5	12,5	12,5
pH inicial do meio de cultivo[a]	n.a.	8,5	8,5	8,5

[a] O pH do meio de cultivo foi ajustado para o valor de 8,5 antes da etapa de autoclavação.
n.a.: não aplicável

4.7 Estudo da produção de 1,3-PDO em biorreator de volume útil de 1 L

A fim de estudar a melhor estratégia operacional para bioconversão de glicerina bruta em 1,3-PDO foram testadas diferentes condições em biorreator de capacidade útil 1 L, marca Tecnal modelo TEC-BIO-1,5 L.

4.7.1 Estratégia 1: Etapa de crescimento celular em frascos agitados e produção de 1,3-PDO em biorreator por batelada simples

Os frascos de soro contendo as células conservadas em meio RCM foram incubados a 37 °C durante 30 minutos em agitador rotatório a 250 rpm. Para a etapa denominada de etapa de crescimento celular, 50 mL de células crescidas em frasco de soro foram inoculadas em frasco agitado do tipo Schott® contendo 350 mL do meio de cultivo (descrito na Tabela 4.6) e 25,0 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta. Após 16 horas de crescimento celular em frasco do tipo Schott®, todo o meio de cultivo fermentado foi transferido para um biorreator contendo 600 mL do meio de cultivo em questão, iniciando a etapa denominada de etapa de produção de 1,3-PDO (Tabela 4.6). A etapa de produção foi iniciada com aproximadamente 75,0 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta.

O experimento foi realizado sob condições anaeróbias em biorreator modelo TEC-BIO-1,5 L e marca Tecnal, a 37 °C e agitação de 200 rpm, com controle automático de temperatura, controle manual de pH, adição manual de N_2 e duração de 13 horas. Amostras foram obtidas ao longo da fermentação para analisar o consumo de glicerol, os produtos formados e o crescimento celular. A cada amostragem foi realizada a adição de N_2 para assegurar a atmosfera anaeróbica do reator.

Tabela 4.6 Meio de cultivo utilizado na etapa de crescimento celular e na etapa de produção de 1,3-PDO durante a condução de experimentos em biorreator de 1 L segundo as Estratégia 1 e 2.

Componentes[a]	Concentração
KH_2PO_4	2,0 $g.L^{-1}$
NH_4Cl	0,5 $g.L^{-1}$
$MgSO_4$ 7 H_2O	0,15 $g.L^{-1}$
$CaSO_4$ 2 H_2O	0,01 $g.L^{-1}$
$ZnCl_2$	0,75 $g.L^{-1}$
$NaMoO_4$ 2 H_2O	0,075 $g.L^{-1}$
$CuCl_2$	0,15 $mg.L^{-1}$
$FeSO_4$. 7 H_2O	10 $mg.L^{-1}$
Na_2SeO_3 5 H_2O	0,15 $mg.L^{-1}$
Extrato de levedo	0,5 $g.L^{-1}$
pH	7,0

4.7.2 Estratégia 2: Etapa de crescimento celular em frascos agitados e produção de 1,3-PDO em biorreator por batelada alimentada

A fermentação foi conduzida de maneira similar a Estratégia 1 (item 4.7.1), utilizando o meio de cultivo descrito na Tabela 4.6. A etapa de crescimento celular também foi realizada em frasco agitado, externamente ao biorreator. Após 16 horas de crescimento, as células foram inoculadas em biorreator contendo 500 mL meio de cultivo (vide Tabela 4.6). A etapa de produção foi iniciada com 25,0 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta. Duas alimentações de substrato foram realizadas ao logo da fermentação, e a concentração no biorreator em cada uma das alimentações foi de 25,0 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta e 1,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedo. A cada amostragem e/ou alimentação realizou-se adição manual de gás N_2. Amostras foram obtidas ao longo da fermentação a fim de analisar o consumo de glicerol, os produtos formados e o crescimento celular.

4.7.3 Estratégia 3: Etapa de crescimento celular no biorreator sem ajuste de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada alimentada e controle manual de pH (pH 7,0)

Nesta estratégia de operação, as células conservadas em frascos de soro contendo meio de cultivo RCM foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos em agitador rotatório a 250 rpm. Em seguida, foram inoculadas em biorreator contendo 500 mL de meio de cultivo (Tabela 4.7). A etapa de crescimento celular ocorreu diretamente em biorreator no período *overnight* sob condições anaeróbicas, 37°C e agitação de 200 rpm. No período *overnight* não houve controle de pH da fermentação, somente o controle de temperatura automático foi garantido nesta etapa. Após a etapa de crescimento celular o reator foi alimentado com 300 mL do meio de cultivo, iniciando a etapa denominada de etapa de produção de 1,3-PDO. Nesta etapa, foram realizadas 4 alimentações sequenciais e a concentração do reator em cada uma das diferentes alimentações foi de 25,0 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta e 1,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedo. Amostras foram obtidas ao longo do experimento para analisar o consumo de glicerol, os produtos formados e o crescimento celular.

O meio de cultivo, descrito na Tabela 4.7, foi obtido após análise crítica dos resultados dos planejamentos PB realizados.

Tabela 4.7 Meio de cultivo utilizado na etapa de crescimento celular e na etapa de produção de 1,3-PDO nos experimentos realizados em biorreator 1 L segundo as Estratégias 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Componentes do meio de cultivo	Concentração
KH_2PO_4	1,0 $g.L^{-1}$
NH_4Cl	1,0 $g.L^{-1}$
$MgSO_4$ 7 H_2O	0,3 $g.L^{-1}$
$CaSO_4$ 2 H_2O	0,02 $g.L^{-1}$
$FeSO_4$ 7 H_2O	20 $mg.L^{-1}$
Extrato de levedo	1,0 $g.L^{-1}$
pH	7,0

4.7.4 Estratégia 4: Etapa de crescimento celular em biorreator com ajuste automático de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada simples (125 $g.L^{-1}$ glicerina bruta) e controle automático de pH (pH 7,0)

O experimento foi conduzido de acordo com o item 4.7.3, no entanto, o período *overnight* (etapa de crescimento celular) foi realizado com controle automático de pH, sendo o mesmo mantido em pH igual a 7,0. O meio de cultivo utilizado está descrito na Tabela 4.7, porém trabalhou-se com a concentração inicial de glicerina bruta na etapa de produção de

células em torno de 125,0 $g.L^{-1}$. O experimento foi realizado em regime de batelada simples e não foram realizadas alimentações e nem adições de N_2 no decorrer da etapa de produção de 1,3-PDO, conforme nas Estratégias anteriores. Na etapa de produção, foram retiradas amostras somente em 0 e 16 horas de fermentação.

4.7.5 Estratégia 5: Etapa de crescimento celular em biorreator com ajuste automático de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada simples (150 $g.L^{-1}$ glicerina bruta) e controle automático de pH (pH 7,0)

Para estudar a inibição celular pela concentração de substrato, as células foram inoculadas no biorreator e crescidas durante o período *overnight* com controle automático de pH. Ao atingir uma concentração de glicerol no meio de cultivo de aproximadamente 10,0 $g.L^{-1}$, iniciou-se a etapa de produção (com ajuste automático de pH) em batelada simples com a alimentação de 300 mL de meio de produção. O meio de cultivo utilizados nesta estratégia está descrito na Tabela 4.7, porém a concentração inicial de glicerina bruta na etapa de produção de 1,3-PDO foi 150 $g.L^{-1}$.

4.7.6 Estratégia 6: Crescimento celular e produção de 1,3-PDO em biorreator por batelada alimentada e ajuste automático de pH na etapa de crescimento celular e produção (pH 6,8)

A intenção desse experimento foi investigar a produção de 1,3-PDO ao diminuir o pH do meio de cultivo ao longo da fermentação. O controle de pH foi ajustado automaticamente em 6,8 desde a etapa de crescimento de células no reator.

Nesta estratégia de operação, as células conservadas em frascos de soro contendo meio de cultivo RCM foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos em agitador rotatório a 250 rpm. Em seguida, as mesmas foram inoculadas em biorreator contendo 500 mL de meio de cultivo (Tabela 4.7). A etapa de crescimento celular ocorreu diretamente em biorreator no período *overnight* sob condições anaeróbicas, 37 °C e agitação de 200 rpm e pH automático estipulado em 6,8.

Após a etapa de crescimento celular, o reator foi alimentado com 300 mL do meio de cultivo (Tabela 4.7), iniciando a etapa de produção. Nesta etapa, ocorreu o ajuste automático do pH em 6,8 e foram realizadas 3 alimentações sequenciais contendo 25,0 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta e 1,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedo. Amostras foram obtidas ao longo do tempo de fermentação para analisar o consumo de glicerol, os produtos formados e o crescimento celular.

4.8 Estudo da produção de 1,3-PDO em biorreator de volume útil de 5 L

A fim de estudar a produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta por *C. butyricum* diante do aumento de escala para a produção de 1,3-PDO, realizaram-se experimentos em biorreator Biostat B.B. Braun Biotech International acoplado a vaso de reação de 5 L.

4.8.1 Estratégia 7: Etapa de crescimento celular em biorreator com ajuste automático de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada alimentada e controle automático de pH (pH 7,0)

Os frascos de soro contendo as células conservadas em meio de cultivo RCM foram incubados a 37 °C durante 30 minutos em agitador rotatório a 150 rpm. Posteriormente, 50 mL de células foram inoculadas em frasco do tipo Schott®, sob condições anaeróbicas, contendo 350 mL do meio de cultivo RCM. Todo o volume do meio fermentado foi transferido para o reator contendo 3,1 L do meio de cultivo da etapa de crescimento celular (Tabela 4.7), a 37°C, agitação de 200 rpm e pH fixado em 7,0. Para o ajuste do pH foi utilizada solução de NaOH 7 M.

Posteriormente a etapa de crescimento celular, com duração de aproximadamente 16 horas, iniciou-se uma nova fase de fermentação denominada etapa de produção. Na etapa de produção foram realizadas quatro alimentações: uma contendo 0,5 L de meio de produção (Tabela 4.7) e três contendo 0,15 L de substrato (aproximadamente 25,0 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta e 1,0 $g.L^{-1}$ de extrato de levedo).

Amostras foram retiradas ao longo da fermentação para analisar o consumo de glicerol, os produtos formados e o crescimento celular. N_2 foi adicionado ao meio de fermentação a cada amostragem e/ou alimentação.

4.8.2 Estratégia 8: Etapa de crescimento celular em biorreator com ajuste automático de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada alimentada e controle automático de pH (pH 7,0), com adição contínua de N_2

O experimento foi realizado conforme descrito no item 4.8.1, o diferencial consistiu na adição contínua de 0,5 VVM de nitrogênio, a fim de garantir a atmosfera anaeróbica do reator, ao longo de todo o curso da fermentação.

4.8.3 Estratégia 9: Etapa de crescimento celular em biorreator com ajuste automático de pH *overnight* e produção de 1,3-PDO também em biorreator por batelada simples e controle automático de pH (pH 7,0), com substituição do extrato de levedo por milhocina

Nesta estratégia de operação, o estudo foi conduzido conforme item 4.8.1. No entanto, neste caso, a operação ocorreu em batelada simples e houve substituição da principal fonte orgânica de nitrogênio. Na Estratégia 9, adicionou-se milhocina, resíduo industrial proveniente da maceração do milho, em substituição a fonte de nitrogênio sintética, o extrato de levedo (vide Tabela 4.8). Para iniciar a etapa de produção, o reator foi alimentado com 1 L do meio de cultivo contendo aproximadamente 75,0 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta e 20,0 $g.L^{-1}$ de milhocina. A cada amostragem e/ou alimentação realizou-se adição de N_2.

Tabela 4.8 Meio de cultivo utilizado na etapa de crescimento celular e na etapa de produção de 1,3-PDO do experimento realizado em biorreator 5 L segundo a Estratégia 9.

Componentes do meio de cultivo[a]	Concentração
KH_2PO_4	1,0 $g.L^{-1}$
NH_4Cl	1,0 $g.L^{-1}$
$MgSO_4$ 7 H_2O	0,3 $g.L^{-1}$
$CaSO_4$ 2 H_2O	0,02 $g.L^{-1}$
$FeSO_4$ 7 H_2O	20 $mg.L^{-1}$
Milhocina	20,0 $g.L^{-1}$
pH	7,0

A Tabela 4.9 demonstra resumidamente as diferentes condições e estratégias estudadas.

Tabela 4.9 Resumo das diferentes estratégias no estudo de produção de 1,3-PDO em biorreator sob temperatura de 37ºC e agitação de 200 rpm.

Condições	**Estratégia 1**	**Estratégia 2**	**Estratégia 3**	**Estratégia 4**	**Estratégia 5**	**Estratégia 6**	**Estratégia 7**	**Estratégia 8**	**Estratégia 9**
Meio de cultivo	complexo	complexo	minimizado	minimizado	minimizado	minimizado	minimizado	minimizado	minimizado
Fonte de Nitrogênio	Extrato de levedo	Extrato de levedo	Extrato de levedo	Extrato de Levedo	Extrato de levedo	Extrato de levedo	Extrato de Levedo	Extrato de levedo	Milhocina
ECC	frasco agitado	frasco agitado	reator	reator	reator	reator	reator	reator	reator
Ajuste pH da ECC	não realizado	não realizado	não realizado	automático pH 7	automático pH 7	automático pH 7	automático pH 7	automático pH 7	automático pH 7
EP	batelada simples	batelada alimentada	batelada alimentada	batelada simples	batelada simples	batelada alimentada	batelada alimentada	batelada alimentada	batelada simples
Ajuste pH da EP	manual pH 7	manual pH 7	manual pH 7	automático pH 7	automático pH 7	automático pH 6,8	automático pH 7	automático pH 7	automático pH 7
GB inicial na EP ($g.L^{-1}$)	~ 75	~ 25 [1]	~ 25	~ 125	~ 150	~ 10	~ 25 g	~ 25	~ 75
Adição de N_2 na EP	Amostragem	Amostragem	Amostragem	Amostragem	Amostragem	Amostragem	Amostragem	Contínua	Amostragem
Volume do reator (L)	1	1	1	1	1	1	5	5	5

ECC: Etapa de crescimento celular, EP: Etapa de produção de 1,3-PDO; GB: glicerina bruta

4.9 Métodos Analíticos

4.9.1 Quantificação do crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de densidade ótica a 600 nm, e esses valores foram convertidos para mg de peso seco de células por mL (p.s.células/mL) utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco, que está apresentada na Figura 4.1. A curva de peso seco é obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% de NaCl). Desta suspensão, retira-se uma amostra (15 mL) em triplicata, que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,22 μm), seca em luz de infravermelho por aproximadamente 10 minutos e, em seguida, levada a peso constante. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições, de modo a obterem-se concentrações celulares distintas e, então, mede-se a absorbância em espectrofotômetro no devido comprimento de onda, obtendo-se a curva de peso seco.

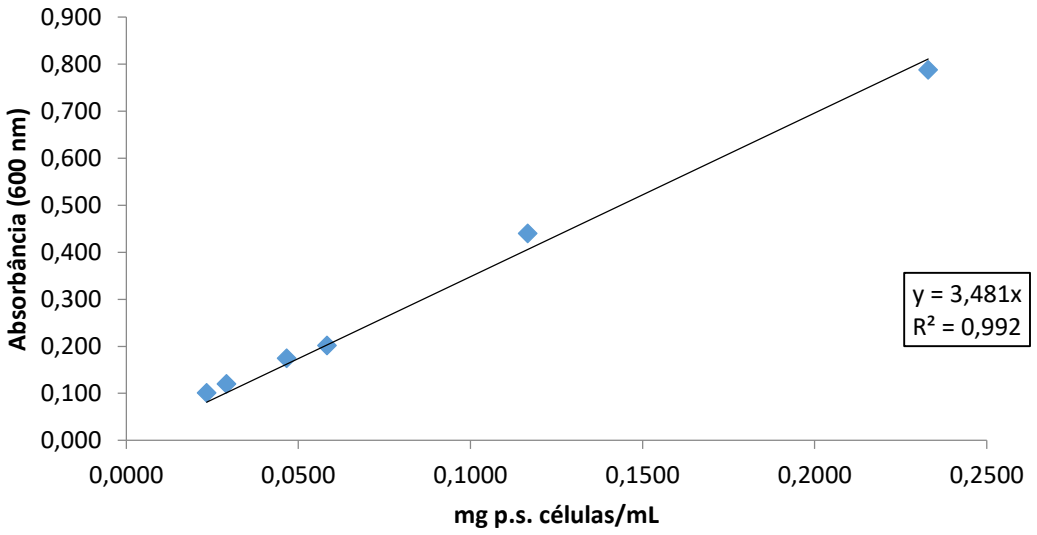

Figura 4.1 Curva de peso para quantificação do crescimento celular de *C. butyricum* NCIMB 8082 através de medidas de absorbância em espectrofotômetro Bell® modelo *SP 2000 UV*. O fator de conversão utilizado foi 0,287.

4.9.2 Quantificação de glicerol e produtos

Para quantificar glicerol, 1,3-propanodiol e os subprodutos da fermentação foram realizadas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para tal análise utilizou-se os seguintes itens: coluna Aminex® HPX-87H Ion Exclusion de dimensões 300 nm x 7,8 nm (Bio-Rad Laboratories), detector de índice de refração RID-10A (Shimadzu), bomba LC-20ADSP (Shimadzu) e software cromatográfico: LabSolutions (Shimadzu). A fase móvel utilizada foi H_2SO_4 5mM com vazão de 0,8 mL/min, o volume de injeção foi 20 µL e a temperatura da corrida 60°C. Os padrões (Sigma-Aldrich) de todos os analitos estudados foram diluídos em água Mili-Q e injetados em triplicata para preparação da curva padrão, que relaciona a área obtida no cromatograma com a concentração do composto.

As amostras foram filtradas em membrana (CHROMAFIL®) com diâmetro de 0,22 µm e injetadas em duplicata para a quantificação através do uso da curva padrão.

4.9.3 Medida de pH

O pH dos experimentos em frasco de soro foi analisado em um modelo de pH Digimed DM-22 previamente calibrado.

4.9.4 Análise de dados estatísticos

A análise dos dados obtidos no planejamento experimental foi realizada utilizando o software Statistica 7.0.

4.9.5 Avaliação Econômica

A fim de realizar um estudo preliminar envolvendo a avaliação econômica do bioprocesso em questão, levou-se em consideração os preços praticados para o 1,3-PDO, ácido acético e ácido butírico no período de 2004 a 2018. A consulta foi realizada *on line* através do Portal de Comércio do Brasil (Comex Stat), instituição vinculado ao Ministério da Indústria, Comércio e Exterior e Serviços.

A partir dos dados experimentais obtidos no presente trabalho, foi possível estudar preliminarmente a viabilidade econômica do projeto, justificando sua execução em maiores escalas de trabalho.

Com a finalidade de embasar e fundamentar o estudo econômico, cálculos de retorno de venda (RV), custo anual de matéria-prima (CMP) e de lucro bruto (LB) foram realizados.

O retorno de venda é um parâmetro que leva em conta o preço do produto por unidade, e esse preço é multiplicado pela quantidade anual disponibilizada pela empresa para a venda (PERLINGUEIRO, 2005). O cálculo de retorno de venda foi realizado de acordo com a Equação 4.1.

$$RV\ (\frac{US\$}{ano}) = \frac{preço\ produto\ (US\$)}{Kg} * \frac{massa\ produto\ (Kg)}{batelada} * \frac{batelada}{ano} \qquad \text{(Equação 4.1)}$$

O custo anual de matéria-prima (CMP) refere-se à quantidade (em US$) que a empresa gasta com a aquisição da matéria-prima, anualmente, para a produção do produto de interesse. Para esse cálculo, é necessário considerar a quantidade e o gasto de matéria-prima por batelada, assim como o número de bateladas anuais. Logo, o CMP foi calculado de acordo com a Equação 4.2. (PERLINGUEIRO, 2005).

$$CMP = \Sigma matérias - primas \frac{Massa\ (Kg)}{batelada} * \frac{preço\ (US\$)}{Kg} * \frac{batelada}{ano} \qquad \text{(Equação 4.2)}$$

Além do RV e CMP, outro parâmetro econômico relevante é o lucro bruto (LBI). O LBI é obtido através da operação de diferença entre o RV e o CMP (PERLINGEIRO, 2005).

Os cálculos, segundo os parâmetros definidos acima, têm o objetivo de demonstrar um cenário econômico visando a viabilidade do processo. Se o RV for menor, próximo ou um pouco maior do que o custo relativo à aquisição da matéria-prima (CMP), pode-se desconsiderar a viabilidade econômica do processo. Caso o cálculo de RV seja maior do que o CMP, o processo tem a possibilidade de ser viável, no entanto, é necessário um estudo econômico executado em maior nível de detalhamento (PERLINGEIRO, 2005).

5. Resultados e Discussão

5.1 Planejamento Experimental

O desenvolvimento de tecnologia para a produção de qualquer biomolécula passa por etapas iniciais de estudo e pesquisa, que inclui a minimização e otimização do meio de cultivo. Estudos voltados para a composição do meio de cultivo tem como propósito garantir resultados satisfatórios de produção e produtividade da molécula de interesse; assim como, reduzir os custos do processo. Neste trabalho, realizaram-se estudos de minimização dos componentes de meio de cultivo, trabalhando com dois diferentes planejamentos experimentais. O primeiro planejamento foi do tipo *Plackett-Burman* e 16 variáveis independentes foram estudadas. Na sequência, realizou-se um segundo *Plackett-Burman* contendo 11 variáveis independentes como parâmetros de estudo. A técnica do planejamento experimental permitiu, através da redução do número de componentes presentes no meio de cultivo, a minimização dos custos de produção. Sem comprometer a eficiência da produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta por *C. butyricum* NCIMB 8082, a redução dos componentes do meio de cultivo foi cuidadosamente realizada com auxílio do *software* Statistica 7.0.

