

JOSÉ AUGUSTO ZOREL

**AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE GLICEROL POR *Enterobacter* sp.
PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ETANOL**

Ouro Preto – MG, Fevereiro de 2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE GLICEROL POR *Enterobacter* sp.
PARA A PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ETANOL**

AUTOR: José Augusto Zorel

ORIENTADORA: Prof. Dra. Silvana de Queiroz Silva

Trabalho de doutorado submetido ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Ouro Preto – MG, Fevereiro de 2019

Z769a Zorel, José Augusto.
Avaliação da fermentação de glicerol por *Enterobacter* sp. para a produção de hidrogênio e etanol [manuscrito] / José Augusto Zorel. - 2019.
156f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana de Queiroz Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. Glicerina. 2. Enterobactérias. 3. Hidrogênio. 4. Álcool. I. Silva, Silvana de Queiroz. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 661.188.1



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 18 dias do mês de fevereiro do ano de 2019, às 09:30 horas, nas dependências do Departamento de Química (Dequi), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese do doutorando Jose Augusto Zorel, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos (Membro - Externo), pelo Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baeta (Membro - UFOP), pelo Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Maria Alice Zarur Coelho (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu ao doutorando Jose Augusto Zorel 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Avaliação da Fermentação do Glicerol Por Enterobacter Sp para a Produção de Hidrogênio e Etanol", na área de concentração: Biotecnologia Industrial. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas ao candidato sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que o doutorando foi aprovado por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pelo doutorando. Ouro Preto, 18 de fevereiro de 2019.

Presidente: Silvana Q Silva

Membro: participação por vídeo conferência Silvana Q Silva

Membro: Baeta

Membro: [Assinatura]

Membro: participação por vídeo conferência Silvana Q Silva

Doutorando: Zorel

DESENVOLVIMENTO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-Organismos (LBTM) – ICEB/NUPEB/DECBI/UFOP e no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental (LQTA) – DEQUI/UFOP, com auxílio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

"Educação é uma descoberta progressiva de nossa própria ignorância."

Voltaire

Agradecimentos

À minha esposa, Cyntia, a quem eu devo muito do que sou hoje, por estar comigo e ter me ajudado a crescer. Aos meus filhos, João Renato e Henrique, meus grilos falantes, aos quais agradeço por minha vida, esperança, felicidade e consciência.

Aos meus pais, meu irmão e à toda a minha família, por tudo que fizeram por mim.

À minha orientadora, professora Silvana, uma das melhores pessoas que já conheci. Agradeço por ter me aceitado como aluno, pela orientação e pela compreensão durante os últimos sete anos.

Ao professor Leandro Moreira, pelas conversas, pela ajuda e pelo exemplo. Aos outros professores dos quais tenho o prazer de ter sido aluno, professor William de Castro-Borges, professor José Maurício e “seu” César.

Aos demais professores do nosso grupo e a todos os integrantes do LBTM, em especial, Ana Cláudia, Érica e Letícia, por toda a ajuda nos momentos mais complicados. Agradeço àqueles que muitas vezes foram minhas mãos durante esse tempo, Thanmilly, Isabela, Marília e Heitor.

Agradeço aos dois colombianos sem os quais esse trabalho não seria o mesmo, Ivon e Oscar Herrera, dois grandes amigos, aos quais sou grato por toda a ajuda técnica e pessoal.

Aos professores do Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental e aos colegas do Galpão. Agradeço não só pelo uso da estrutura física do laboratório, mas principalmente por toda a ajuda que recebi dos integrantes do laboratório.

Ao casal Bruno e Ananda, por tudo que me ensinaram e por todo o apoio que me deram.

Ao meu grande amigo e duas vezes doutor Diego Roberto, a quem nem sei como agradecer pelo companheirismo e não consigo listar quantas vezes me ajudou.

A todos que participaram desse período, mesmo que não mencionados aqui, agradeço pela presença e pelos ensinamentos.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
CAPÍTULO 1.....	2
1. Revisão de Literatura.....	2
1.1. Aumento da demanda energética e produção de biocombustíveis	2
1.2. Ascensão do biodiesel e a questão da co-produção de glicerol residual	3
1.3. Transformação de indústrias de produção de biodiesel em biorrefinarias.....	7
1.4. Produção e vantagens do hidrogênio	11
1.5. Fermentação do glicerol a hidrogênio , etanol e outros metabólitos	14
1.6. Alternativas para melhoria da bioconversão do glicerol	19
1.6.1. Engenharia metabólica e análise do fluxo metabólico	20
1.6.2. Escolha do tipo de cultura microbiana e otimização das condições de fermentação	24
CAPÍTULO 2.....	27
2.1. Justificativa	27
2.2. Objetivos	29
Objetivo geral	29
Objetivos específicos	29
CAPÍTULO 3.....	30
3. Metodologia	30
3.1. Isolamento das bactérias.....	31
3.2. Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados	31
3.3. Sequenciamento do gene rRNA 16S	31
3.4. Ensaio de crescimento bacteriano, consumo de glicerol e produção de H ₂ e outros metabólitos em reatores em batelada sob diferentes condições	32
3.4.1. Determinação da massa seca de células	33
3.4.2. Verificação da influência da concentração inicial de glicerol sobre o metabolismo dos isolados	34
3.4.3. Avaliação dos impactos de contaminantes do glicerol bruto sobre o metabolismo do isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R.....	35
3.4.5. Avaliação dos efeitos da quantidade inicial de células sobre o metabolismo do isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R.....	35