5.1.1 *Plackett-Burman* com 16 variáveis independentes

Visto que a cepa em questão mostrou-se potencial produtora de 1,3-PDO, fez-se um levantamento na literatura da composição dos meios de cultivo utilizados para produção de 1,3-PDO a partir de glicerol e/ou glicerina bruta por *Clostridium* (PAPANIKOLAOU et al., 2000; CHATZIFRAGKOU et al., 2011; KAUR et al., 2012; CASALI et al., 2012; WILKENS et al., 2012; GUNGORMUSLER-YILMAZ et al., 2014). Através da análise crítica de diversos trabalhos de cunho científico, designou-se um meio de cultivo complexo como ponto de partida para o estudo da produção da biomolécula de interesse. O meio de cultivo proposto apresentava 16 componentes, e esses componentes foram a base inicial do estudo. A partir de então, iniciou-se o primeiro planejamento experimental PB contendo 16 variáveis independentes, conforme descrito no item 4.5.1.

Diante dos resultados, observou-se que a fonte de carbono, no caso o glicerol, já havia esgotado após 24 horas de fermentação, na grande maioria dos experimentos oriundos do planejamento experimental. Com isso, optou-se por realizar a análise estatística com base nos dados obtidos em 24 horas de experimento.

Para analisar os dados apresentados na Tabela 5.1, resultados obtidos em 24 horas de fermentação, realizou-se uma avaliação da significância dos parâmetros estudados por bases estatísticas. Estatisticamente, o parâmetro denominado *p-valor* permite identificar qualitativamente a relevância dos fatores. Quando os valores de *p-valor*, para cada um dos fatores e interações são menores ou iguais a 0,05, estes apresentam significância ou relevância estatística com confiabilidade superior a 95% (MONTGOMERY, 2003). Para a análise estatística dos resultados do PB foi utilizado o gráfico de Pareto gerado pelo programa *Statistica* 7.0.

Tabela 5.1 Resultados de crescimento celular, consumo de glicerol, produção e rendimento de 1,3-PDO utilizando *C. butyricum* após 24 horas de cultivo incubados em 37°C e 150 rpm nos ensaios do planejamento experimental *Placket-Burman* de 16 variáveis independentes.

Ensaio	ΔX (D.O.)	$\Delta_{glicerol}$ ($g.L^{-1}$)	1,3-PDO ($g.L^{-1}$)	$Y_{1,3\ PDO}$ ($g.g^{-1}$)
E1	0,00	0,00	0,00	0,00
E2	2,42	8,05	4,07	0,51
E3	0,00	3,12	0,00	0,00
E4	0,00	0,00	0,00	0,00
E5	0,00	0,00	0,00	0,00
E6	2,37	8,89	4,10	0,46
E7	0,00	0,00	0,00	0,00
E8	0,00	0,00	0,00	0,00
E9	0,00	0,00	0,00	0,00
E10	0,00	0,00	0,00	0,00
E11	0,66	1,76	0,35	0,20
E12	0,00	0,00	0,00	0,00
E13	0,00	0,00	0,00	0,00
E14	0,00	0,00	0,00	0,00
E15	0,00	0,00	0,00	0,00
E16	0,00	0,00	0,00	0,00
E17	0,00	0,00	0,00	0,00
E18	0,70	1,65	0,92	0,56
E19	2,22	7,42	3,33	0,45
E20	0,00	0,00	0,00	0,00
E21 (PC)	2,69	8,83	4,12	0,47
E22 (PC)	2,66	6,82	3,44	0,50
E23 (PC)	2,70	7,44	3,28	0,44
E24 (PC)	2,73	8,25	4,46	0,54

Crescimento celular (ΔX), glicerol consumido ($\Delta_{glicerol}$), produção de 1,3-PDO (1,3-PDO), rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido ($Y_{1,3\ PDO}$), densidade ótica a 600 nm (D.O.).

Analisando a Tabela 5.1 observa-se que em algumas condições não houve crescimento celular e, consequentemente, produção de 1,3-PDO em 24 horas de crescimento. Para que ocorra crescimento celular, a célula precisa de energia em forma de ATP e poder redutor. Essa geração de energia e poder redutor é permitida pelas ótimas condições de cultivo, incluindo a

quantidade e qualidade dos componentes do meio de cultivo. Se o meio de cultivo é pobre em elementos que permitam a geração de energia, ou se o mesmo é ausente de algum elemento fundamental, a célula não consegue crescer e se desenvolver. Sendo assim, pode-se afirmar que o crescimento celular em alguns experimentos do PB foi inviabilizado, possivelmente, pela ausência ou baixa concentração de algum nutriente ou cofator essencial para o metabolismo celular.

Diante dos resultados da Tabela 5.1, nota-se que os experimentos realizados nas condições dos ensaios E2 e E6 foram os que apresentaram os melhores resultados de produção de 1,3-PDO, quando comparados aos demais experimentos, exceto comparado à condição do ponto central.

A magnitude dos efeitos estimados é apresentada através da interpretação do gráfico de Pareto. O gráfico fornece o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis independentes possui sobre a variável resposta, estabelecido dentro do limite de confiança determinado para a análise (95% neste estudo). Foram analisadas como variáveis respostas, em 24 horas de fermentação, crescimento da biomassa, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido ($Y_{1,3\text{-}PDO}$).

Segundo análise de Pareto para a produção de biomassa em 24 horas de experimento (Figura 5.1), 11 variáveis se mostraram estatisticamente significativas na faixa estudada, entre elas, pH inicial, KH_2PO_4, $CuCl_2$, $MnCl_2.4H_2O$, NH_4Cl, extrato de levedo, $CaSO_4.2H_2O$, ácido cítrico, $MgSO_4.7\ H_2O$, $CoCl_2.2H_2O$, $NiCl_2.6H_2O$. Sendo que apenas 4 destas influenciam positivamente: KH_2PO_4, $CuCl_2$, pH inicial e $CaSO_4.2H_2O$.

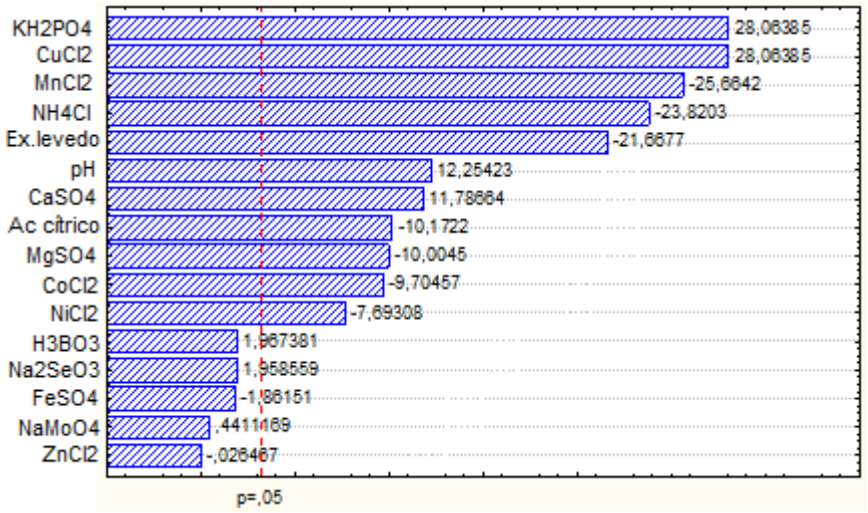

Figura 5.1 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 16 variáveis ao analisar como variável resposta a produção de biomassa obtida em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm.

Ao realizar a análise estatística em relação ao consumo de glicerol na amostragem de 24 horas, é possível obervar através do gráfico de Pareto (Figura 5.2) que cinco variáveis se mostraram estatisticamente significativas, entre elas, KH_2PO_4, $CuCl_2$, extrato de levedo, $MnCl_2.4H_2O$, $CaSO_4.7H_2O$. Sendo que destas, três influenciam positivamente: KH_2PO_4, $CuCl_2$ e $CaSO_4.7H_2O$.

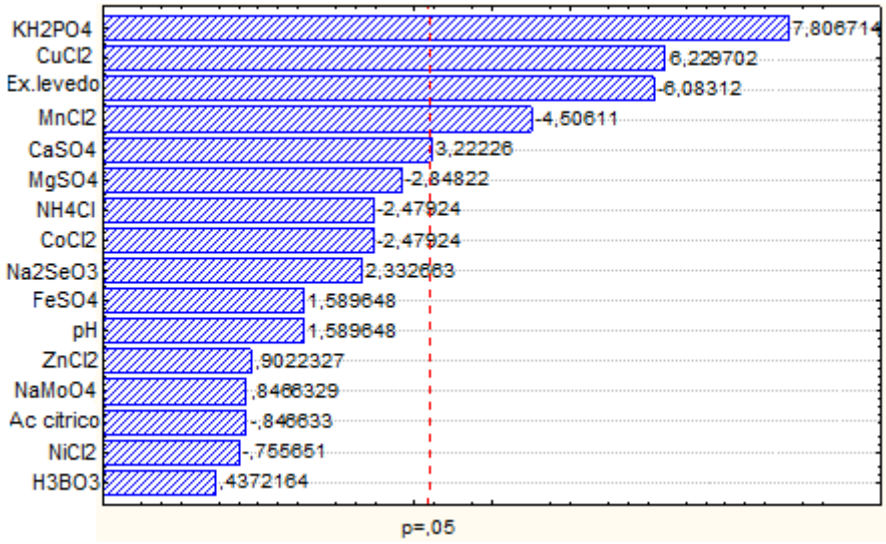

Figura 5.2 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 16 variáveis ao analisar como variável resposta o consumo de glicerol obtido em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm.

O gráfico de Pareto em relação a produção de 1,3-PDO após 24 horas de fermentação está apresentado na Figura 5.3. É possível avaliar que nesta análise seis variáveis se apresentaram estatisticamente significativas, dentre elas: pH inicial, KH_2PO_4, $CuCl_2$, extrato de levedo, $MnCl_2.4H_2O$ e NH_4Cl. Sendo que três destas influenciam positivamente: pH inicial, KH_2PO_4 e $CuCl_2$.

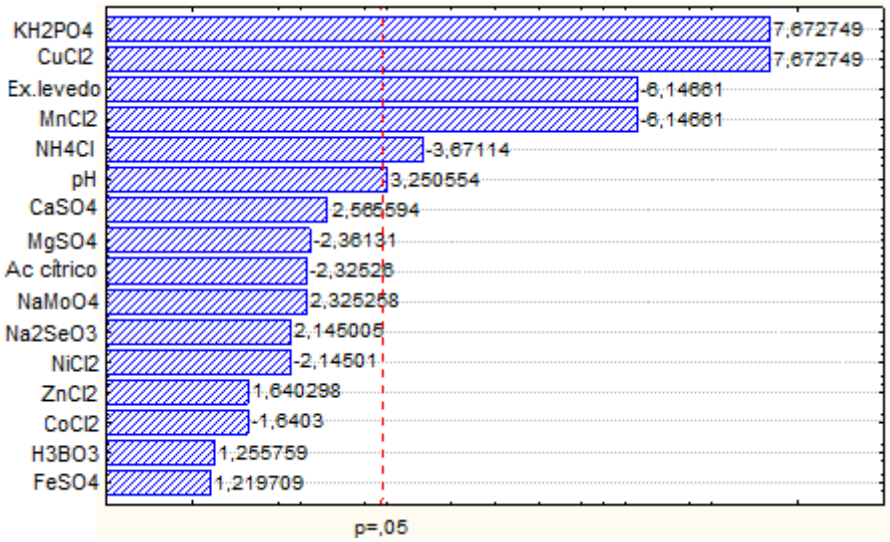

Figura 5.3 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 16 variáveis ao analisar como variável resposta a produção de 1,3-PDO obtida em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm.

Por último, para o rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido após 24 horas de fermentação (Figura 5.4), nove variáveis se mostraram estatisticamente significativas, entre elas, KH_2PO_4, $CuCl_2$, NH_4Cl, pH inicial, ácido cítrico, $NaMoO_4.2H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, extrato de levedo e $MnCl_2.4H_2O$. Sendo que apenas quatro influenciam positivamente: KH_2PO_4, $CuCl_2$, pH inicial e $NaMoO_4.2H_2O$.

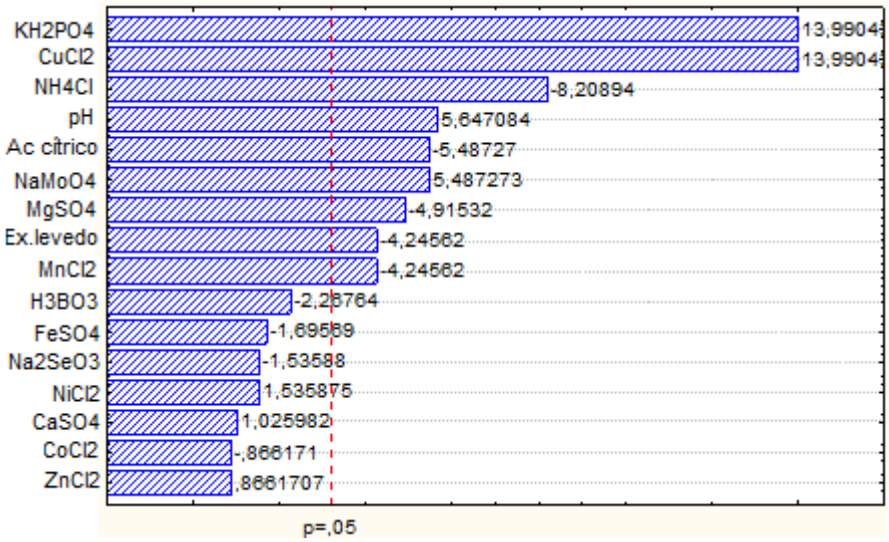

Figura 5.4 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 16 variáveis ao analisar como variável resposta o rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido obtido em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm.

Ao interpretar os resultados obtidos no planejamento PB, e os gráficos gerados pela análise estatística, foi possível definir uma composição mínima para o meio de cultivo, denominado $E_{mínimo}$, utilizado para produção de 1,3-PDO: pH inicial = 8,5; 3,0 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4; 1,0 $g.L^{-1}$ NH_4Cl; 0,02 $g.L^{-1}$ $CaSO_4.2H_2O$; 1,0 $g.L^{-1}$ extrato de levedo e 0,3 $mg.L^{-1}$ $CuCl_2$.

Na validação do resultado do PB optou-se por realizar três experimentos em frascos do tipo Schott®, a fim de investigar a produção de 1,3-PDO e o comportamento celular ao diferenciar as configurações e dimensões do fermentador. Os experimentos foram inoculados nas mesmas condições de temperatura e agitação do planejamento experimental (ver item 4.5.1). Entretanto, utilizou-se frasco do tipo Schott® contendo 250 mL de meio de cultivo e em regime de análise não destrutiva. Sendo eles:

1) Ensaio E2*: consiste na composição do meio de cultivo igual ao ensaio designado E2 do planejamento PB.
2) Ensaio E6*: consiste na composição do meio de cultivo igual ao ensaio designado E6 do planejamento PB.
3) Ensaio Emínimo*: consiste na composição do meio de cultivo igual ao meio $E_{mínimo}$ do planejamento PB.

Segue a Tabela 5.2 que tem o intuito identificar a composição do meio de cultivo para cada ensaio relacionado acima.

Tabela 5.2 Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios E2*, E6* e Emínimo*.

Componentes	Ensaios		
	E2*	E6*	Emínimo*
pH inicial do meio de cultivo	8,5	8,5	8,5
KH_2PO_4 ($g.L^{-1}$)	3	3	3
NH_4Cl ($g.L^{-1}$)	1	1	1
$MgSO_4.7H_2O$ ($g.L^{-1}$)	0,3	0	0
$CaSO_4.2H_2O$ ($g.L^{-1}$)	0,02	0,02	0,02
Ácido cítrico ($g.L^{-1}$)	0	0,5	0
Extrato de levedo ($g.L^{-1}$)	1	1	1
H_3BO_3 ($mg.L^{-1}$)	0	8	0
$CoCl_2.2\ H_2O$ ($mg.L^{-1}$)	0	3	0
$ZnCl_2$ ($mg.L^{-1}$)	1,5	0	0
$MnCl_2.4H_2O$ ($mg.L^{-1}$)	0	0	0
$NaMoO_4.2H_2O$ ($mg.L^{-1}$)	0,15	0	0
$NiCl_2.6H_2O$ ($mg.L^{-1}$)	0	0	0
$CuCl_2$ ($mg.L^{-1}$)	0,3	0,3	0,3
$FeSO_4.7H_2O$ ($mg.L^{-1}$)	20	0	0
$Na_2SeO_3.5H_2O$ ($mg.L^{-1}$)	0,3	0,3	0
Glicerina bruta ($g.L^{-1}$)	15	15	15

Conforme os resultados apresentados na Tabela 5.3 pode-se notar que o ensaio determinado de E2* foi a condição que apresentou uma maior concentração de 1,3-PDO em um tempo menor de ensaio, obtendo-se a melhor produtividade em comparação com as condições dos ensaios E6* e Emínimo*. No entanto, o ensaio Emínimo*, mesmo apresentando uma menor produtividade em relação as condições do ensaio E2*, ainda sim pode-se dizer que a mesma é satisfatória e apresenta somente seis componentes em sua composição, enquanto o ensaio E2* apresenta 11 componentes.

Diante destes dados, a etapa seguinte consistiu em verificar o desempenho das células de *C. butyricum* ao serem cultivadas em biorreator contendo meio de cultivo denominado **$E_{mínimo}$**, já que o teste em frasco Schott utilizando esse meio de cultivo apresentou resultados satisfatórios em 24 horas de fermentação. O resultado culminou na redução de cinco componentes quando comparado com as condições do ensaio E2*. Entretanto, ao reproduzir

esse experimento em biorreator utilizando vaso reacional de volume útil de 1 L, as células não apresentaram crescimento celular e geração do produto de interesse (dados não apresentados).

Vale ressaltar que em nenhum dos meios de cultivo apresentados na Tabela 5.2 existe a presença do íons manganês, cofator da PDOR, enzima descrita na literatura como responsável por aumentar os rendimentos de 1,3-PDO quando em plena atividade.

Tabela 5.3 Resultados de biomassa, concentração de glicerol, produção e rendimento de 1,3-PDO obtidos nas condições dos ensaios E2*, E6* e Emínimo* quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm.

Ensaios	Tempo (h)	Biomassa ($g.L^{-1}$)	Glicerol ($g.L^{-1}$)	1,3-PDO ($g.L^{-1}$)	$Q_{1,3PDO}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
	0	0,15	12,32± 0,15	0,00 ± 0,00	0,00
E2*	24	1,06 ± 0,02	0,10 ± 0,12	5,71 ± 0,12	0,24
	42	n.d	n.d	n.d	n.d
	0	0,11 ± 0,05	12,41 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,00
E6*	24	0,10 ± 0,03	12,20 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,00
	42	0,90 ± 0,02	4,240 ± 0,12	3,95 ± 0,18	0,16
	0	0,06 ± 0,04	11,82 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,00
Emínimo*	24	0,89 ± 0,06	2,32 ± 0.17	4,29 ± 0,11	0,18
	42	0,89 ± 0,09	1,88 ± 0,16	5,15 ± 0,11	0,12

Crescimento celular (Biomassa), concentração de glicerol (Glicerol), produção de 1,3-PDO (1,3-PDO), produtividade de 1,3-PDO ($Q_{1,3\ PDO}$).

n.d: não determinado

No entanto, o meio de cultivo do ensaio E2* é o único, dentre as outras condições testadas, que apresenta o íon ferro na forma de $FeSO_4.7H_2O$ em sua composição. O íon Fe também é um microelemento chave para o metabolismo celular. Sendo conhecido como um cofator importante para a ferredoxina-oxirredutase, enzima presente no metabolismo do *C. butyricum*, sua presença, além da presença de Mg, Zn e Mo, também considerados cofatores enzimáticos, possivelmente justifica a melhor produtividade e produção de 1,3-PDO apresentada nas condições do ensaio E2*. Além disso, a ausência desses microelementos no meio de cultivo $E_{mínimo}$ pode ser um dos fatores que explica a ausência da síntese de 1,3-PDO quando as células foram submetidas a escala de biorreator.

5.1.2 *Placket Burman* com 11 variáveis independentes

Visto que a primeira sequência de ensaios do planejamento experimental não foi suficiente para esclarecer todos os questionamentos relacionados a composição do meio de cultivo para produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta por *C. butyricum*, optou-se por realizar um segundo PB. Como descrito anteriormente (ver item 4.5.2), o segundo planejamento PB visou estudar a composição do meio de cultivo com base na composição usada no ensaio designado de E2*, visto que esse experimento foi o que apresentou desempenho satisfatório e apresenta em sua composição microelementos chaves para o metabolismo da célula em questão. Os resultados do planejamento PB de 11 variáveis estão dispostos na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Resultados de crescimento celular, consumo de glicerol, produção e rendimento de 1,3-PDO obtidos do planejamento experimental PB de 11 variáveis quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm após 24 horas de cultivo.

Ensaios	ΔX (D.O.)	$\Delta_{glicerol}$ ($g.L^{-1}$)	1,3-PDO ($g.L^{-1}$)	$Y_{1,3\ PDO}$ ($g.g^{-1}$)
F1	1,00	8,75	3,37	0,39
F2	1,65	8,61	4,48	0,52
F3	1,26	8,42	4,54	0,54
F4	1,60	9,03	4,29	0,48
F5	1,26	7,06	3,16	0,45
F6	1,90	7,87	6,11	0,60
F7	1,91	4,95	2,60	0,52
F8	2,54	7,37	4,95	0,67
F9	1,89	10,00	4,69	0,28
F10	0,92	7,14	4,16	0,58
F11	0,00	0,00	0,00	0,00
F12	1,06	10,00	5,34	0,44
F13	1,76	8,01	2,00	0,25
F14	1,28	5,98	1,78	0,30
F15	0,00	0,00	0,00	0,00
F16	0,00	0,00	0,00	0,00
F17 (PC)	1,77	9,84	3,86	0,36
F18 (PC)	1,72	8,55	3,79	0,44
F19 (PC)	1,83	8,01	3,55	0,44

Crescimento celular (ΔX), glicerol consumido ($\Delta_{glicerol}$), produção de 1,3-PDO (1,3-PDO), rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido ($Y_{1,3\ PDO}$), densidade ótica a 600 nm (D.O.).