3.4.6. Avaliação dos efeitos da aerobiose e do pH sobre o metabolismo do isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R.....	36
3.5. Técnicas analíticas.....	36
3.5.1. Coleta da fase líquida e quantificação dos compostos por cromatografia líquida.....	36
3.5.2. Coleta da fase gasosa e determinação do H ₂ produzido	37
3.6. Cálculos, planejamento experimental e modelagem	37
3.6.1. Análise da cinética de produção de H ₂	37
3.6.2. Análise da cinética de consumo de substrato e crescimento microbiano.....	38
3.6.3. Equação estequiométrica da conversão de glicerol em produtos	39
3.6.4. Planejamento experimental e determinação dos parâmetros de desejabilidade para a obtenção de diferentes produtos de interesse	39
CAPÍTULO 4.....	42
Resultados e Discussão.....	42
4.1. Isolamento, caracterização e análises metabólicas iniciais	42
4.1.1. Obtenção e caracterização morfológica, bioquímica e molecular dos isolados obtidos no meio EMB	42
4.2. Influência da concentração inicial de glicerol na produção de H₂, no crescimento microbiano e no consumo de substrato	44
4.2.1. Influência da concentração inicial de glicerol sobre os produtos da fermentação e a relação desses com a produção de H₂	51
4.2.1.1. Ácido fórmico	56
4.2.1.2. Ácido lático e 1,3-propanodiol.....	57
4.2.1.3. Etanol	58
4.2.1.4. Ácido acético.....	59
4.2.1.5. Ácido succínico e 2,3-butanodiol.....	61
4.2.1.6. Consumo de glicerol.....	62
4.2.1.7. Alterações do direcionamento de carbono e indicativos de inibição para o isolado 9R.....	63
4.3. Avaliação dos efeitos de alterações nos parâmetros ambientais sobre o metabolismo de glicerol pelo isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R.....	71
4.3.1. Avaliação da possibilidade de pré-adaptação do metabolismo do isolado 9R induzida pela concentração de substrato no pré-inóculo.....	72
4.3.2. Influência do pH inicial e da oxigenação durante a conversão do glicerol pelo isolado 9R.....	75
4.3.3. Influência de impurezas do glicerol bruto sobre a conversão do glicerol a H₂ e subprodutos	79
4.3.5. Avaliação da atenuação do metabolismo do isolado 9R	84

4.4. Melhorias na conversão de glicerol a hidrogênio e etanol pelo isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R	87
4.4.1. Avaliação de alterações na produção de hidrogênio e etanol e consumo de glicerol com auxílio do planejamento experimental	88
4.4.1.1. Produção de etanol	92
4.4.1.2. Produção de hidrogênio.....	95
4.4.1.3. Consumo de glicerol.....	100
4.4.2. Aumento do consumo de glicerol e da produção de hidrogênio e etanol pelo isolado 9R com uso da função de desejabilidade	105
CAPÍTULO 5	119
5.1. Conclusões	119
5.2. Sugestões para Pesquisas Futuras	120
Referências Bibliográficas	121