Ao avaliar a Tabela 5.4 nota-se que somente três condições testadas não apresentaram crescimento celular e, consequentemente, produção de 1,3-PDO em 24 horas de cultivo. Pode-se considerar que os experimentos nesse segundo PB estão mais bem alinhados para a condição ideal de crescimento celular, já que somente três experimentos não apresentaram crescimento celular, sendo que no primeiro PB esse valor foi igual a 14.

Neste caso, a produção de 1,3-PDO atingiu concentração final de 6,11 $g.L^{-1}$, com uma amplitude de resultados de produção de 1,3-PDO igual a 4,33 $g.L^{-1}$. Diante dessa faixa de amplitude dos resultados de produção, pode-se considerar que os diferentes componentes do

meio de cultivo são significativos na produção de 1,3-PDO. A variação da concentração de 1,3-PDO em torno do no ponto central igual a 0,31 $g.L^{-1}$, com variabilidade menor do que 10%, permite afirmar que os resultados do planejamento experimental podem ser considerados reprodutíveis. Já, os experimentos realizados nas condições dos ensaios F6 e F12 foram os que obtiveram os maiores resultados de produção de 1,3-PDO, quando comparados aos demais experimentos do planejamento experimental.

A fim de avaliar estatisticamente os resultados foram selecionadas como variáveis resposta a concentração de biomassa, o consumo de glicerol, a produção de 1,3-PDO e o rendimento de 1,3-PDO em relaçao ao substrato consumido. Os gráficos de Pareto para cada uma das variáveis estão representados nas Figuras 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8, respectivamente.

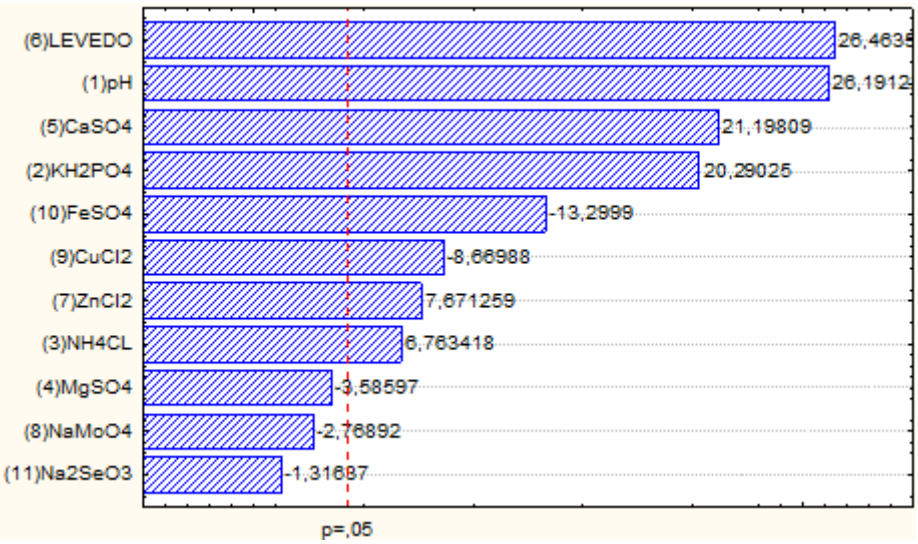

Figura 5.5 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 11 variáveis ao analisar como variável resposta a produção de biomassa em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm.

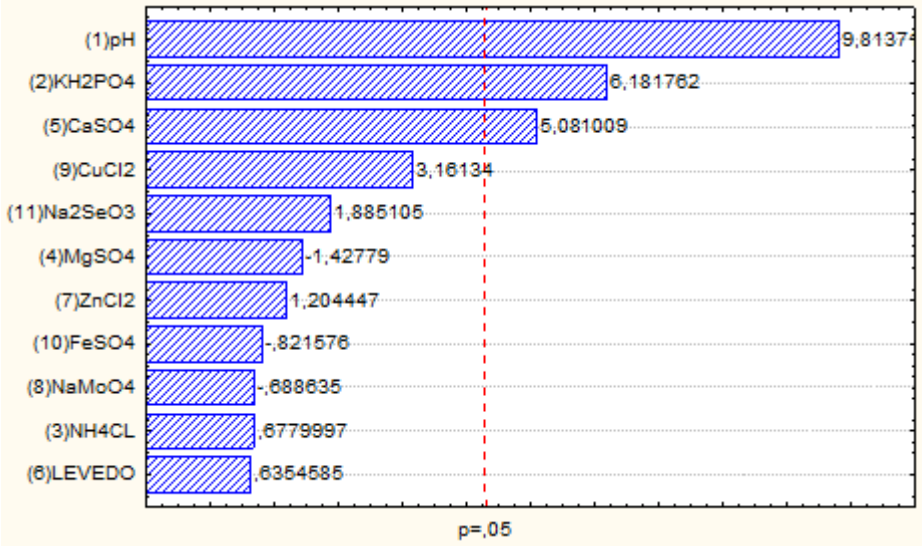

Figura 5.6 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 11 variáveis ao analisar como variável resposta o consumo de glicerol em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm.

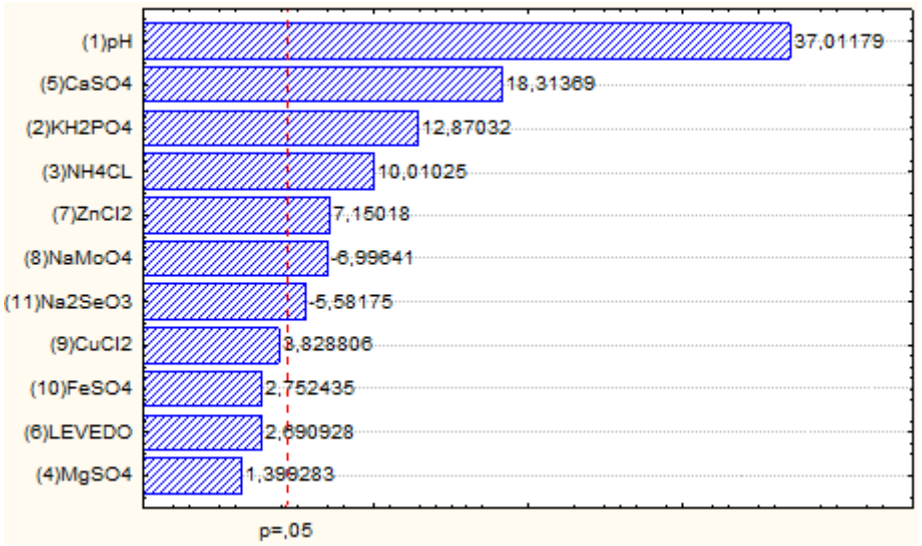

Figura 5.7 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 11 variáveis ao analisar como variável resposta a produção de 1,3-PDO em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm.

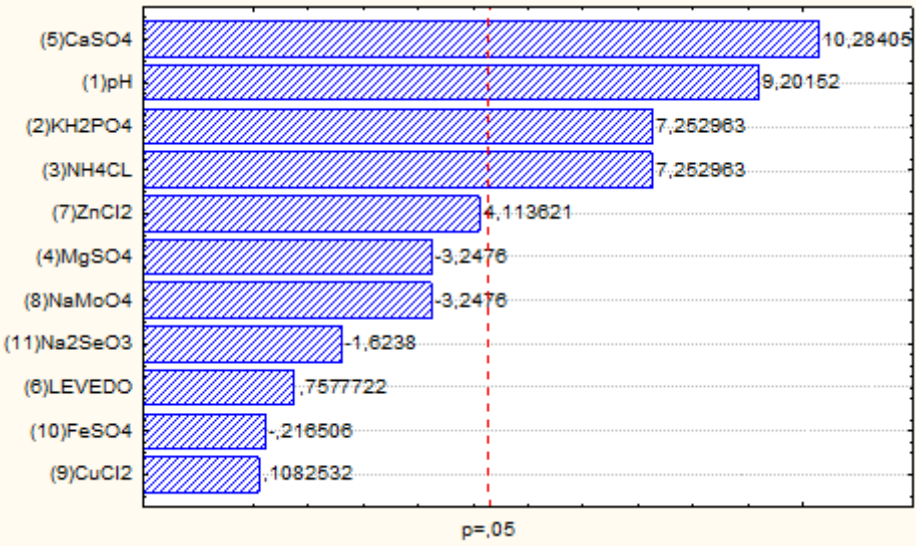

Figura 5.8 Gráfico de Pareto do planejamento experimental *Plackett-Burman* de 11 variáveis ao analisar como variável resposta o rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido em 24 horas de cultivo quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm.

Ao avaliar os efeitos das variáveis, por meio do diagrama de Pareto, pode-se obter as seguintes interpretações:

1) Em relação à produção de biomassa (Figura 5.5), oito variáveis se mostraram estatisticamente significativas. Entre elas, seis possuem influência positiva: extrato de levedo, pH inicial, $CaSO_4$, KH_2PO_4, $ZnCl_2$ e NH_4Cl.

2) Em relação ao consumo de glicerol (Figura 5.6), três variáveis independentes se apresentaram com significância positiva: pH inicial, $CaSO_4$ e KH_2PO_4.

3) Em relação a produção de 1,3-PDO (Figura 5.7), cinco variáveis foram significativas com efeito positivo: pH inicial, $CaSO_4$, KH_2PO_4, $ZnCl_2$ e NH_4Cl.

4) Em relação a conversão de glicerol em 1,3-PDO (Figura 5.8), quatro variáveis tiveram efeito significativo positivo, são elas: pH inicial, $CaSO_4$, KH_2PO_4 e NH_4Cl.

Através dos resultados do planejamento experimental PB com 11 variáveis independentes, o meio mínimo obtido neste segundo planejamento experimental tem a seguinte composição: pH inicial do meio de cultivo igual a 8,5, 0,02 $g.L^{-1}$ de $CaSO_4$, 3,0 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4,1,5 $mg.L^{-1}$ $ZnCl_2$ e 1,0 $g.L^{-1}$ NH_4Cl.

A fim de validar o resultado do planejamento experimental e verificar o comportamento celular no meio mínimo, denominado $F_{mínimo}$, testes foram executados em frasco Schott® de 250 mL contendo 200 mL de meio de cultivo e incubados nas mesmas condições do planejamento experimental. Contudo, o resultado encontrado não foi satisfatório (dados não apresentados), pois as células não foram capazes de crescer no meio de cultivo $F_{mínimo}$. Possivelmente, a ausência de crescimento celular quando as células foram submetidas a esta última composição de meio de cultivo está diretamente relacionada a ausência do extrato de levedo, reagente que apresenta-se como uma fonte de nitrogênio, aminoácidos e vitaminas importantes para o metabolismo celular.

Sendo assim, o passo seguinte foi realizar novos experimentos com base nos ensaios do planejamento que apresentaram os melhores resultados (ensaios testados nas condições de F6 e F12, ambos apresentando extrato de levedo em sua composição). Logo, esses experimentos foram realizados a fim de verificar a importância do extrato de levedo para o metabolismo celular. Além disso, nesses ensaios foi verificada a influência de $NaMoO_4$ e Na_2SeO_3, , reagentes que apresentaram respostas duvidosas quanto a sua relevância para a cepa em questão, visto que eles apresentaram várias vezes valores de *p*-valor menores ou iguais a 0,05, indicando significância ou relevância estatística com confiabilidade superior a 95%. Os ensaios estão abaixo discriminados.

Ensaio F6*: consiste na composição do meio de cultivo igual ao ensaio designado F6 do PB de 11 variáveis.

1) Ensaio F6**: consiste na composição do meio de cultivo igual ao ensaio designado F6 do PB de 11 variáveis, ausente de extrato de levedura (confirmação da importância do extrato para o metabolismo celular).
2) Ensaio F12*: consiste na composição do meio de cultivo igual ao ensaio designado F12 PB de 11 variáveis.
3) Ensaio Fmínimo*: consiste na composição do meio de cultivo $F_{mínimo}$, obtido no PB de 11 variáveis, acrescido de $NaMoO_4$ e Na_2SeO_3 (reagentes que ainda há dúvidas quanto a sua relevância para as células).

A Tabela 5.5 apresenta a composição do meio de cultivo para cada um dos experimentos testados.

Tabela 5.5 Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios F6*, F6, F12* e Fmínimo*.**

Componentes	Ensaios			
	F6*	**F6****	**F12***	**Fmínimo***
pH inicial do meio de cultivo	8,5	8,5	8,5	8,5
KH_2PO_4 ($g.L^{-1}$)	1	3	1	3
NH_4Cl ($g.L^{-1}$)	1	1	0	1
$MgSO_4.7H_2O$ ($g.L^{-1}$)	0,3	0,3	0,3	0
$CaSO_4.2H_2O$ ($g.L^{-1}$)	0,02	0,02	0,02	0,02
Extrato de levedo ($g.L^{-1}$)	1	0	1	0
$ZnCl_2$ ($mg.L^{-1}$)	0	0	1,5	1,5
$NaMoO_4.2H_2O$ ($mg.L^{-1}$)	0	0	0	0,075
$CuCl_2$ ($mg.L^{-1}$)	0	0	0,3	0
$FeSO_4.7H_2O$ ($mg.L^{-1}$)	20	20	20	0
$Na_2SeO_3.5H_2O$ ($mg.L^{-1}$)	0	0	0,3	0,15
Glicerina bruta ($g.L^{-1}$)	25	25	25	25

A Tabela 5.6 apresenta os resultados obtidos nos ensaios denominados F6*, F6**, F12* e Fmínimo*. É possível avaliar que o ensaio determinado de F6** (sem extrato de levedo) apresentou uma fase lag estendida. Consequentemente, a produção de 1,3-PDO só foi observada na amostragem de 42 horas. Provavelmente, neste ensaio, a ausência de extrato de levedo retardou o crescimento celular, o que é um resultado não satisfatório quando considera-se a produtividade do processo. O ensaio F12* teve rendimento e produtividade, em 24 horas de fermentação, similares às condições dos experimentos F6* e Fmínimo. Entretanto, o meio de cultivo utilizado no ensaio F12* apresenta dois componentes a mais do que os meios utilizados nos ensaios F6* e Fmínimo*. Sendo assim, experimentos que apresentaram condições de cultivo com crescimento e produção de 1,3-PDO satisfatórios e com a menor quantidade de componentes na composição do meio - ambos contendo sete componentes - foram os ensaios testados nas condições de F6* (contendo extrato de levedo) e Fmínimo* (ausente de extrato de levedo).

Diante dos resultados, nos quais observou-se a importância do extrato de levedo no crescimento celular, optou-se por trabalhar com o meio de cultivo utilizado no ensaio designado F6*, contendo extrato de levedo. Sabendo que a ausência do extrato de levedo implicou em uma maior fase lag de crescimento, pode-se considerar que o meio de cultivo ausente de extrato de levedo impactataria diretamente na produtividade do processo. O meio testado nas condições do ensaio F6*, denominado de **meio de cultivo minimizado,** obtido no presente estudo contém: 1,0 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 1,0 $g.L^{-1}$ NH_4Cl, 0,3 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$, 0,02 $g.L^{-1}$ $CaSO_4.2H_2O$, 20,0 $mg.L^{-1}$ $FeSO_4.7H_2O$ e 1,0 $g.L^{-1}$ extrato de levedo, além da glicerina bruta como fonte de carbono. A validação do meio de cultivo minimizado, em escala de reator, foi realizada e os resultados experimentais estão demonstrados no item 5.3.

Tabela 5.6 Resultados de biomassa, concentração de glicerol, 1,3-PDO e rendimento em 1,3-PDO obtidos nos ensaios nomeados de F6*, F6, F12* e Fmínimo* quando as células foram incubadas a 37°C e 150 rpm.**

Ensaio	Tempo (h)	Biomassa ($g.L^{-1}$)	Glicerol ($g.L^{-1}$)	1,3-PDO ($g.L^{-1}$)	$Y_{1,3PDO}$ ($g.g^{-1}$)	$Q_{1,3PDO}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
F6* **(com extrato de levedo)**	0	0,44 ± 0,06	21,66 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
	24	3,17 ± 0,02	13,39 ± 0,10	4,48 ± 0,12	0,54	0,19
	42	2,77 ± 0,04	13,40 ± 0,16	4,63 ± 0,15	0,56	0,11
F6** **(sem extrato de levedo)**	0	0,39 ± 0,03	21,29 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,00-	0,00
	24	0,34 ± 0,04	21,32 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,00-	0,00
	42	2,01 ± 0,08	14,29 ± 0,19	3,76 ± 0,11	0,54	0,12
F12*	0	0,47 ± 0,01	21,39 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
	24	2,58 ± 0,06	14,67 ± 0,12	3,96 ± 0,12	0,59	0,16
	42	2,44 ± 0,03	14,68 ± 0,17	4,09 ± 0,16	0,60	0,09
Fmínimo* **($NaMoO_4$ + Na_2SeO_3)**	0	0,42 ± 0,05	21,66 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,00-	0,00
	24	2,38 ± 0,01	13,35 ± 0,18	4,43 ± 0,15	0,53	0,18
	42	2,39 ± 0,04	13,37 ± 0,12	4,42 ± 0,12	0,53	0,10

Crescimento celular (Biomassa); concentração de glicerol (Glicerol); produção de 1,3-PDO (1,3-PDO), rendimento de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido ($Y_{1,3\ PDO}$); produtividade de 1,3-PDO ($Q_{1,3\ PDO}$);

Os artigos reportados na literatura estudam a produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* utilizando majoritariamente meios de cultivo complexos (BARBIRATO et al., 1996; CHATZIFRAGKOU, et al., 2011; COLIN et al., 2000; TEE et al., 2017; WILKENS et al., 2012), contendo inúmeros componentes, entre eles vitaminas e minerais – elementos que oneram o custo do meio de cultivo, e por consequência, impacta na viabilidade econômica do bioprocesso. Nas buscas à literatura, verificou-se um único trabalho de autoria de Szymanowska-Powałowska (2014) que utiliza um meio de cultivo para a produção de 1,3-PDO em biorreator com uma composição reduzida em termos de componentes (0,26 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4, 0,02 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 1,23 $g.L^{-1}$ de $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4.7H_2O$, 0,01 $g.L^{-1}$ de $CaSO_4.2H_2O$, 0,01 $g.L^{-1}$ de $FeSO_4$. $7H_2O$ e extrato de levedo - variando a concentração a concentração dos elementos de acordo com a concentração de glicerol aplicada inicialmente. No entanto, a produtividade de 1,3-PDO ao utilizar glicerina bruta no regime de batelada simples obtida por Szymanowska-Powałowska (2014) varia de 0,22 a 0,94 $g.L^{-1}.h^{-1}$, valor de

produtividade consideravelmente inferior aos resultados encontrados no presente trabalho quando trabalhou-se em escala de reator (vide tabela 5.8).

Para o estudo de minimização do meio de cultivo do presente estudo, demonstra-se um comparativo relacionando o número de componentes e o custo do meio de cultivo (US$.L^{-1}). A Figura 5.9 apresenta essa comparação, para cada composição de meio trabalhado antes e após a aplicação dos planejamentos experimentais. É possível observar que, ao substituir o meio complexo (antes do 1º PB) por o meio minimizado (resultado das análises estatísticas dos dois planejamentos experimentais executados), houve a eliminação de nove componentes. A ausência destes 9 componentes desdobrou em uma diminuição drástica no preço do meio de cultivo, redução essa que permitiu um decaimento do preço de 1,21 US$.L^{-1} para 0,46 US$.L^{-1}. Os valores representam uma redução de 62% no preço do meio de cultivo para a produção de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta utilizando *C. butyricum*. O decréscimo dos custos referentes ao meio de cultivo pode ser julgado como uma etapa importante para a viabilização da produção de 1,3-PDO via rota biotecnológica, visto que, conforme já mencionado, o meio de cultivo pode representar mais da metade do custo total da produção.

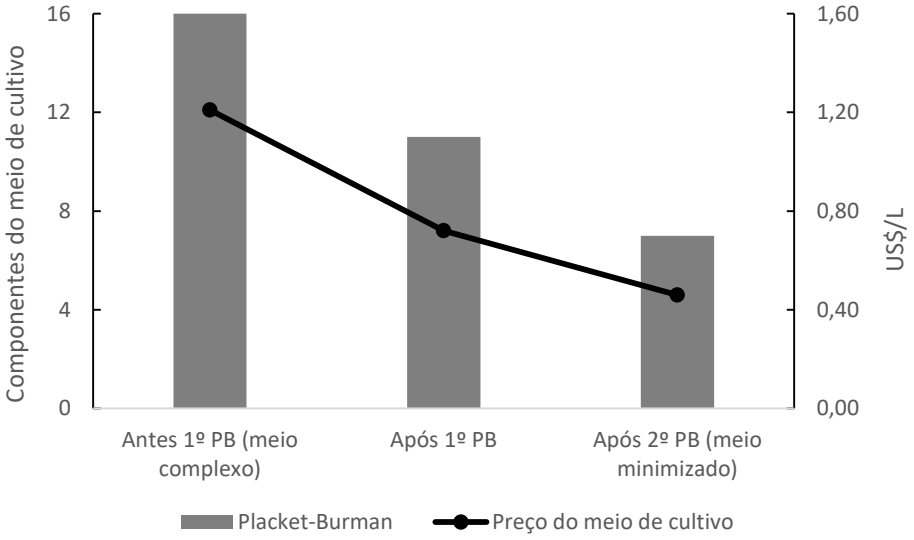

Figura 5.9 Comparação do número de componentes do meio de cultivo e do preço do meio de cultivo antes e após cada etapa do estudo de minimização do meio de cultivo. O estudo de minimização foi realizado através da aplicação dos planejamentos experimentais do tipo Plackett-Burman sucessivos.

5.2 Avaliação da influência do cofator Manganês (Mn^{2+}) sobre a produção de 1,3-PDO

1,3-propanodiol oxidoredutase (PDOR), enzima que catalisa a conversão de 3-HPA a 1,3-PDO, necessita somente de Mn^{2+} para exercer completa atividade (SAXENA et al. 2009). Ao verificar a ausência deste cofator no meio minimizado (definido no item 5.1) foi proposto o estudou da adição de sais de $MnCl_2.4H_2O$ ao meio de cultivo em questão. O estudo foi desenvolvido porque acredita-se que a enzima PDOR esteja com a sua atividade reduzida, diante da carência de íons Mn^{2+} no meio de cultivo. Com isso, avaliou-se a inserção deste íon no meio minimizado, trabalhando com a adição do mesmo em três diferentes concentrações (vide Tabela 4.5).

A hipótese levantada e que conduziu esse estudo é que, caso a via oxidativa de *C.butyricum* esteja trabalhando em um fluxo normal e a atividade da enzima PDOR esteja reduzida, pode-se gerar um excesso de $NADH_2$ intracelular. Esse excesso de poder redutor pode estar direcionando o fluxo da via metabólica para a produção de subprodutos, como por exemplo, ácido butírico – produto indesejável devido sua competição pela molécula de $NaDH_2$. No entanto, conforme dados apresentados na Figura 5.10, observa-se que a presença do íon manganês no meio minimizado, na faixa de concentração estudada não apresentou diferença significativa no crescimento celular de *C. butyricum* e, ainda, na produção de 1,3-PDO. Por consequência, pode-se dizer que a enzima PDOR não apresenta limitação provocada pelo cofator manganês, na faixa em estudo. Isso porque a suplementação de diferentes concentrações do íon manganês ao meio minimizado, não influenciou significativamente a produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* em fermentações contendo glicerina bruta.

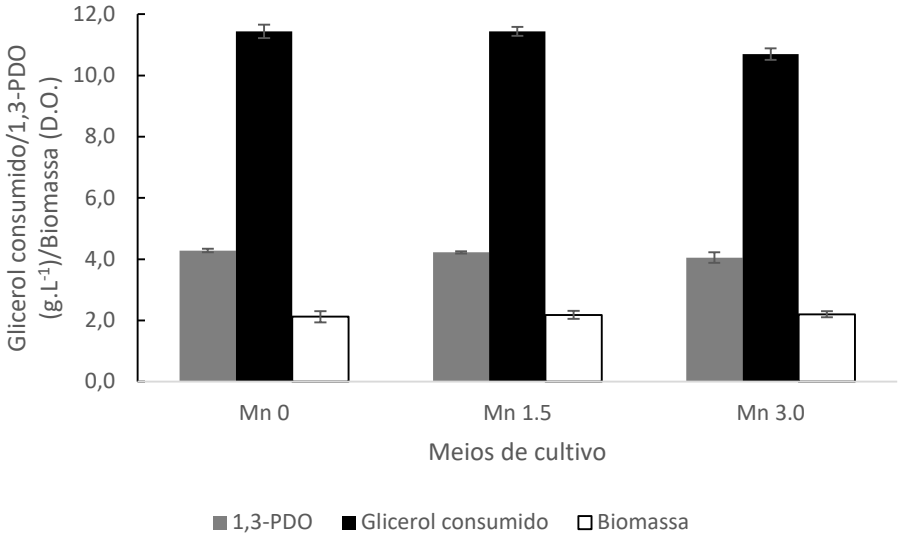

Figura 5.10 Resultados obtidos de produção de 1,3-PDO, consumo de glicerol e crescimento celular para o estudo de diferentes concentrações de Mn^{2+} suplementado ao meio minimizado para a produção de 1,3-PDO por *C. butyricum*. Os ensaios foram realizados em frascos de soro e incubados a 37°C e 150 rpm por 24 horas. O experimento Mn 0 representa o teste contendo meio de cultivo ausência de $MnCl_2.4H_2O$, Mn 1.5 contendo1,5 $g.L^{-1}$ de $MnCl_2.4H_2O$ e Mn 3.0 contendo 3,0 $g.L^{-1}$.

5.3 Produção de 1,3-PDO em biorreator de volume útil de 1 L

Conforme descrito no capítulo 4 (item 4.7) ensaios em biorreator de volume útil de 1 L foram realizados a fim de investigar as condições operacionais promissoras para produção de 1,3-PDO por *C.butyricum* NCIMB 8082 a partir de glicerina bruta.

5.3.1 Estratégias 1 e 2

Ao iniciar o estudo em biorreator os planejamentos experimentais estavam sendo executados paralelamente, por isso as Estratégias 1 e 2 foram testadas com a composição do meio de cultivo igual ao do ensaio designado F19 (ponto central do PB de 11 variáveis).

Neste conjunto de experimentos operacionais denominados de Estratégia 1 e 2, as células foram crescidas em frasco Schott por aproximadamente 18 horas a 150 rpm e 37°C. Após crescidas, foram inoculadas em biorreator contendo meio de cultivo igual aquele proposto no ponto central do PB de 11 variáveis (vide Tabela 4.4). A única diferença entre estas

estratégias é o modo operacional da fermentação, a Estratégia 1 foi conduzida em batelada simples e, a Estratégia 2, em batelada alimentada.

Nas Figuras 5.11 e 5.12 é possível visualizar o perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, ácido acético e ácido butírico da fermentação de *C. butyricum* crescendo segundo as Estratégias 1 e 2, respectivamente.

Ao avaliar o ensaio realizado em batelada simples (Figura 5.11), observa-se que as células apresentam uma fase de adaptação (fase lag) de 2 horas após inoculação, alcançando uma densidade celular de 12,40 D.O. após 12,8 horas de experimento. Enquanto que, a síntese dos bioprodutos, incluindo 1,3-PDO, iniciou a partir de aproximadamente 3 horas após inoculação das células. No final da fermentação, a concentração de glicerol residual foi de 5,97 $g.L^{-1}$ e a concentração final de 1,3-PDO foi de 32,18 $g.L^{-1}$. Para esse ensaio a produtividade atingiu o valor de 2,38 $g.L^{-1}.h^{-1}$.

Já, no ensaio executado em batelada alimentada (Figura 5.12), a fase de adaptação foi menor (~ 1h), obtendo ao final de 11 horas de experimento a produção de 1,3-PDO final de 29,83 $g.L^{-1}$ e produtividade 2,55 $g.L^{-1}.h^{-1}$.

Segundo Gungormusler-Yilmaz et al.(2014) ao crescerem células de *C. butyricum* DSM 10702 em diferentes concentrações iniciais de glicerol, os dados obtidos para o perfil cinético do crescimento celular revelaram que a fase de adaptação se prolongava, concomitantemente ao aumento da concentração inicial de substrato. No presente estudo, também foram observados resultados similares ao apresentado por Gungormusler-Yilmaz et al.(2014), isso porque uma maior da fase de adaptação das células foi visualizada no ensaio onde trabalhou-se com a maior concentração inicial de glicerol. A retração da fase lag, no ensaio operado em batelada alimentada, o qual foi iniciado com uma menor concentração de glicerol, ratifica a importância de trabalhar com o cultivo em uma concentração ótima de substrato, disponibilizando-o na quantidade ideal, evitando assim, que a pressão osmótica resultante de altas concentrações de substrato influencie no metabolismo celular, causando uma repressão catabólica.

Ao trabalhar com um consumo de aproximadamente 58 $g.L^{-1}$ de glicerol em ambas as estratégias realizadas (batelada simples e batelada alimentada), a fermentação não apresentou diferenças significativas em termos das variáveis cinéticas, possivelmente porque essa concentração ainda não é suficiente para inferir variações significativas no metabolismo celular. Porém, quando se tratam de concentrações de glicerina bruta acima de 100 $g.L^{-1}$, o metabolismo

celular pode ser afetado. Essa afirmativa poderá ser corroborada ao longo deste capítulo, ao discutir os resultados das estratégias de operação testadas.

Como foi possível analisar, a produção de biomassa e o consumo de glicerol são praticamente similares quando compara as Estratégias 1 e 2 são comparadas. Já a produção de 1,3-PDO foi levemente superior na operação em batelada simples. Porém, como o tempo necessário para consumir o glicerol e atingir a concentração de 1,3-PDO igual a 30,50 $g.L^{-1}$ foi maior na batelada simples do que na batelada alimentada, a produtividade do cultivo foi inferior na batelada simples. Vale ressaltar que apesar da produtividade ter sido maior na batelada alimentada, a diferença entre os valores não se mostrou expressivo entre os dois modos de condução do processo (vide Tabela 5.8).

Resultados de concentração final de 1,3-PDO similares aos determinados nas Estratégias 1 e 2 foram reportados na literatura por Szymanowska-Powałowska (2014). O estudo investigou a síntese de 1,3-PDO por *C. butyricum* DSP1 a partir de glicerina bruta por batelada simples e obteve uma concentração máxima de 31,8 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO e uma produtividade de 0,79 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Ao comparar os dados de produtividade, é possível dizer que a produtividade de aproximadamente 2,4 $g.L^{-1}.h^{-1}$ obtida nas condições das Estratégias 1 e 2 é significativamente maior do que a apresentada na publicação citada.

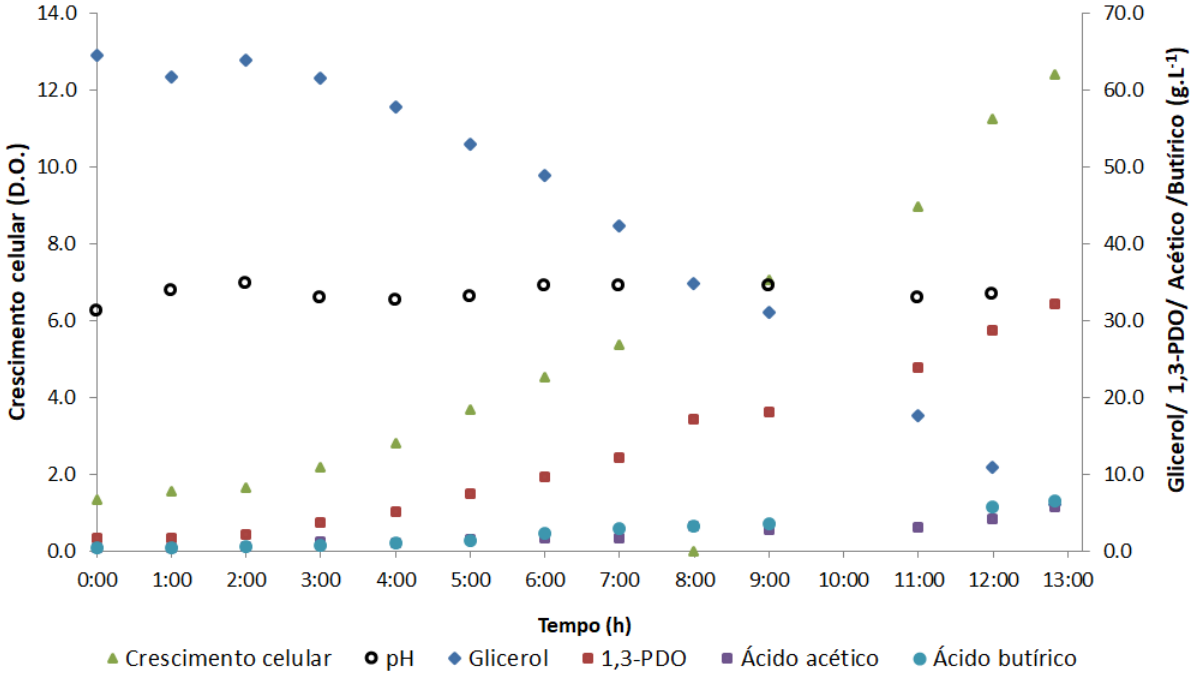

Figura 5.11 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, ácido butírico e ácido acético quando as células foram crescidas externamente ao biorreator de 1 L a 37°C e 200 rpm sem ajuste automático de pH e o ensaio foi realizado em regime de batelada simples utilizando meio de cultivo complexo (Estratégia 1).

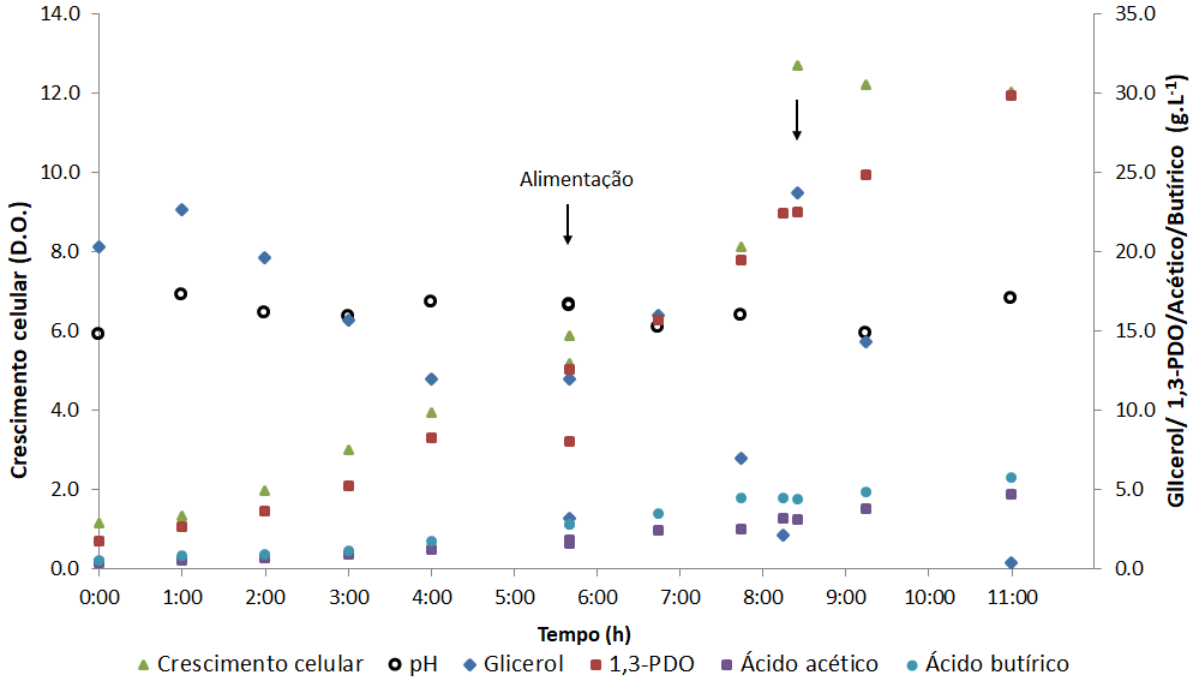

Figura 5.12 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, ácido butírico e ácido acético quando as células foram crescidas externamente ao biorreator de 1 L a 37°C e 200 rpm sem ajuste automático de pH e o ensaio foi realizado em regime de batelada alimentada utilizando meio de cultivo complexo (Estratégia 2).

5.3.2 Estratégias 3

Na estratégia em questão o crescimento celular foi realizado no biorreator, sem ajuste automático de pH e o meio de cultivo utilizado foi o meio minimizado. Para informações sobre o meio minimizado consulte o item 5.1.

Dessa maneira, ao realizar o experimento no qual as células foram incubadas diretamente no biorreator e crescidas *overnight* sem ajuste de pH (denominada de etapa de crescimento celular), identificou-se que, na etapa de obtenção do produto de interesse em batelada alimentada e acompanhada por 12 horas, a produção final de 1,3-PDO foi de 45,21 $g.L^{-1}$, com produtividade de 3,50 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (Figura 5.13). Essa produtividade alcançada foi obtida quando se trabalhou com o ensaio na condição de batelada alimentada, o que pode ser decorrente da minimização dos efeitos inibitórios causados pela alta concentração de substrato, visto que nesse caso cada alimentação continha aproximadamente 20 $g.L^{-1}$ de glicerol. Além disso, ao comparar os resultados cinéticos dessa condição estudada com os experimentos nos quais as células foram crescidas em frasco Schott (Estratégia 1 e 2), verifica-se um aumento da produtividade de 45,84 %. Esse aumento expressivo pode estar diretamente relacionado à ausência da fase lag verificada na Estratégia 3, quando as células crescem direto no reator e, também, com o caráter inibitório da glicerina bruta, visto que o experimento foi conduzido em batelada alimentada.

O rendimento da conversão desta fermentação foi de 0,41 g de 1,3-PDO por g de glicerol consumido ($g.g^{-1}$). As Estratégias 1 e 2 apresentaram rendimentos maiores, 0,52 $g.g^{-1}$ e 0,48 $g.g^{-1}$, respectivamente. A diminuição do rendimento pode estar relacionada com diversos fatores, incluindo a minimização do meio de cultivo. É possível que na etapa de minimização do meio de cultivo tenha-se excluído nutrientes e/ou cofatores enzimáticos importantes para o metabolismo celular de *C. butyricum* e, consequentemente, para a produção de 1,3-PDO visto que esse regime de produção é associado ao crescimento. Sendo assim, há a hipótese de que a ausência desses componentes implicaria diretamente na diminuição do rendimento do produto de interesse. Analisando a via metabólica da fermentação anaeróbica de glicerol por *C. butyricum* apresentada na Figura 3.7, observa-se que na etapa de geração de biomassa a molécula de $NADH_2$ é produzida. Esse poder redutor é consumido na conversão de 3-HPA a 1,3-PDO pela enzima PDOR. Logo entende-se o porquê da produção de 1,3-PDO ser associada ao crescimento celular, visto que se não houver $NADH_2$ a via interromperá a produção de 1,3-PDO. Os resultados desse estudo estão de acordo com a afirmativa de Gungormusler-Yilmaz

et al. (2014). Os autores citam que a síntese de 1,3-PDO, na presença de glicerol como única fonte de carbono, ocorre concomitantemente a fase de crescimento exponencial de *C.butyricum*. Logo, neste caso, o gráfico da Figura 5.13 corrobora através dos dados experimentais que a produção de 1,3-PDO é associada ao crescimento celular, isso porque as curvas referentes ao crescimento celular e a geração de 1,3-PDO apresentam perfis similares.

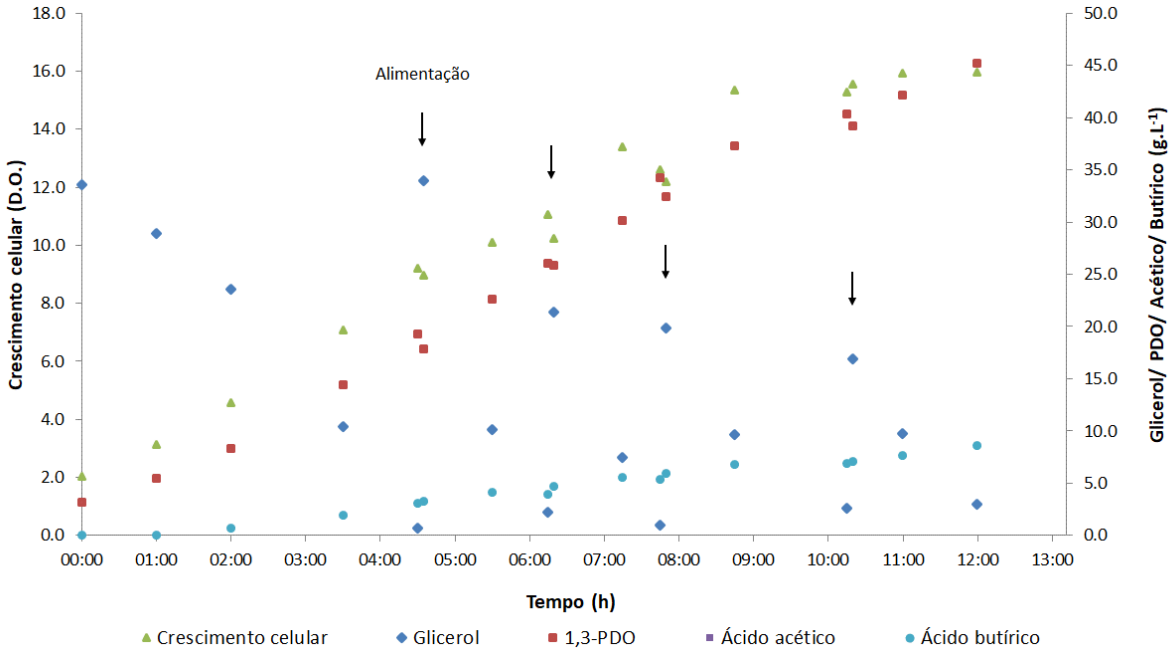

Figura 5.13 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, ácido butírico e ácido acético obtidos quando as células foram crescidas diretamente em biorreator de 1 L a 37°C e 200 rpm sem ajuste automático de pH e o ensaio foi realizado em batelada alimentada utilizando o meio de cultivo minimizado (Estratégia 3).

5.3.3 Estratégias 4 e 5

A partir da Estratégia 4, todos os experimentos foram executados utilizando o meio minimizado obtido como resultado dos planejamentos experimentais. A principal modificação implementada nas Estratégias 4 e 5, foi o ajuste automático de pH. Nestes dois casos, foi realizado ajuste automático de pH da fermentação na etapa de crescimento celular (*overnight*) e na etapa de produção de 1,3-PDO, não executado nas estratégias anteriores, denominadas Estratégias 1, 2 e 3.

Ao conduzir o teste conforme as condições determinadas na Estratégia 4, foi possível verificar que, ao aplicar o controle automático de pH na etapa de crescimento celular, a

produção de 1,3-PDO já é iniciada a partir desta fase da fermentação. Nesta estratégia, a produção de 1,3-PDO atingiu a concentração final de 72,52 $g.L^{-1}$, com uma produtividade máxima de 3,85 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Ao inserir o controle automático de pH na Estratégia 4, verifica-se que a produtividade teve um aumento de aproximadamente 10% em relação a Estratégia 3.

Produtividades similares àquela obtida na Estratégia 4 são reportadas na literatura (entre 3,1 e 3,5 $g.L^{-1}.h^{-1}$). Porém, esses valores só foram possíveis quando se trabalhou com cepas geneticamente modificadas e com meio de cultivos complexos, na grande maioria dos casos, operando em modo contínuo. Até mesmo o processo patenteado pela Dupont, empresa majoritária do mercado de produção 1,3-PDO via rota biológica, apresenta produtividade de 3,5 $g.L^{-1}.h^{-1}$ e uma concentração final de 135 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO (NAKAMURA E WHITED, 2003; SABRA et al., 2015). Entretanto, vale salientar que o processo de produção desenvolvido pela empresa utiliza um biocatalisador modificado geneticamente e, no presente estudo, a cepa não apresenta quaisquer modificações, é um organismo selvagem.

A Figura 5.14 apresenta os resultados obtidos quando foi testada a produção de 1,3-PDO proposta conforme a condição estabelecida na Estratégia 5. Ao alimentar o reator com concentrações próximas a 150 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta ocorreu uma estagnação do consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e crescimento celular. A desaceleração do metabolismo da célula indica que, possivelmente, a alta concentração de substrato inicial provocou o estresse do microrganismo e, consequentemente, a inibição do metabolismo celular. A elevada concentração de glicerol causa uma condição de estresse ambiental devido ao aumento da pressão osmótica do sistema, fato que compromete diretamente a atividade biológica do organismo vivo.

A literatura cita que a concentração de substrato capaz de causar inibição do crescimento celular varia de 70 $g.L^{-1}$ a 110 $g.L^{-1}$ de glicerol e depende majoritariamente da tolerância de cada organismo vivo (KAUR et al., 2012b; KUBIAK et al., 2012; PAPANIKOLAOU et al., 2000; SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, 2014; ZHU et al., 2016). Sendo assim, a tolerância imposta pelo microrganismo justifica a necessidade de estudar para cada cepa a concentração inibitória de glicerina bruta, a fim de entender o comportamento da célula quando submetida a esta condição de estresse.

Gungormusler-Yilmaz et al. (2014) estudaram a expressão das enzimas chave envolvidas no catabolismo de glicerol e na síntese de 1,3-PDO. De acordo com os resultados, foi possível verificar que os níveis de expressão das enzimas testadas foram reduzidos na presença de altas concentrações de glicerol. A baixa expressividade das enzimas ocasionou a

redução da taxa de consumo do substrato e da taxa de crescimento celular e, consequentemente, da taxa de produção de1,3-PDO.

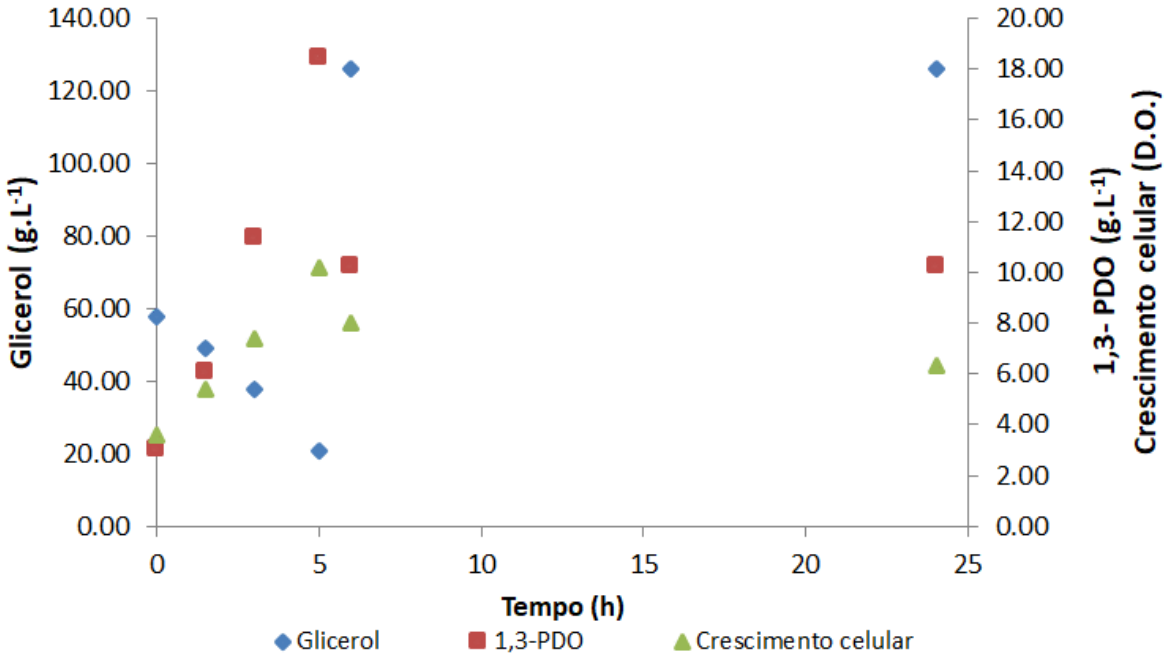

Figura 5.14 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO obtidos quando as células foram crescidas diretamente no biorreator de 1 L a 37°C e 200 rpm com ajuste automático de pH e o ensaio foi realizado em batelada simples com o meio de cultivo minimizado. (Estratégia 5).

5.3.4 Estratégia 6

Nesta estratégia de operação, as células foram crescidas diretamente no reator com ajuste automático de pH para 6,8 e a etapa de produção do produto de interesse foi conduzida em regime de batelada alimentada. As diferenças da estratégia 6 para a de número 3 foi o valor de pH escolhido e o ajuste de pH (manual ou automático) na etapa de crescimento de células. O ajuste automático de pH na etapa de crescimento celular foi 6,8 na Estratégia 6. Já, na Estratégia 3, não ocorreu nenhum tipo de controle de pH nesta etapa da fermentação. Diante da análise das curvas apresentadas na Figura 5.15, pode-se dizer que as células foram capazes de produzir o produto nestas condições, alcançando uma produção final de 42,66 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO em 12 horas de experimentos; no entanto, a produtividade alcançada foi 2,16 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Ao comparar a produtividade da Estratégia 6 com a da estratégia 3 (3,50 $g.L^{-1}.h^{-1}$), possivelmente a variação do pH da fermentação ocasionou a redução da produtividade de 1,3-PDO no processo

fermentativo. Diante dos resultados, considera-se que a alteração no pH do meio de cultivo, mesmo que de baixa amplitude, possivelmente inferiu diretamente no fluxo metabólico e comportamento celular.

Nas condições da Estratégia 6, pode-se verificar que a concentração celular final de 10,74 D.O. é menor do que na Estratégia 3, na qual obteve-se uma concentração celular final de 15,98 D.O. Esse fato também justifica que houve uma redução no crescimento celular e, assim, na produção de 1,3-PDO porque o crescimento é responsável por gerar $NADH_2$ necessário para a produção do glicol. Pode-se dizer que essa redução do crescimento possivelmente está associada a diminuição do pH do meio de cultivo.

Esses resultados corroboram os estudos de Zen (1996). O autor afirma que o controle de pH quando a fermentação é realizada em escala de reator é uma variável crucial para a fermentação de bactérias capazes de produzir 1,3-PDO a partir de glicerina bruta. Estudos indicam que a manutenção do pH ótimo (pH = 7) durante o cultivo de *Clostridium* spp., não apenas aumenta o crescimento e o consumo de substrato, como também auxilia a *performance* da produção de 1,3-PDO e sua produtividade (LI et al., 2008; TEE et al., 2017; ZHENG et al.,2008).

Segundo Zheng et al. (2008) a forma não dissociada dos ácidos fracos permeiam facilmente a membrana. Esses ácidos, uma vez que atravessam a membrana, se dissociam e acidificam o citoplasma através de próton gerados e, ainda, aumentam a concentração de ânions intracelular gerando um aumento da pressão osmótica interna.

Provavelmente a redução da produtividade nos testes conduzidos nas condições da Estratégia 6, está relacionada a presença dos ácidos ácetico e butírico no meio extracelular, que ao atravessarem a membrana para o citoplasma se apresentam na sua forma dissociada. Sendo assim, a presença de ânions e prótons no meio intracelular provenientes da dissociação desses ácidos, geraram o aumento da pressão osmótica e, consequentemente, uma redução dos fluxos metabólicos de crescimento e produção de 1,3-PDO. Logo, diante da discussão, é possível afirmar que o pH ideal para a produção de 1,3-PDO por *C.butyricum* NCIMB 8082 é 7,0.

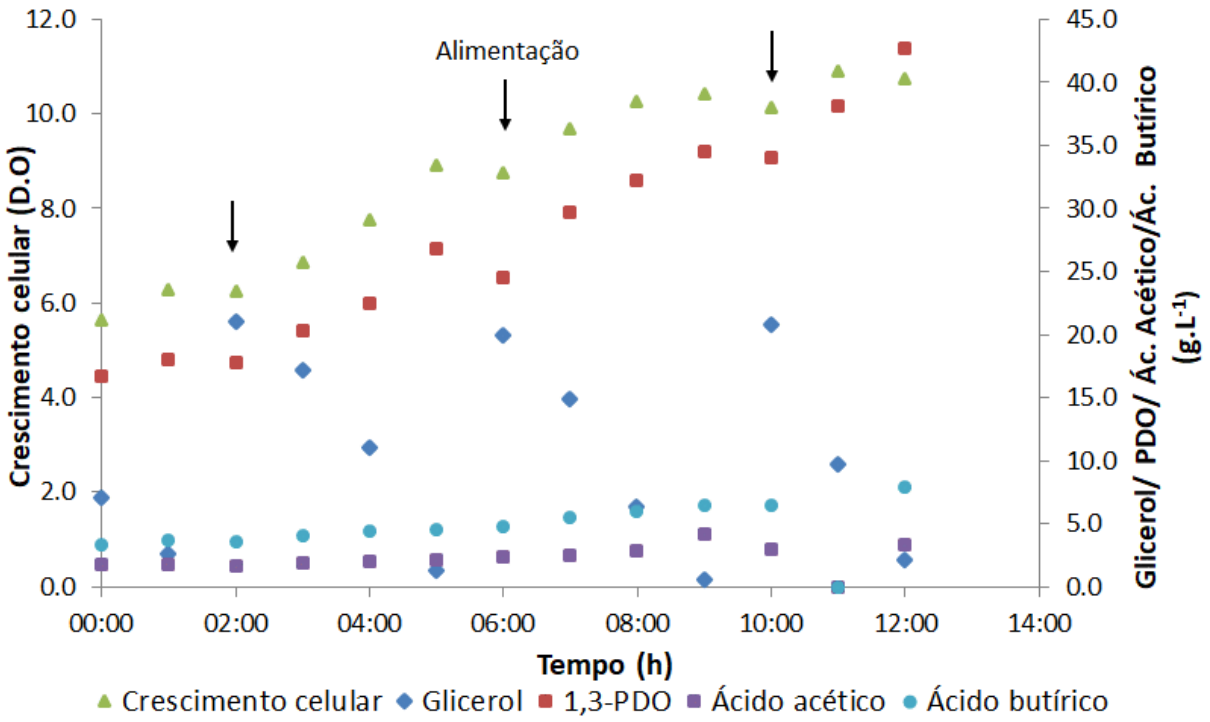

Figura 5.15 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, produção de ácido acético e ácido butírico quando as células foram crescidas diretamente no biorreator de 1 L a 37°C e 200 rpm com ajuste automático de pH igual a 6,8 e o ensaio foi realizado em batelada alimentada com o meio de cultivo minimizado (Estratégia 6).

Sendo assim, após análise das diferentes Estratégias executadas até o presente momento, foi possível observar fatores essenciais para a condução do processo fermentativo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum*. Dentre esses fatores pode-se dizer que o meio minimizado foi eficiente na produção de 1,3-PDO, quando se leva em consideração a produtividade do processo. Além disso, para obtenção de resultados satisfatórios, o processo deve ser executado sob controle de pH automático e ajustado na faixa da neutralidade, e se deve optar por trabalhar com o crescimento das células direto no reator. Observou-se também neste estudo, que altas concentrações de glicerina bruta comprometem o metabolismo celular.

Uma vez ajustado esses fatores, o passo seguinte foi o estudo da produção de 1,3-PDO diante do aumento de escala experimental. Com isso, os experimentos seguintes foram conduzidos em biorreator de 5 L.

5.4 Produção de 1,3-PDO em biorreator de volume de 5 L

A fim de estudar o comportamento celular e a produção de 1,3-PDO, diante do aumento de escala, realizaram-se experimentos em biorreator acoplado a vaso de reação de volume útil igual a 5 L.

5.4.1 Estratégias 7 e 8

Na Estratégia 7, a etapa de crescimento celular, na qual as células foram crescidas em reator contendo meio de cultivo minimizado, com ajuste automático de pH em 7,0 e temperatura em 37°C, foi possível observar a produção de 28,38 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO, após aproximadamente 16,5 horas de fermentação.

Na Figura 5.16 encontram-se os resultados obtidos na fase de fermentação, denominada etapa de produção de 1,3-PDO. Através do perfil de concentração do glicerol é possível notar que ao longo da etapa de produção do 1,3-PDO foram realizadas três alimentações de glicerina bruta, e nesta etapa, a produção atingiu a concentração final de 61,67 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO em 10 horas de fermentação (último ponto amostrado nesta fermentação). Contudo, a produção final de 1,3-PDO dessa condição de cultivo, após todas as etapas do experimento, foi de 73,07 $g.L^{-1}$. Os parâmetros cinéticos considerando o valor de 73,07 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO não pôde ser calculado, pois, o processo atingiu a concentração máxima de 1,3-PDO fora do horário de trabalho do laboratório, impossibilitando a amostragem. A amostragem que resultou em 73,07 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO não será considerada representativa e real a fim de cálculos de parâmetros, pois não se sabe exatamente o horário que o cultivo atingiu essa concentração.

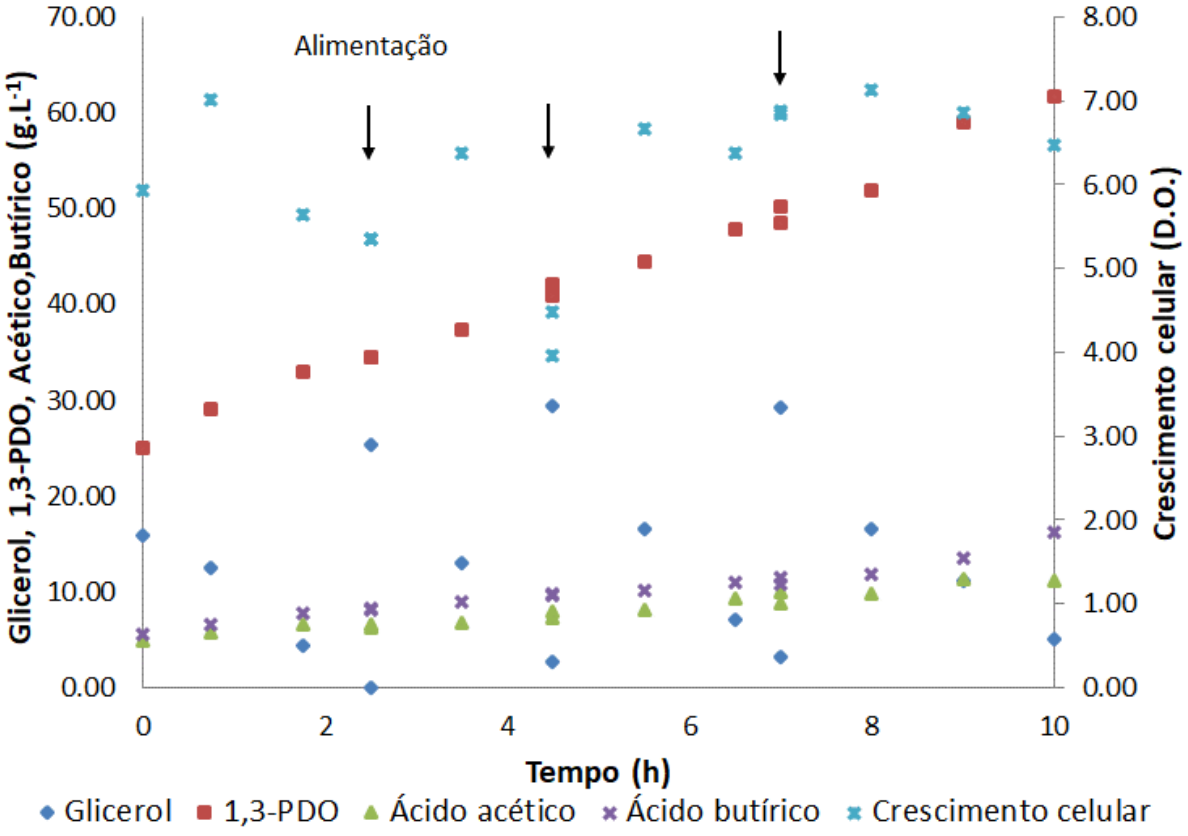

Figura 5.16 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, produção de ácido acético e ácido butírico quando as células foram crescidas no biorreator de 5 L a 37°C e 200 rpm com ajuste automático de pH igual a 7,0 e o ensaio foi realizado em regime de adição de N_2 a cada amostragem e/ou alimentação e batelada alimentada utilizando o meio minimizado (Estratégia 7).

A Figura 5.17 representa os perfis cinéticos do bioprocesso durante a Estratégia 8. Através do perfil de concentração do glicerol é possível notar que ao longo da etapa de produção de 1,3-PDO foram realizadas duas alimentações contendo glicerina bruta. Nesta condição, a produção final de 1,3-PDO foi, após aproximadamente 9,5 horas de cultivo, 54,33 $g.L^{-1}$.

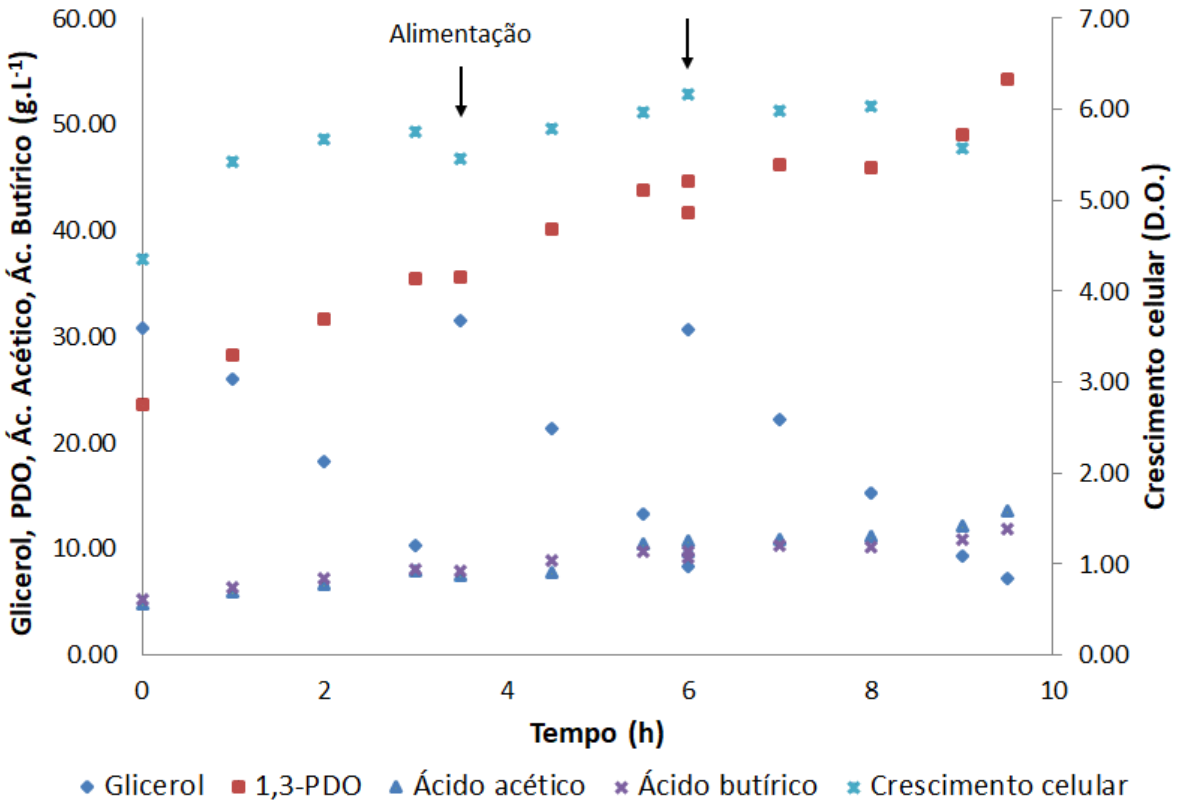

Figura 5.17 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, produção de ácido acético e ácido butírico quando as células foram crescidas no biorreator de 5 L a 37°C e 200 rpm com ajuste automático de pH igual a 7,0 e o ensaio foi realizado em regime de adição contínua de N_2 e batelada alimentada utilizando o meio minimizado (Estratégia 8).

Os parâmetros cinéticos do bioprocesso referente a produção de 1,3-PDO, em biorreator de 1 L e 5 L, para os ensaios testados nas condições das Estratégias 3, 7 e 8 estão representados na Tabela 5.7. A Tabela 5.7 compara três condições diferentes do bioprocesso de produção de 1,3-PDO, ambos os experimentos realizados sob o regime de batelada alimentada, sendo elas: adição de N_2 a cada amostragem e/ou alimentação executado em reator de 1 L (Estratégia 3), adição de N_2 a cada amostragem e/ou alimentação executado em reator de 5 L (Estratégia 7) e adição contínua de N_2 ao longo do curso da fermentação executado em reator de 5 L (Estratégia 8). Diante dos resultados obtidos para as três condições (vide Tabela 5.7), verifica-se que a produtividade de 1,3-PDO foi consideradamente afetada, quando se realizou adição contínua de nitrogênio. Diante do conhecimento prático-experimental adquirido ao longo do projeto com sistemas anaeróbicos em reator, pode-se considerar a purga de nitrogênio um ponto crítico da fermentação, uma vez que a prática implica na variação do pH do meio de fermentação, o que causa a perturbação no sistema. Sabendo que o pH é um parâmetro de extrema importância para

o bioprocesso em questão (conforme comprovado na condição da Estratégia 6), pode-se correlacionar diretamente a queda da produtividade em relação ao produto de interesse com a adição contínua de nitrogênio devido ao estresse celular que é causado quando se trabalha nesta condição. Possivelmente, a adição contínua de gás promove a constante liberação, por exemplo, dos gases gerados durante a fermentação. Essa constante liberação propicia um aumento do pH do meio de fermentação acima da neutralidade, o que leva ao estresse celular. Logo, a estratégia de adição contínua de N_2 vem interferir diretamente no comportamento bioquímico da cepa em questão. Para os casos nos quais foram estudados diferentes regimes de anaerobiose (adição de N_2 a cada amostragem – Estratégias 3 e 7, adição contínua de N_2 – Estratégia 8), pode-se dizer que quando o sistema é deixado sob um regime de autogeração de atmosfera anaeróbica, sendo essa autogeração assegurada pela formação dos gases do metabolismo microbiano (por exemplo, CO_2 e H_2 provenientes da descarboxilação do piruvato), o cultivo apresentou melhor desempenho na produção do produto em questão. O regime de autogeração de atmosfera anaeróbica se relaciona com as condições desenvolvidas na Estratégia 3 e 7, quando se trabalhou com a adição do gás somente no momento das amostragens e/ou alimentações para assegurar que nenhum gás O_2 foi introduzido no sistema no decorrer dessas manobras.

Além disso, comparando os resultados de produção de 1,3-PDO em reator de 5 L (Estratégias 7) com o experimento realizado em reator com volume útil de 1 L (Estratégia 3), é possível verificar valores concordantes de produtividade de 1,3-PDO (3,67 $g.L^{-1}.h^{-1}$ e 3,50 $g.L^{-1}.h^{-1}$, respectivamente), indicando que as células apresentaram um desempenho bioquímico satisfatório frente ao aumento da escala de trabalho.

Tabela 5.7. Parâmetros cinéticos da etapa de produção de 1,3-PDO nas Estratégias 3, 7 e 8 quando as células foram cultivadas a 37°C, 200 rpm em meio minimizado.

Parâmetros cinéticos	Estratégia 3 (1 L)	Estratégia 7 (5 L)	Estratégia 8 (5 L)
$\Delta_{Glicerol}$ ($g.L^{-1}$)	103,27	88,87	67,26
$\Delta_{1,3\text{-}PDO}$ ($g.L^{-1}$)	42,01	36,70	30,78
$Y_{1,3\text{-}PDO}$ ($g.g^{-1}$)	0,41	0,41	0,46
Q ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	3,50	3,67	3,24

Glicerol consumido ($\Delta_{glicerol}$); 1,3-PDO produzido ($\Delta_{1,3\text{-}PDO}$); rendimento da produção de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido ($Y_{1,3\ PDO}$); produtividade do cultivo em 1,3-PDO (Q).

5.4.2 Estratégia 9

Por se tratar de um subproduto, a milhocina apresenta baixo valor agregado, no entanto, a composição dessa matéria-prima varia muito de acordo com a especificidade do milho, a sazonalidade e o processamento industrial. O subproduto apresenta uma grande quantidade de nitrogênio e aminoácidos, além de minerais, vitaminas e fosfato em sua composição (TAN *et al.* 2016).

O potencial da milhocina, como fonte de nutrientes a baixo custo, principalmente se comparada a insumos como o extrato de levedura, foi o principal motivador desse teste em biorreator. Neste sentido, avaliou-se a produção de 1,3-PDO em fermentações de glicerina bruta por *C.butyricum* NCIMB 8082 frente à substituição da principal fonte de nitrogênio, vitaminas e cofatores enzimáticos do meio de cultivo, o extrato de levedo, por milhocina.

Nesta estratégia de operação, o ensaio foi realizado em batelada simples, sob o meio de cultivo minimizado contendo glicerina bruta e milhocina como fontes de substratos. A milhocina, conforme já mencionado, foi utilizada em substituição ao extrato de levedo.

A Figura 5.18 apresenta o perfil cinético obtido ao longo da condução da Estratégia 9, em um período de 10 horas de experimento, na qual as células foram crescidas diretamente no reator contendo o meio minimizado, substituindo o extrato de levedo por milhocina em pH 7,0. Os resultados indicam que independente da fonte de nitrogênio utilizada no bioprocesso, ao usar a glicerina bruta como substrato, o 1,3-PDO foi produzido preferencialmente, seguida da

síntese dos ácidos acético e butírico. A concentração final de 1,3-PDO alcançada na Estratégia 9 foi de aproximadamente 36,0 $g.L^{-1}$ e o rendimento de 1,3-PDO em relação do glicerol consumido foi 0,42 $g.g^{-1}$. Ao analisar o perfil de crescimento celular do cultivo, é possível notar que as células se mantiveram num estágio de estagnação de crescimento, sendo observado, um platô no perfil da curva de crescimento celular do experimento conduzido sob as condições da Estratégia 9. Além disso, pode-se observar uma diminuição considerável da taxa de produção de 1,3-PDO, representada graficamente por meio da inclinação da curva e, matematicamente, em razão do cálculo da produtividade do cultivo em relação ao 1,3-PDO, sendo a mesma igual a 1,42 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Sobre o cenário em questão, provavelmente o metabolismo celular apresentou uma diminuição na etapa de produção, onde trabalhou-se com uma quantidade total de 40 $g.L^{-1}$ milhocina. Essa inibição foi influenciada possivelmente pela alta concentração da milhocina do cultivo e pela qualidade do resíduo utilizado, frente a qualidade do extrato de levedo. Na etapa de crescimento celular, etapa na qual foi adicionada 20 $g.L^{-1}$ de milhocina, a diminuição do metabolismo celular não foi verificada (dados não apresentados), possivelmente porque a quantidade de nutrientes presente na milhocina foram suficientes para nutrir as necessidades celular. Ainda deve-se considerar que, na etapa de produção, quando se acrescentou ao meio de cultivo mais 20 $g.L^{-1}$ do resíduo milhocina (totalizando ao final do experimento uma quantidade de 40 $g.L^{-1}$ de resíduo proveniente somente da milhocina), o fenômeno diminuição do metabolismo celular foi identificado. Logo, pode-se levantar a hipótese que a milhocina, em conjunto com a quantidade de resíduos totais da glicerina bruta, foram os promotores da limitação do crescimento celular nos testes executados sob as condições da Estratégia 9. Pode-se dizer que o sinergismo entre esses substratos e o estresse provocado pela alta concentração osmótica, podem ter sido os principais atores envolvidos na alteração do metabolismo celular de *C. butyricum* para produção de 1,3-PDO e, de modo consequente, da produtividade do bioprocesso.

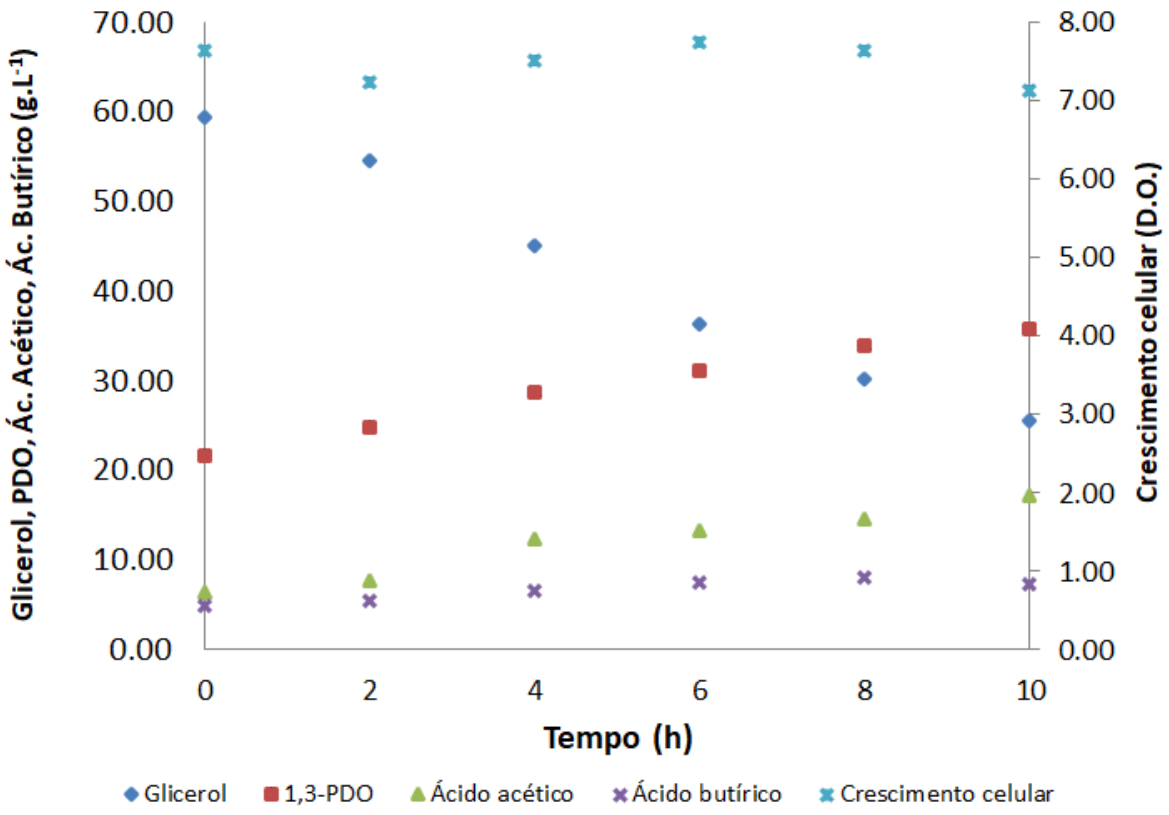

Figura 5.18 Perfil cinético de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, produção de ácido acético e ácido butírico quando as células foram crescidas no biorreator de 5 L a 37°C e 200 rpm com ajuste automático de pH igual a 7,0 e batelada simples utilizando o meio minimizado contendo milhocina, em substituição ao extrato de levedo (Estratégia 9).

É possível observar que a fermentação contendo milhocina apresentou uma taxa de crescimento mais baixa, quando comparada com o meio contendo extrato de levedo (Estratégia 4), bem como, a produtividade volumétrica e o rendimento foram inferiores no experimento conduzido sob a presença de milhocina (Estratégia 9). Portanto, foi possível verificar que síntese de 1,3-PDO ocorre na presença de milhocina, o que pode ser uma estratégia na substituição do extrato de levedo em fermentações para a produção de 1,3-PDO. A milhocina é uma matéria-prima abundante e de baixo valor agregado que, diante dos resultados do presente estudo, podem satisfaz as necessidades metabólicas da célula (se usadas nas proporções adequadas), em substituição ao extrato de levedo, uma fonte de nitrogênio e nutrientes altamente custosa ao bioprocesso. Entretanto, algumas variáveis do processo ainda devem ser estudadas a fim de maximizar a produtividade utilizando a milhocina como principal fonte de nitrogênio.

5.5 Comparação das estratégias em biorreator

Para facilitar a análise e avaliação das diferentes estratégias testadas no presente estudo, um resumo dos parâmetros cinéticos, resultados dos testes em biorreator e da literatura estão apresentados na Tabela 5.8.

Em relação ao rendimento de 1,3-PDO por substrato consumido ($Y_{1,3PDO}$) verificou-se que o mesmo variou de 0,37 $g.g^{-1}$ a 0,60 $g.g^{-1}$. O máximo rendimento foi alcançado quando as células cresceram diretamente no reator em meio de cultivo minimizado contendo glicerina bruta e extrato de levedo como substrato, controle automático de pH ajustado em 7,0 (Estratégia 4). O elevado rendimento de produto ao realizar o experimento nas condições desta estratégia deve-se, provavelmente, ao controle automático de pH rigoroso e efetivo e não realização de amostragens e/ou alimentações e, tampouco, a adição contínua de N_2 no decorrer da fermentação; evitando assim, as perturbações que essas manobras externas causam ao sistema. Em todas as amostragens e alimentações fez-se necessário realizar uma adição de N_2 para garantir a anaerobiose. Essa adição de N_2 tem como consequência uma variação considerável do pH do meio (atingindo valores de até 7,4 de pH em cada adição), alteração essa que se deve, possivelmente, pela liberação dos gases produzidos pela própria fermentação. Conforme já discutido, o pH do meio de cultivo é um fator que compromete a atividade biológica. Já foi comprovado neste estudo que o pH é um parâmetro que deve ser bem ajustado e, muito mais importante que o ajuste é o controle do mesmo quando se deseja a produção de 1,3-PDO utilizando *C. butyricum*. Como na Estratégia 4 o controle de pH 7 foi automatizado durante o decorrer da fermentação e, entre as 16 horas não foram realizadas adições de N_2, pode-se dizer que o pH da fermentação não sofreu variações bruscas, o que pode ter implicado em um rendimento elevado de 1,3-PDO. Além disso, vale ressaltar o bioprocesso foi conduzido sob autogeração da atmosfera anaeróbica, o que assegurada pela formação dos gases do metabolismo microbiano, implicou numa melhor performance da síntese de 1,3-PDO (já discutido no item 5.4.1). Por outro lado, quando a adição de N_2 foi aplicada continuamente (Estratégia 8), verificou-se uma redução da produção de 1,3-PDO, isso porque essa adição de N_2 ocasionou um estresse celular devido as variações do pH do sistema. Esses dados indicam que para garantir a anaerobiose do sistema, a maneira mais eficiente de trabalhar é evitando adições desnecessárias de N_2. Sendo assim, o mais interessante seria trabalhar somente com a autogeração a fim de garantia da atmosfera anaeróbica, fato que minimizará as variações bruscas de pH do meio de fermentação e, consequentemente, o estresse do metabolismo celular.

É importante destacar que as estratégias 3, 4 e 7, que apresentaram elevados resultados de produtividade em relação ao 1,3-PDO, foram executadas trabalhando com o meio de cultivo minimizado. O meio minimizado, obtido no presente estudo, contém nove componentes a menos do que o meio de cultivo complexo, utilizado na maioria dos estudos da literatura. Sendo assim, pode-se dizer que as fermentações utilizando o meio minimizado proposto neste trabalho geraram resultados satisfatórios de crescimentos celular e produtividade em termos de 1,3-PDO. Os resultados citados demonstram a possibilidade de diminuir a quantidade de componentes do meio de cultivo, sem impactar a produção de 1,3-PDO, fato que propicia a redução do custo operacional do processo. Por outro lado, o rendimento em 1,3-PDO dos ensaios utilizando o meio minimizado foram consideravelmente menores do que os ensaios que foram estudados com o meio complexo, a exceção é quando as células crescem na condição da Estratégia 4. No entanto, considerando que estamos utilizando um resíduo industrial de baixo valor agregado, como fonte de carbono e energia, esse parâmetro não é considerado o mais relevante visto o baixo custo dos resíduos.

Ao focar nos resultados obtidos para os subprodutos ácido acético e butírico, visualiza-se que o ácido butírico foi o segundo produto mais gerado na grande maioria das estratégias estudadas, seguido pelo ácido acético. A exceção foi apresentada nas Estratégias 8 e 9. A produção desses ácidos é dependente principalmente das condições ambientais, tais como pH, concentração de substrato e nutrientes e pode ocasionar a redução da produção de 1,3-PDO. Conforme já relatado, a diminuição de 1,3-PDO se dá pelo fato que a produção de ácido butírico compete com o 1,3-PDO por equivalentes redutores ($NADH_2$), isso quando as células não estão sendo submetidas a nenhum nível de estresse. Considerando que a produção de ácido acético não consome NADH reduzido, ao contrário da produção de ácido butírico, a melhor *performance* da produção de 1,3-PDO se dá quando somente o ácido acético é produzido no cultivo.

Quando a cepa foi cultivada na presença do meio minimizado contendo milhocina (Estratégia 9) obteve-se como resultado uma maior razão ácido acético/ácido butírico (AA/AB), indicando que a produção de ácido acético foi favorecida. No entanto, para essa condição observou-se uma estagnação do crescimento, fato que possivelmente propiciou numa redução significativa da taxa de produção de 1,3-PD. Sabendo que a via de crescimento celular é geradora de $NADH_2$, se a célula cresce menos tem menos $NADH_2$ disponível, e por isso possivelmente a célula desvia o metabolismo para a produção de ácido acético em detrimento da produção de 1,3-PDO que é dependente de $NADH_2$. Na condição da Estratégia 9, pode-se

dizer houve uma maior produção de ácido acético, cuja reação de conversão gera poder redutor - $NADH_2$ – em comparação a produção de ácido butírico. Nesse caso, é possível identificar que o aumento da razão AA/AB, não é consequência de uma aceleração do metabolismo, conforme afirma Gungormusler-Yilmaz et al. (2014); e sim, da decorrência de uma sinalização do *status* do metabolismo celular, quando as células são submetidas a um *pool* de aminoácidos, vitaminas diferentes. Nesse trabalho, ainda não foi possível alcançar resultados satisfatórios de produtividade ao trabalhar com a milhocina, porém observou-se o potencial da matéria-prima para ser utilizada com fonte de substratos em estudo de produção de 1,3-PDO sendo biocatalisado por *C. butyricum*.

Ao trabalhar em pH menor do que 7,0 (Estratégia 6) o metabolismo foi direcionado para a produção de ácido butírico, tendo uma razão AA/AB de 0,34 e o rendimento em 1,3-PDO igual a 0,37 $g.g^{-1}$, valores bem abaixo quando comparado aos ensaios ajustados para o pH neutro.

A relação carbono/ nitrogênio (C/N) é um indicador microbiológico que apresenta informações relevantes sobre o comportamento celular em um bioprocesso. Ao comparar os resultados entre rendimento da produção de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido ($Y_{1,3\text{-}PDO}$) e relação C/N (C/N), representados através da Figura 5.19, é possível verificar uma tendência no gráfico, visto que quanto maior é C/N, maior será o parâmetro cinético $Y_{1,3\text{-}PDO}$. Contudo, a partir de uma relação C/N de aproximadamente 103 essa tendência atinge um patamar máximo e, consequentemente, inicia uma fase de declínio. Essa fase de declínio identificada vem corroborando o fenômeno de inibição celular pela concentração de glicerol. As células têm um limite de concentração de glicerol no qual apresentam o seu metabolismo em funcionamento, ao ultrapassar esse limite de glicerol no meio de cultivo, verifica-se que o crescimento é cessado e o parâmetro $Y_{1,3\text{-}PDO}$ tende a ser zero. No entanto, se esse limite não é ultrapassado, pode-se dizer que possivelmente existe uma relação direta entre a relação C/N e $Y_{1,3\text{-}PDO}$ nas condições estudadas, contudo, ainda é necessário o estudo da relação C/N na faixa entre 50 e 100. Essa relação pode ser discutida, visto que, ao aumentar a C/N está disponibilizando uma quantidade maior de moléculas de carbono no meio de cultivo; essas moléculas então, em altas concentrações, podem ser direcionadas, além da via de crescimento celular para a via de produção de 1,3-PDO, tendo uma quantidade suficiente para suprir essas duas vias que trabalham associadamente.

Além disso, observa-se na Tabela 5.8 que ao aumentar a escala do reator de 1 L para 5 L, verificou-se que não houve alteração significativa dos resultados de produtividade e

rendimento da produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082, para as condições estudadas. Isso indica que as células foram capazes de manter o metabolismo celular ativo mesmo com a mudança de escala implementada.

Tabela 5.8 Resumo dos resultados obtidos nas diferentes estratégias operacionais testadas.

Processos	Operação	Tempo (h)	X ($g.L^{-1}$)	Δ_{gli} ($g.L^{-1}$)	Δ 1,3-PDO ($g.L^{-1}$)	$Y_{1,3\ PDO}$ ($g.g^{-1}$)	$Q_{1,3\ PDO}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Δ AA ($g.L^{-1}$)	Δ AB ($g.L^{-1}$)	AA/AB
Reator 1 L										
Estratégia 1	$M_{complexo}$ + $inóculo_{externo}$ $pH_{manual\ 7,0}$ + $B_{simples}$	12,8	3,21	58,42	30,50	0,52	2,38	5,18	6,06	0,87
Estratégia 2	$M_{complexo}$ + $inóculo_{externo}$ $pH_{manual\ 7,0}$ + $B_{alimentada}$	11,0	3,44	58,26	28,07	0,48	2,55	4,27	5,23	0,82
Estratégia 3	$M_{minimizado}$ + $inóculo_{interno}$ $pH_{manual\ 7,0}$ + $B_{alimentada}$	12,0	4,58	103,27	42,01	0,41	3,50	6,08	8,65	0,70
Estratégia 4	$M_{minimizado}$ + $inóculo_{interno}$ $pH_{auto\ 7,0}$ + $B_{simples}$	16,0	3,59	102,08	61,66	0,60	3,85	11,95	12,71	0,94
Estratégia 5	$M_{minimizado}$ + $inóculo_{interno}$ $pH_{auto\ 7,0}$ + $B_{simples}$	-	Inibição pelo substrato							
Estratégia 6	$M_{minimizado}$ + $inóculo_{interno}$ $pH_{auto\ 6,8}$ + $B_{alimentada}$	12,0	3,07	69,70	25,97	0,37	2,16	1,58	4,63	0,34
Reator 5 L										
Estratégia 7	$M_{minimizado}$ + $inóculo_{interno}$ $pH_{auto\ 7,0}$ + $B_{alimentada}$	10,0	3,17	88,87	36,70	0,41	3,67	6,27	10,67	0,58
Estratégia 8	$M_{minimizado}$ + $inóculo_{interno}$ $pH_{auto\ 7,0}$ + $B_{alimentada}$ + N_2 contínua	9,5	1,82	67,26	30,78	0,46	3,24	8,77	6,73	1,30
Estratégia 9	$M_{minimizado}$ + $inóculo_{interno}$ $pH_{auto\ 7,0}$ + $B_{simples}$ + milhocina	10,0	~7,50	33,78	14,21	0,42	1,42	10,75	2,44	4,40

Biomassa (X), glicerol consumido (Δ_{gli}), 1,3-PDO produzido ($\Delta_{1,3\text{-}PDO}$), rendimento da produção de 1,3-PDO em relação ao glicerol consumido ($Y_{1,3\ PDO}$), produtividade em 1,3-PDO ($Q_{1,3\ PDO}$), ácido acético produzido (ΔAA), ácido butírico produzido (ΔAB), razão entre ácido acético e ácido butírico (AA/AB); relação mássica entre a quantidade de carbono e nitrogênio (C/N); meio complexo ($M_{complexo}$); meio minimizado ($M_{minimizado}$)

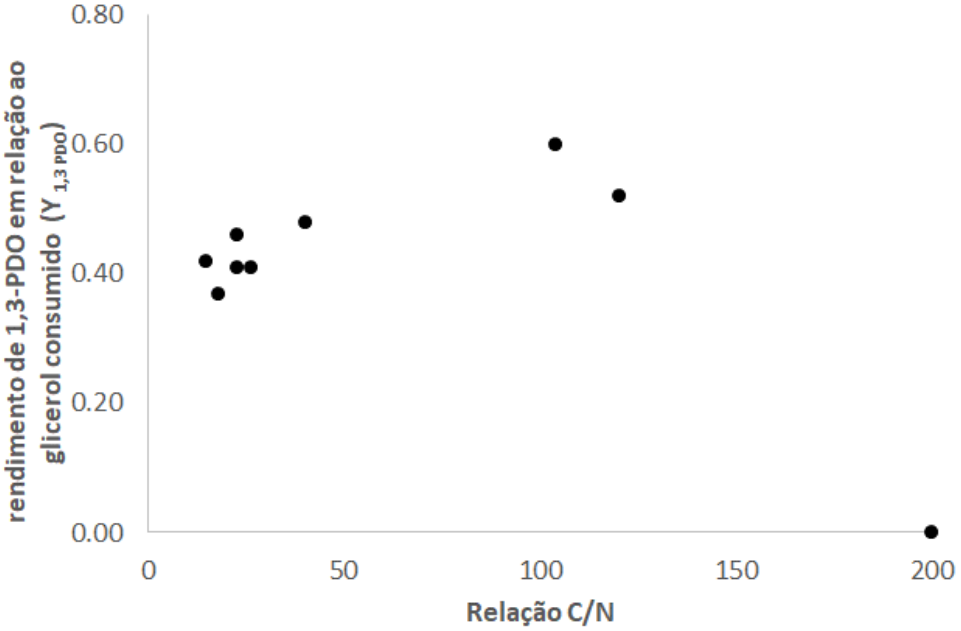

Figura 5.19 Correlação entre os resultados de rendimento de produção de 1,3-PDO e relação C/N obtidos para as diferentes estratégias em biorreator.

A Tabela 5.9 apresenta os dados obtidos via pesquisa bibliográfica em comparação com os obtidos nesse trabalho. Observa-se que a maior produtividade da literatura foi de 7,5 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Nesse estudo células de consórcio microbiano foram imobilizadas e se trabalhou com o processo contínuo, utilizando como fonte de substrato glicerol P.A. Na sequência, o processo executado pela DuPont, empresa que tem o monopólio do mercado de produção de 1,3-PDO por rota biotecnológica em escala industrial, a produtividade de 1,3-PDO é de 3,50 $g.L^{-1}.h^{-1}$. No entanto, é interessante sinalizar que esse resultado só foi possível porque o processo é desenvolvido usando um microrganismo engenheirado. Os estudos desenvolvidos no presente trabalho permitiram encontram produtividades similares a alcançada pelo principal detentor da tecnologia por via biotecnológica. Ainda, vale ressaltar que o grande diferencial é que o presente trabalho está sendo desenvolvido utilizando um meio de cultivo minimizado e um microrganismo selvagem, fatores importantes para o desenvolvimento de uma um bioprocesso.

Tabela 5.9 Resultados de produção de 1,3-PDO obtidos em estudos da literatura em comparação com os obtidos nesse trabalho.

Referência	Célula	Insumo	Operação	1,3-PDO ($g.L^{-1}$)	$Q_{1,3\text{-}PDO}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
SZYMANOWSKA, 2014	*C.butyricum* DSP1	Glicerina bruta	$M_{minimizado}$ + $pH_{7,0}$ + $B_{alimentada}$	54,20	1,55
PAPANIKOLLAOU et al., 2000	*C.butyricum* F2b	Glicerina bruta	$M_{complexo}$ + pH $_{7,0}$ + $C_{contínuo}$	41-46	3,40
DUPONT, 2019	*E.coli* modificada	Glicose	-	135,00-	3,50
VERAS et al., 2019	Consórcio microbiano	Glicerol P.A.	$M_{complexo}$ + $Cél_{imobilizada}$ + $C_{contínuo}$	10,7 – 82,39	2,14 - 7,50
Presente trabalho	*C. butyricum* NCIMB 8082	Glicerina bruta	$M_{minimizado}$ + $pH_{7,0}$ + $B_{simples}$	72,52	3,85

Concentração de 1,3-PDO (1,3-PDO), produtividade em 1,3-PDO ($Q_{1,3\text{-}PDO}$); meio complexo ($M_{complexo}$); meio minimizado ($M_{minimizado}$); células imobilizadas ($Cél_{imobilizada}$); batelada simples ($B_{simples}$); batelada alimentada ($B_{alimentada}$); processo contínuo ($C_{contínuo}$).

5.6 Avaliação econômica preliminar de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* utilizando glicerina bruta e extrato de levedo como principais nutrientes

A fim de investigar a potencialidade da produção industrial de 1,3-PDO por *C. butyricum* a partir de glicerina bruta e extrato de levedo como principais fontes de nutrientes, um estudo econômico preliminar foi desenvolvido neste capítulo. O estudo de avaliação econômica foi baseado nos resultados obtidos no presente trabalho e em informações da literatura. A fermentação realizada em biorreator de 1 L para a produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* em meio minimizado, pH 7, inóculo interno e batelada simples, denominado de Estratégia 4, foi a condição que apresentou melhores resultados, indicando uma produção final de 1,3-PDO de 72,52 $g.L^{-1}$ e produtividade máxima de 3,85 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Apesar desses resultados serem ditos como promissores e interessantes, para definir as potencialidades industriais do referido bioprocesso, faz-se necessário um estudo da viabilidade econômica.

Os resultados das diferentes condições de fermentação mostraram que ao aumentar a escala de trabalho de 1 L para 5 L, os critérios técnicos referentes a produtividade de 1,3-PDO

não foram alterados. Por isso, a discussão apresentada adiante será pautada no bioprocesso utilizando uma escala piloto de 200L.

Como o intuito da presente avaliação é fornecer indicadores econômicos para o cenário do bioprocesso em questão, as seguintes hipóteses foram preditas.

- Considera-se que será oferecida condições que permita ao microrganismo desenvolver sua atividade no nível desejado;
- Considera-se que a fermentação de 1,3-PDO em escala de bancada é similar a produção em escala piloto, logo tem-se os parâmetros de produção e produtividade constantes;
- Considera-se que, ao extrapolar da escala de laboratório para a escala piloto, foram levados em consideração configurações similares de reator.

O primeiro passo para a avaliação de um processo é a construção de um diagrama de blocos. A Figura 5.20 demonstra um diagrama de blocos da produção de 1,3-PDO utilizando *C. butyricum* NCIMB 8082. O processo foi construído baseado na condição de produção que promoveu maior produtividade do produto em questão, Estratégia 4, potencialmente promissora para a produção industrial.

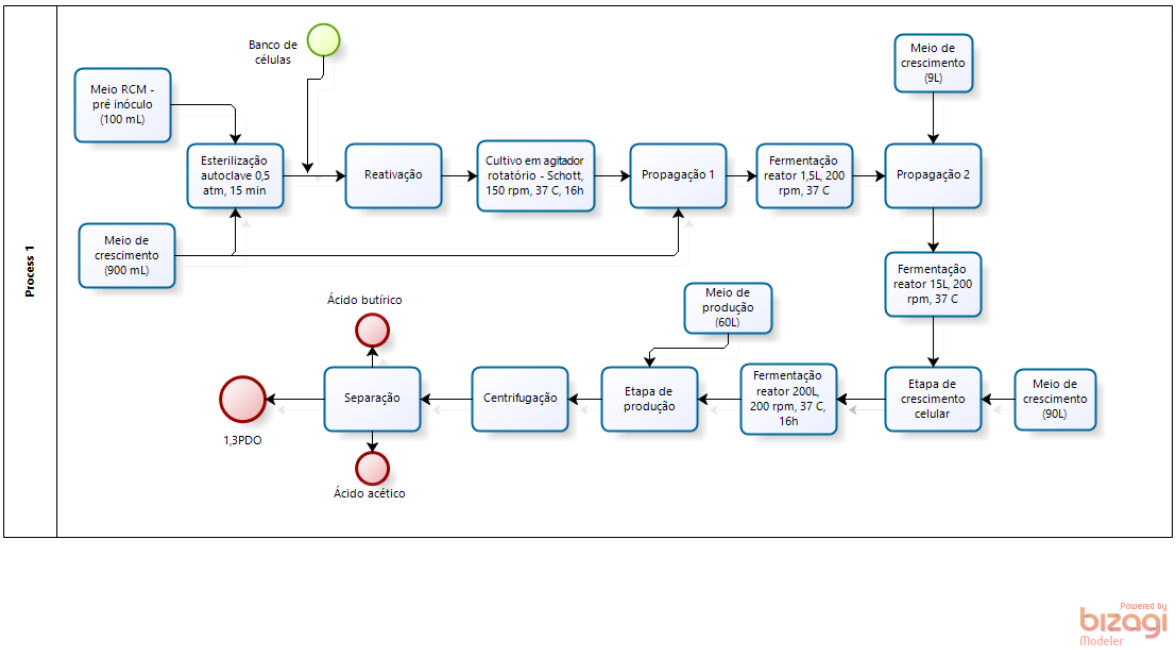

Figura 5.20 Diagrama de blocos do processo de produção de 1,3-PDO por *Clostridium butyricum* NCIMB 8082 a partir de glicerina bruta e extrato de levedo em biorreator de 200L sob agitação de 200 rpm e 37°C.

A primeira etapa é estimar o retorno anual de venda, RV, antes mesmo de estimar os custos de produção, visto que se o RV não for maior que o custo da matéria-prima é necessário desconsiderar o processo (SEIDER et al., 2003). O RV baseia-se no preço de venda do produto por unidade e na quantidade de produto produzido para venda.

Com a finalidade de calcular o RV de 1,3-PDO obtido pelo processo descrito no diagrama de blocos da Figura 5.20, foi realizado um levantamento do preço de 1,3-PDO praticado nos últimos anos. A Figura 5.21 ilustra as informações de preço do produto, em US$, obtidos através da plataforma ComexStat. A plataforma é utilizada como um portal de consulta às estatísticas de exportação e importação brasileiras.

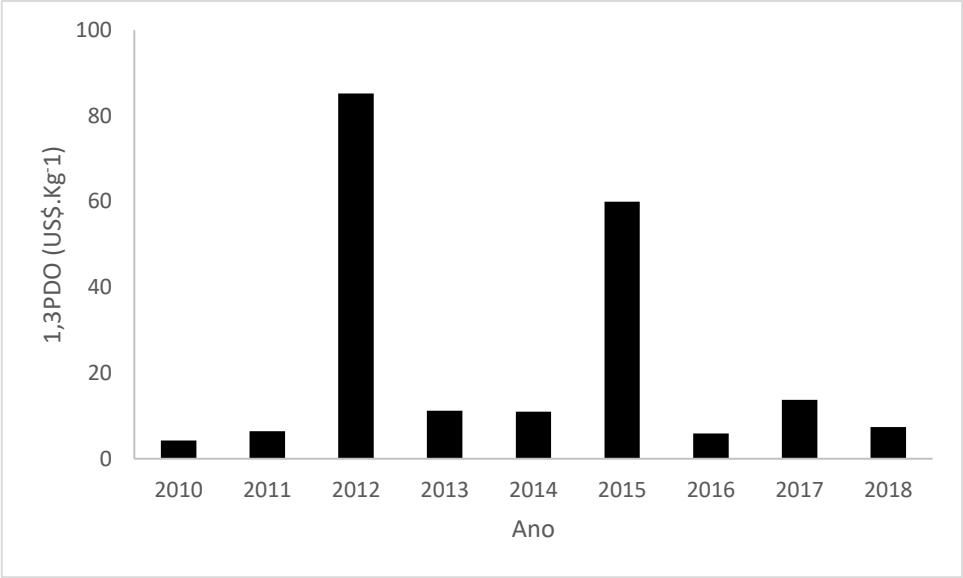

Figura 5.21 Gráfico ilustrativo do preço praticado de 1,3-PDO, em termos de US$.Kg^{-1}, período 2010 a 2018. (Fonte: ComexStat, 2019).

Para a estimativa foi adotado o preço de mercado do 1,3-PDO importado pelo Brasil de 2010 a 2018 a fim de trabalhar com uma margem de erro confiável. Conforme verifica-se na Figura 5.21, existem dois momentos distintos no período em análise. Um momento, sinalizado no ano de 2012 e 2015, que o preço de 1,3-PDO apresenta um valor significativamente mais elevado em relação ao demais anos analisados. Sendo assim, a fim de trabalhar com a diferença de preço praticada ao longo do período selecionado, foi proposto dois diferentes cenários. O primeiro cenário, denominado de cenário realista, no qual relaciona-se a média dos preços mais baixo. E, o segundo cenário, denominado de cenário otimista, em que trabalhou-se com a média dos preços mais elevados. Logo, as médias de preço do 1,3-PDO calculadas foram US$ 7,39 Kg^{-1} e US$ 72,63 Kg $^{-1}$, para os cenários realista e otimista, respectivamente.

5.6.1 Simulação de estimativa econômica para o cenário realista

Conforme citado, o RV baseia-se no preço de venda do produto por unidade e na quantidade de produto produzido para venda. Na Estratégia 4, testada na presença de glicerina bruta e extrato de levedo como fonte de nutrientes, foram produzidos ao final da fermentação 0,07252 Kg de 1,3-PDO por batelada. Considerando uma eficiência na etapa de *downstream* de 98% (Saxena et al., 2009) tem-se uma produção de 0,07107 Kg de 1,3-PDO por batelada. Já, a

fermentação de 180 L (volume útil de reator de 200 L), tem-se a produção de 12,79 Kg 1,3-PDO por batelada e a necessidade de: 16 horas da etapa de crescimento + 16 horas da etapa de produção, incluindo 3 horas para as etapas de *upstream* e *downstream*. Sendo assim, o retorno anual de venda (RV), diante do primeiro cenário está calculado a seguir.

De acordo com média de preço de 1,3-PDO igual a US$ 7,39 Kg^{-1}, para o cenário realista, tem-se um retorno de venda anual igual a:

$$RV\ (1^{\underline{o}} cenário) = \frac{US\$\ 7{,}39}{Kg} * \frac{12{,}79\ Kg}{batelada} * \frac{1\ batelada}{35\ horas} * \frac{24\ horas}{dia} * \frac{330\ dias}{ano}$$

$$= \frac{US\$\ 21.388{,}09}{ano}$$

A fim de calcular o custo referente a matéria-prima para o bioprocesso de produção de 1,3-PDO foi elaborada a Tabela 5.10, na qual estão listados o preço, em US$, de cada componente do meio de cultivo e sua correlação com o gasto por batelada.

Foi considerada uma planta de produção operando 330 dias por ano e 24 horas por dia (SEIDER et al., 2003) e, ainda, um tempo total de produção de 35 horas. Diante dessas últimas considerações, a Tabela 5.10 aponta que o custo anual de matéria-prima (CMP) é de US$ 14.777,04.

Tabela 5.10 Custo total anual da matéria-prima do processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082 utilizando glicerina bruta e extrato de levedo em biorreator de 200 L sob agitação de 200 rpm e 37°C.

	Concentração	Preço ($US\$.g^{-1}$)	Massa ($g.batelada^{-1}$)	Custo ($US\$.batelada^{-1}$)
Reagentes do pré-inóculo (V = 0,100 L)				
RCM[a]	38,0 $g.L^{-1}$	0,30	0,38	0,11
Reagentes do meio de crescimento celular (V = 99,90 L)				
KH_2PO_4[b]	1,0 $g.L^{-1}$	1,30E-01	100,0	1,30E+01
NH_4Cl[b]	1,0 $g.L^{-1}$	2,43E-04	100,0	2,43E-02
$MgSO_4.7H_2O$[b]	0,3 $g.L^{-1}$	2,54E-04	30,0	7,62E-03
$CaSO_4.2H_2O$[b]	0,02 $g.L^{-1}$	0,18	2,0	3,64E-01
$FeSO_4.7H_2O$[b]	0,02 $g.L^{-1}$	4,11E-04	2,0	8,22E-04
Extrato de levedo[a]	1,0 $g.L^{-1}$	0,22	100,0	21,50
Glicerina bruta[b]	75,0 $g.L^{-1}$	3,35E-04	7500,0	2,51
Reagentes do meio de Produção (V = 60,00 L)				
KH_2PO_4	1,0 $g.L^{-1}$	1,30E-01	60,0	7,80E+00
NH_4Cl	1,0 $g.L^{-1}$	2,43E-04	60,0	1,46E-02
$MgSO_4.7H_2O$	0,3 $g.L^{-1}$	2,54E-04	18,0	4,57E-03
$CaSO_4.2H_2O$	0,02 $g.L^{-1}$	0,18	1,2	2,18E-01
$FeSO_4.7H_2O$	20,0 $mg.L^{-1}$	4,11E-04	1,2	4,93E-04
Extrato de levedo	1,0 $g.L^{-1}$	0,22	60,0	12,90
Glicerina bruta	125,0 $g.L^{-1}$	3,35E-04	7500,0	2,51
Reagente para ajuste de pH (V = 20,00 L)				
NaOH	280,07 $g.L^{-1}$	7,73E-04	5600,0	4,33
Custo total da matéria-prima ($US\$.batelada^{-1}$)				65,30
Custo anual da matéria-prima ($US\$.ano^{-1}$)				14.777,04

Fonte: [a] A consulta de preço foi obtido no endereço www.sigmaaldrich.com realizada em 26/04/2019. [b] Preço dos insumos praticados no ano de 2018 e consultados na base de dados ComexStat.

O retorno anual de venda (RV) considerando o primeiro cenário (US$ 21.388,09 ano^{-1}) é maior do que o custo da matéria-prima (CMP), US$ 14.777,04 ano^{-1}. Segundo Seider et al., (2009), pode-se dizer que o processo em questão, perante o cenário realista, apresenta potencial para ser economicamente viável. Isso porque o custo anual com a produção de 1,3-PDO, considerando somente a matéria-prima, é menor do que o retorno anual com a venda do produto. No entanto, sabendo que o 1,3-PDO, nos últimos anos, tem atraído os *players* da indústria alimentícia e de cosméticos, devido as suas propriedades físico-químicas e que, é justificável o preço de venda elevada do produto, visto que o setor industrial necessita de um produto de alta

pureza. Sendo assim, no próximo estudo, será desenvolvido os cálculos considerando o preço médio de venda de 1,3-PDO de US$ 72,63 Kg $^{-1}$.

5.6.2 Simulação de estimativa econômica para o segundo cenário (otimista)

De acordo com a média de preço de 1,3-PDO igual a US$ 72,63 Kg $^{-1}$, para o cenário otimista, tem-se um retorno de venda anual igual a:

$$RV\ (2^{\underline{o}} cenário) = \frac{US\$\ 72{,}63}{Kg} * \frac{12{,}79\ Kg}{batelada} * \frac{1\ batelada}{35\ horas} * \frac{24\ horas}{dia} * \frac{330\ dias}{ano}$$

$$= \frac{US\$\ 210.205{,}22}{ano}$$

A Tabela 5.10 retrata que o custo anual de matéria-prima (CMP) é de US$ 14.777,04. Sendo assim, o RV para o segundo cenário, o qual trata o preço de venda do produto elevado, também é maior do que o CMP. Segundo Seider et al. (2003), sendo o RV maior do que o CMP, pode-se considerar que o processo apresenta potencial para ser economicamente viável. Entretanto, na análise de avaliação econômica de um processo, tem-se outros fatores que geram custos ao processo e necessitam ser inclusos na análise econômica.

O lucro bruto inicial (LBI) é um parâmetro que pode ser calculado pela diferença entre o RV e o CMP, desconsiderando os impostos governamentais (SEIDER et al., 2003). Estimando o LBI e tratando somente os custos de matéria-prima, sem levar em consideração os custos de operação da planta, tem-se que a simulação apresentou um LBI igual a US$ 195.428,29 por ano, diante do cenário otimista.

Ao analisar a dinâmica de evolução econômica do processo, além dos custos referentes à matéria-prima - considerado como custo variável - faz-se necessário considerar também os custos com utilidades, operadores, manutenção, etc.

Para a discussão dos custos variáveis, denominados de utilidade, levou-se em consideração os custos de energia elétrica e os créditos de subprodutos, parâmetros considerados plausíveis para o processo. Os custos referentes a energia elétrica estão dispostos na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 Custos total anual de energia elétrica consumida durante o processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082 biorreator de 200L sob agitação de 200 rpm e 37°C.

Operação	Potência do Equipamento (kW)	Tempo de utilização do equipamento (h.batelada^{-1})	Consumo de energia (kWh.batelada^{-1})	Custo (US$.batelada^{-1})
Esterilização de meios	2,0	0,25	0,5	1,10
Reativação (incubador agitado)	0,65	16,0	10,4	22,87
Propagação 1	1,16	16,0	18,56	40,81
Propagação 2	0,827	16,0	13,232	29,09
Etapa de crescimento	0,004	16,0	0,064	0,14
Etapa de produção	0,004	16,0	0,064	0,14
Centrifugação	3,73	0,25	0,9325	2,05
Separação	0,3	0,5	0,15	0,33
Custo total de energia elétrica por batelada (US$.batelada^{-1})				96,54
Custo total anual de energia elétrica (US$.ano^{-1})				21.847,18

[a] Para realização dos cálculos foi considerado que cada ciclo de 10 minutos da centrifuga comporta 1,60L de meio, logo seria necessário executar 4 ciclos para centrifugar 5 L de meio de cultivo. [b] Custo de energia (R$0,561/kWh) fornecido pela empresa ANEEL no dia 03 de maio de 2018 e convertido para US$ pela cotação do dia (R$3,92/US$) fornecida pelo Banco Central do Brasil. http://www.aneel.gov.br/ranking-das-tarifas

Os créditos relativos a produção de ácido acético e ácido butírico, subprodutos do bioprocesso de produção de 1,3-PDO entraram nos cálculos dessa avaliação econômica preliminar. Ao trabalhar com os dados disponíveis na plataforma Comex Stat, foi possível verificar que o ácido acético e o ácido butírico apresentam valores de importação de US$ 0,46.Kg^{-1} e US$ 2,24.Kg^{-1}, respectivamente. Tais valores representam um RV anual de US$ 451,80 de ácido acético e US$ 9455,40 de ácido butírico.

Ao considerar os custos variáveis, sendo eles principalmente os custos de matéria-prima e energia elétrica, além dos créditos com subproduto, é possível verificar conforme disposto na Tabela 5.12 que os custos variáveis do processo então na faixa de US$ 26.717,02 por ano.

Tabela 5.12 Custo total anual considerando os custos variáveis para o processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082 sob agitação de 200 rpm e 37°C.

Custos Variáveis	Item	Preço (US$.ano^{-1})
Matéria-prima	Vide Tabela 5.9	14.777,04
Crédito de subprodutos	Ácido acético	-451,80
	Ácido butírico	-9.455,40
Utilidade	Energia Elétrica	21.847,18
Custo total dos custos variáveis (US$.ano^{-1})		26.717,02

Com o propósito de computar os custos fixos, tal como, o custo de mão de obra, será considerado que cada colaborador trabalha 40 horas por semana por turno. Considerando que a semana tem um total de 168 horas, cada semana necessita de 4,2 turnos por operador na planta. Para um processo em escala piloto, nesse estudo, será considerado 1 operador por turno e apenas 2 turnos por semana, o que é suficiente para que se realize as operações de *upstream* e *downstream*. Além disso, considera-se o gasto com assistência técnica, baseando-se em um colaborador por turno em somente um turno por semana. Considerando que cada colaborador é pago por 40 horas por semana, sendo 52 semanas por ano, cada operador trabalha 2.080 horas por ano. Dado o gasto (salário e benefícios) de um colaborador (baseando-se no valor da tabela hora-homem disponibilizada pela fundação COPPETEC), e considerando a cotação do dia

(R$3,92/US$) fornecida pelo Banco Central do Brasil, o custo referente aos salários e benefícios anuais (CSB) é está representado na Tabela 5.12.

Tabela 5.13 Custo anual de mão de obra referente ao processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082 em reator de 200L utilizando meio de cultivo contendo glicerina bruta e extrato de levedo como fontes de nutrientes sob agitação de 200 rpm e 37ºC.

Cargo	Atribuição	Colaborador por turno	Turno	Tempo de trabalho (horas.ano^{-1})	Custo por colaborador (US$. h^{-1})	Custo (US$.ano^{-1})[a]
Profissional Júnior[a]	Controle de Produção	1	2	2080	15,56	64.734,69
Técnico Nível Médio I[a]	Controle de Laboratório	1	1	2080	7,14	14.857,14
Técnico Nível Médio I[a]	Assistência Técnica	1	1	2080	7,14	14.857,14
Custo mão de obra (US$.ano^{-1})						94.448,98

[a]O cálculo foi realizado de acordo com o salário completo (salário mais benefícios) de um Profissional Júnior e Técnico de Nível Médio I em torno de R$ 61,00 e R$ 28,00 por hora, respectivamente, baseando-se no valor da tabela disponibilizada pela fundação COPPETEC, e considerando a cotação (R$3,92/US$) fornecida pelo Banco Central do Brasil.

Tendo em vista as estimativas de custo de produção realizadas ao longo desse capítulo, é possível obter uma estimativa do custo total de produção do processo estudado, estabelecido de acordo com a Tabela 5.14.

Tabela 5.14 Informações sobre os custos do processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082 em reator de 200 L utilizando meio de cultivo contendo glicerina e extrato de levedo como fontes de nutrientes sob agitação de 200 rpm e 37ºC.

Itens avaliados	**Custo (US$.ano^{-1})**
Custo de matéria-prima	14.777,04
Custos variáveis	26.717,02
Custo de mão de obra	94.448,98
Custo total do produto (CTP)	**135.943,04**
Retorno de Venda (RV): 2º cenário	**210.205,22**

Diante da Tabela 5.14, no qual estão resumidos os custos estimados para o processo de produção de 1,3-PDO é possível observar que o processo da Figura 5.20, realizado na presença de extrato de levedo e glicerina bruta e tratando o cenário otimista de venda do produto, pode ser definido como economicamente viável. Pode-se dizer que o mesmo é viável tomando como referência uma matemática simples, na qual obtém-se que o lucro bruto ao final de 1 ano (LBI = RV – CTP) é positivo.

Já, ao analisar esses resultados levando em consideração o cenário realista, pode-se determinar que o LBI é de US$ -114554,95 por ano. Esses dados indicam que, neste cenário em que trata-se o preço de venda baixo do produto, o processo deve ser considerado inviável do ponto de vista econômico. Isso pode ser justificado porque trabalhou-se com o preço de venda de 1,3-PDO considerando que o produto pertencente a classe das *commodities*, que se caracterizam por incluir produtos com preço desfavorável e menor valor agregado.

Para um processo em escala industrial, além dos custos estimados no presente trabalho, deve-se considerar outros custos tais como: custos de manutenção, de depreciação, e administrativos. De acordo com Perlingeiro (2005) os custos de matéria-prima e utilidades em escala industrial são inferiores aos custos em escala de piloto, além disso, os custos com mão de obra também representam um percentual menor do custo total do produto. Como no estudo foi realizada somente uma breve estimativa da viabilidade econômica, deve-se considerar uma análise econômica em escala industrial a fim de confirmar a viabilidade econômica do processo proposto.

No entanto, a breve análise econômica permitiu analisar que o custo com a matéria-prima - descrito como um parâmetro que representa mais da metade do custo total da produção em se tratando de um bioprocesso - correspondeu a um percentual de 11% do custo total da produção. Diante do fato, é possível concluir que a redução dos componentes do meio de cultivo, estudada no presente estudo, teve uma importância significativa frente aos custos da produção de 1,3-PDO.

Certamente, para uma avaliação econômica mais precisa, testes em reatores de maior volume serão necessários, além de uma análise econômica completa. Entretanto, a presente avaliação forneceu indicativos para uma possível continuidade da investigação em relação ao processo estudado.

6. Conclusões finais

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- A análise estatística dos dados obtidos na sequência de planejamentos experimentais e todos os testes de validação com o meio de cultivo permitiu determinar um meio minimizado para a produção do produto de interesse a partir de glicerina bruta por *C. butyricum*.

- Com a determinação de meio de cultivo minimizado foi possível reduzir de 16 para 7 componentes a formulação do meio de fermentação convencional para produção de 1,3-PDO, o que implicou em uma redução do preço de 1,21 US$.L^{-1} para 0,46 US$.L^{-1} . Esses valores presentam uma redução de 62% no preço do meio de cultivo para a produção de 1,3-PDO utilizando glicerina bruta e *C. butyricum*. Vale salientar que o estudo foi realizado utilizando reagentes de grau analítico.

- O cultivo de *C. butyricum* em meio de cultivo minimizado quando utilizado como meio em escala de reator apresentou resultados satisfatórios quando comparados ao meio complexo, tradicionalmente empregados na literatura no cultivo de C. *butyricum* para a produção de 1,3-PDO.

- Demonstrou-se que a adição do íon Mn^{2+} ao meio de cultivo minimizado contendo glicerina bruta e extrato de levedo, na faixa de estudo trabalhada, não influenciou na síntese de 1,3-PDO.

- Ao estudar a inibição das células pelo substrato, verificou-se que ao submeter as células a concentrações próximas a 150 g.L^{-1} de glicerina bruta, ocorre a inibição do metabolismo celular devido a pressão osmótica causada pela alta concentração de glicerol no meio de cultivo.

- O controle automático e ajustado de pH mostrou-se um parâmetro essencial durante a fermentação de glicerol a 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082. O pH neutro resultou nos melhores valores produtividade e produção de 1,3-PDO. O meio de fermentação com pH abaixo da neutralidade possivelmente favorece a produção de ácido butírico, diminuindo assim a produção de 1,3-PDO do processo fermentativo.

- O processo de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum* NCIMB 8082, utilizando glicerina bruta como fonte de carbono, apresentou resultados bastante satisfatórios quando reproduzido em escala de reator de 5 L. A produtividade obtida na etapa de produção quando trabalhou-se com biorreator de 5 L, 3,67 $g.L^{-1}.h^{-1}$, manteve-se próxima aos valores obtidos em reator de 1 L, 3,85 $g.L^{-1}.h^{-1}$. A concentração final de 1,3-PDO, ao término do processo, situou-se em uma faixa muito semelhante dos valores obtidos anteriormente, com rendimento mássico de 41%.

- Verificou-se que a purga de N_2 por pulsos ao longo da fermentação a fim de garantir a condição anaeróbica foi suficiente para o alcance de rendimentos e produtividades de 1,3-PDO significativos.

- *C. butyricum* NCIMB 8082 foi capaz de crescer e produzir 1,3-PDO em meio contendo milhocina em substituição ao tradicional extrato de levedo como fontes de nutrientes. O desenvolvimento de um bioprocesso para a produção deste glicol a partir de subprodutos industriais é de extrema importância tecnológica, na medida que se direciona o uso do mesmo com potencial risco ambiental. Desta forma, incorpora-se a sustentabilidade econômica à cadeia produtiva do biodiesel.

- Comparando-se os experimentos realizados em biorreator, sob diferentes estratégias operacionais, observou-se que o ensaio no qual trabalhou-se com controle ajustado e automático de pH = 7,0 nas etapas de crescimento celular e produção e meio minimizado contendo glicerina bruta (respeitando a concentração inibitória de glicerina bruta) e extrato de levedo, apresentou os melhores resultados. Neste ensaio atingiu-se uma produção de 61,66 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO em 16 horas de processo, com rendimento mássico de 60% e produtividade máxima de 3,85 $g.L^{-1}h^{-1}$, parâmetros técnicos comparáveis a

com os resultados reportados pela DuPont, empresa que tem o monopólio do mercado de produção de 1,3-PDO por rota biotecnológica em escala industrial.

- Diante da breve análise econômica, estima-se que o processo de produção de 1,3-PDO pode ser considerado economicamente viável, considerando o cenário otimista e o preço de venda de mercado do 1,3-PDO em torno de US$ 73 Kg^{-1}. Ainda, foi possível observar que o custo com a matéria-prima, que é descrito como um dos fatores que correspondem a mais de 50% do custo total do bioprocesso, apresentou 11% do custo total de produção. Diante do fato, é possível concluir que a redução dos componentes do meio de cultivo, implicou significativamente na diminuição dos custos da produção industrial de 1,3-PDO.

- Esse trabalho é de valiosa importância para diminuir os custos da produção e, num futuro, viabilizar economicamente a produção industrial de 1,3-PDO por *C. butyricum.*

7. Sugestões para trabalhos futuros

- A milhocina, que como um subproduto da maceração do milho, é uma excelente fonte de nitrogênio para a maioria dos microrganismos, devido ao seu alto conteúdo em aminoácidos e polipeptídeos além de quantidades consideráveis de vitaminas do complexo B e minerais, apresentou-se como um resíduo contendo importantes fontes de nutrientes para a produção de 1,3-PDO. Com isso sugere-se dar continuidade nos estudos utilizando esse resíduo a fim de melhorar a performance celular e aumentar a produtividade da fermentação;

- A literatura discute a inibição por substrato e produto ao estudar a fermentação de *C.butyricum* para a produção de 1,3-PDO. Diante de estudos preliminares, observou-se que a cepa em questão sofre inibição quando a concentração inicial de 1,3-PDO é de 32,0 $g.L^{-1}$. Sendo assim, a fim de reduzir a inibição sofrida pela alta concentração do produto, sugere-se realizar experimentos em regime contínuo, visando aumentar a produtividade em 1,3-PDO.

- Além de testes do modo de operação contínuo, uma condição interessante é trabalhar com células imobilizadas a fim de melhorar a produtividade do bioprocesso.

- Avaliar a adição de $CaCO_3$ como um agente tamponante a fim de minimizar o estresse celular causado pelas variações do pH do meio de cultivo.

- Testar a produção de 1,3-PDO em escala piloto a fim de verificar a possibilidade de escalonamento do bioprocesso.

- A modelagem matemática é uma ferramenta que permite, de maneira lógica, a compreensão do sistema, facilitando a otimização das condições operacionais de uma fermentação. Essa ferramenta pode ser particularmente usada na produção de 1,3-PDO, pois é capaz de prever (*off line*) uma condição de cultivo ideal. As diferentes estratégias de fermentação, obtidas neste estudo, demonstraram resultados importantes e poderão ser utilizadas como dados experimentais aplicados a modelagem matemática do

bioprocesso de produção de 1,3-PDO por *C. butyricum*, viabilizando maximizar os resultados em termos de rendimento e produtividade.

- O processo de separação do produto, etapa *downstream*, é uma parte importante que reflete o êxito de um bioprocesso. A seleção do processo de separação deve levar em consideração alguns critérios como, por exemplo, o modo de operação da fermentação, o valor do produto final, o grau de pureza desejado, entre outros. Estudos visando o *downstream* do presente processos são de extremas necessidade para viabilizar a utilização do mesmo em escala industrial.

8. Referências

ABBAD-ANDALOUSSI, S. et al. Properties of alkyl alcohol-resistant mutants of *Clostridium butyricum* grown on glycerol. **Applied and Environmental Microbiolgy**, v.62, p. 3499–501, 1996.

ABIQUIM, Associação Brasileira da Indústria Química. <Disponível em http://abiquim.org.br/>. Acesso em 04 de maio de 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, ANEEL. Disponível em <http://www.aneel.gov.br/ranking-das-tarifas>. Acesso em 07 de abril de 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, ANP. Disponível em: <http://www. biodiesel. gov.br/oprograma>. Acesso em 04 de março de 2019.

AI, B. et al. Effect of pH and buffer on butyric acid production and microbial community characteristics in bioconversion of rice straw with undefined mixed culture. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 4, p. 676–686, 2014.

AMIN, H. et al. 1,2 Propanediol utilization by *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, role in bioconversion of glycerol to 1,3 propanediol, 3-hydroxypropionaldehyde and 3-hydroxypropionic acid. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 53–59, 2013.

BARBIRATO, F. et al. 3-Hydroxypropionaldehyde, an Inhibitory Metabolite of Glycerol Fermentation to 1,3-Propanediol by Enterobacterial Species. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1448 - 1451, 1996.

BERGEY'S MANUAL - RAINEY, F. A.; HOLLEN, B.J. e SMALL, A. Genus I. Clostridium. In: Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; De Vos, P; Rainey, F.; Schleifer, F.K.H; Whitman, W.B (Editors). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.3 – The Firmicutes, 2nd ed, Springer, 2009, pp. 738 – 828.

BIEBL, H.; et al. Microbial production of 1,3- propanediol. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, p. 289–97, 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.

BIODIESELBR. Disponível em: <https://www.biodieselbr.com/biodiesel >. Acesso em 03 de maio de 2019.

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Biorefinery development through utilization of biodiesel industry by-products as sole fermentation feedstock for 1,3-propanediol production. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 167–175, 2014.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, n. 2, p. 1097–1108, 2011.

CHATZIFRAGKOU, A.; AGGELIS, G. Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation. **Bioresource Technolo**gy, v. 102, n. 22, p. 10625–10632, 2011.

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 91, n. 1, p. 101–112, 2011.

CHO, M. H. et al. A novel separation and purification process for 1,3-propanediol. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 739–744, 2006.

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.

COMEXSTAT. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>. Acesso em 10 de agosto de 2019.

CORRÊA, P. S. Influência da estratégia de aeração na produção de óleo microbiano e polióis por *Yarrowia lipolytica.* Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

DA COSTA, A. C. A.; JUNIOR, N. P.; ARANDA, D. A. G. The situation of biofuels in Brazil: New generation technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 14, n. 9, p. 3041–3049, 2010.

DA SILVA, G. P. et al. 1,3-Propanediol: production, applications and biotechnological potential. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 527–534, 2014.

DUPONT. Disponível em < http://www.dupont.com/>. Acesso em 03 de junho de 2019.

FERREIRA, T.F. Produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerina por via biotecnológica. Tese (Doutorado) -Universidade Federal do Rio DE Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Disponível em https://portal.fiocruz.br/pt-br/search/site/risco%20biol%C3%B3gico/>. Acesso em 03 de julho de 2019.

FONTES, G. C. Produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica.* Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio DE Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

GALLARDO, R. et al. Anaerobic granular sludge as a biocatalyst for 1,3-propanediol production from glycerol in continuous bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 28 - 33, 2014.

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. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 442–446, 2004.

GUNGORMUSLER-YILMAZ, M. et al. Reduced catabolic protein expression in *Clostridium*

butyricum DSM 10702 correlate with reduced 1,3-propanediol synthesis at high glycerol loading. **AMB Express,** v. 4, n. 1, p. 1–14, 2014.

HEYNDRICKX, M. **et al**. The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212t2 and 1213t1 and C. pasteurianum LMG 3285. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 637–642, 1991.

HUANG, Y. et al. Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol by *Klebseilla pneumoniae* expressing aldH under microaerobic conditions. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 505–512, 2013.

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**, v. 68, p. 34–41, 2012.

KAWASAKI, S. *et al.* Effect of oxygen on the growth of *Clostridium butyricum* (type species of the genus Clostridium), and the distribution of enzymes for oxygen and for active oxygen species in clostridia. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 4, p. 368–372, 1998.

KIM, B.H.; GADD, G.M. Bacterial Physiology and Metabolism. Cambridge, 2008.

KRAUS, G. A. Synthetic methods for the preparation of 1,3-propanediol. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 36, n. 8, p. 648–651, 2008.

KUBIAK, P. et al. Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthetize 1,3-propanediol from glycerol. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1308–1319, 2012.

LEE, C. S. et al. A review: Conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 42, p. 963–972, 2015.

LI, C. et al. Complete genome sequence of *Clostridium butyricum* JKY6D1 isolated from the pit mud of a Chinese flavor liquor-making factory. **Journal of Biotechnology**, v. 220, p. 23–24, 2016.

LINDLBAUER, K. A.; MARX, H.; SAUER, M. Effect of carbon pulsing on the redox household of *Lactobacillus diolivoran*s in order to enhance 1,3-propanediol production. **New Biotechnology**, v. 34, p. 32–39, 2017.

LUO, X. et al. Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 144–154, 2016.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; STAHL, D.A. e CLARK, D.P. Brock Biology of Microorganisms, 3rd ed. **Pearson Education**, pp. 27; 63; 69; 129; 760-761, 2012.

MALAOUI, H.; MARCZAK, R. Purification and characterization of the 1-3-propanediol dehydrogenase of *Clostridium butyricum* E5. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 6, p. 399–405, 2000.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel

production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, n. 6, p. 1300–1311, 2007.

MARKETS AND MARKETS. 1,3-Propanediol Market worth $621.2 Million by 2021. Disponível em < https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/1-3-propanediol-pdo-market-760.html >. Acesso 09 de outubro de 2019.

METABOLIC EXPLORER. Disponível em <http://www.metabolic-explorer.com/2017/07/03/project-for-the-construction-of-a-pdoba-production-plant-on-the-carling-saint-avold-platform-moselle/>. Acesso de 23 de julho de 201**9**.

METSOVITI, M. et al. Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 5, p. 408–418, 2013.

Ministério de Minas e Energia (MME). Disponível em <http://www.mme.gov.br/>. Acesso em: 04 de maio de 2019.

MONTEGOMERY, C. V. Planejamento de experimentos usando o Statistica, 1nd ed., E-paper, Rio de Janeiro, RJ, 2003.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A. DA; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova,** v. 32, n. 3, p. 639–648, 2009.

NAKAMURA, C. E.; WHITED, G. M. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 454–459, 2003.

NASCIMENTO, F. V. Produção de eritritol por Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682 em sistemas miniaturizados - Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

PAPANIKOLAOU, S. et al. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. **Journal of Biotechnology**, v. 77, n. 2–3, p. 191–208, 2000.

PERLINGEIRO, C. A. Engenharia de Processos: Análise, Simulação, Otimização e Síntese de Processos Químicos. São Paulo: Blucher, 2005.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305 - 325, 1946.

RIBEIRO, L. C. P. et al. Estudo da inibição por concentração de substrato e de produto na produção de 1,3-propanodiol por Clostridium butyricum. **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2016.

SABRA, W.; GROEGER, C.; ZENG, A.-P. Microbial Cell Factories for Diol Production. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 123. p. 165–197, 2015.

SAXENA, R. K. et al. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advance**s, v. 27, n. 6, p. 895–913, 2009.

SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K.-H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. *The Regional Institute*: Online Publishing. Disponível em <http://www.regional.org.au/au/gcirc/1/241.htm> Acesso em: 09 de julho de 2019.

SEIDER, W.D., SEADER, J.D. e LEWIN, D.R., 2003. Product and process design principles: synthesis, analysis, and evaluation, **John Wiley and Sons**, Inc, 2ª Ed, 2003.

STEINMETZ, S.A.; HERRINGTON, J.S.; WINTERROWD, C.K.; ROBERTS, W.L.; WENDT, J.O.L.; LINAK, W.P. Crude glycerol combustion: Particulate, acrolein, and other volatile organic emissions. **Proceedings of the Combustion Institute,** v. 34, n.2, p. 2749-2757, 2013.

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D. 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum* DSP1 in repeated batch. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 322–328, 2014.

TEE, Z. K. et al. Preeminent productivity of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* JKT37 and the role of using calcium carbonate as pH neutraliser in glycerol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 233, p. 296–304, 2017.

VERAS, S.et al. Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 140-148, 2019.

WILKENS, E. et al. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1057–1063, 2012a.

WILKENS, E. et al. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1057–1063, 2012b.

ZENG, A.-P.; BIEBL, H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 74, p. 239–259, 2002.

ZENG, A. P.; SABRA, W. Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 749–757, 2011.

ZHENG, Z. M. et al. Effect of culture conditions on 3-hydroxypropionaldehyde detoxification in 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 2, p. 305–310, 2008.

ZHU, C.; FANG, B.; WANG, S. Effects of culture conditions on the kinetic behavior of 1,3-propanediol fermentation by *Clostridium butyricum* with a kinetic model. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 130–137, 2016.

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