RESUMO

A despeito da imagem de sustentabilidade que acompanha o biodiesel, o balanço de massa de seu ciclo de vida ainda está longe de ser fechado, de modo que, com a expansão do biodiesel e em dependência de fatores do mercado, o glicerol pode ser considerado como coproduto ou resíduo. Portanto, a expansão sustentável das indústrias de biodiesel depende do tratamento do glicerol. Nesse sentido, a fermentação escura pode aliar o tratamento do glicerol à produção de monômeros, energia e biocombustíveis (como H₂ e etanol), aumentando a gama de produtos das indústrias de biodiesel. No entanto, esse processo ainda é dificultado pela presença de impurezas e pelas altas concentrações necessárias para conferir aplicabilidade ao processo. Desse modo, esse trabalho avaliou as alterações no metabolismo fermentativo de dois isolados de *Enterobacter* sp., 3R e 9R, em resposta a variadas concentrações iniciais de glicerol (5, 10 e 40 gL⁻¹; G5, G10 e G40, respectivamente). Apresentando-se como mais promissor, o isolado 9R foi avaliado quanto aos efeitos de impurezas, pH, oxigenação e quantidade de células sobre a bioconversão do glicerol. Os resultados desses testes serviram como base para definir os fatores pH, quantidade de células e concentração de glicerol como os mais influentes sobre o desempenho do isolado. Em seguida, foi realizada a busca dos melhores valores para esses parâmetros com uso da matriz de Doehlert e da função de desejabilidade. Desse modo, foram definidas três configurações visando diferentes objetivos: HEPG (maior consumo de glicerol e produção simultânea de H₂, etanol e 1,3-PDO; sendo os valores ótimos: pH 7,85; 27,5 GI; 0,009 Inóc.); PG (maior consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO; sendo os valores ótimos: pH 7,70; 41,0 GI; 0,009 Inóc.); e HEG (maior consumo de glicerol e produção simultânea de H₂ e etanol; sendo os valores ótimos: pH 8,00; 23,0 GI; 0,009 Inóc.). Os resultados dos ensaios determinados pela função de desejabilidade ficaram de acordo com o estipulado, sendo obtidos os valores máximos de 59,4 mmol L⁻¹ para a produção de H₂ e 7,6 gL⁻¹ (164,28 mmolL⁻¹) para a produção de etanol pela configuração HEG. O consumo de glicerol também foi otimizado, alcançando na condição HEG o valor de 22,5 gL⁻¹ (98,0 % do glicerol adicionado) em menos 24 horas. Essa condição possibilitou a obtenção de 0,42 L de etanol e 59,04 L H₂ por kg de glicerol consumido. Espera-se que os resultados obtidos nesse trabalho sirvam como base para os próximos estudos desenvolvidos por nosso grupo no campo de bioconversão do glicerol.

ABSTRACT

In spite of the sustainability image that accompanies biodiesel, the mass balance of its life cycle is still far from being closed, so that with the expansion of biodiesel and depending on market factors, glycerol can be considered as co-product or waste. Therefore, the sustainable expansion of the biodiesel industries depends on the treatment of glycerol. In this context, dark fermentation can combine the treatment of glycerol with the production of building-blocks, energy and biofuels (such as H₂ and ethanol), increasing the range of products of biodiesel industries. However, this process is still hampered by the presence of impurities and by the high concentrations required to confer applicability to the process. Thus, this work evaluated the alterations in the fermentative metabolism of two isolates of *Enterobacter* sp., 3R and 9R, in response to different initial concentrations of glycerol (5, 10 e 40 gL⁻¹; G5, G10 e G40, respectively). *Enterobacter* sp. 9R, the most promising isolate, was evaluated for the effects of impurities, pH, oxygenation and number of cells on glycerol bioconversion. These tests served as a basis to define the factors pH, number of cells and concentration of glycerol as the most influential on the performance of the isolate. Then, these parameters were optimized using the Doehlert matrix and the desirability function. Next, three configurations were defined aiming at different objectives: HEPG (optimization of glycerol consumption and simultaneous production of H₂, ethanol and 1,3-PDO); being the optimal values pH 7.85; 27.5 GI; 0.009 Inoc); PG (optimization of glycerol consumption and 1,3-PDO production; being the optimal values pH 7.70; 41.0 GI; 0.009 Inoc); and HEG (optimization of glycerol consumption and simultaneous production of H₂ and ethanol; being the optimal values pH 8.00; 23.0 GI; 0.009 Inoc.). The results of the tests determined by the desirability function were in agreement with the stipulated, obtaining the maximum values of 59.4 mmol H₂ and 7.6 gL⁻¹ ethanol (164.3 mmolL⁻¹) at the HEG configuration. Glycerol consumption has also been optimized, reaching the value of 22.5 gL⁻¹ (98.0% of glycerol added) in less 24 hours at the HEG condition. In this condition, isolate 9R produced 0.42 L of ethanol and 59.04 L H₂ per kg of glycerol consumed. It is hoped that the results obtained in this work will serve as a basis for the next studies developed by our group in the field of glycerol bioconversion.

LISTA DE ABREVIATURAS**1,2-PDO** – 1,2-propanodiol**1,3-PDO** – 1,3-propanodiol**2,3-BDO** – 2,3-butanodiol**3-HPA** – 3-hidroxi propionaldeído**ABF** – Análise do Balanço de Fluxo**ACM** – Análise de Controle Metabólico**AFM** – Análise do Fluxo Metabólico**AGL** – Ácidos Graxos Livres**CNTP** – Condições Normais de Temperatura e Pressão**DHA** – Dihidroxiacetona**DHAP** – Dihidroxiacetona-fosfato**EMB** – *Eosin methylene blue***GC-TCD** – *Gas Chromatography-Thermal Conductivity Detector***HPLC** – *High Performance Liquid Chromatography***NFOR** – NADH:Ferredoxina oxido-redutase**PCR** – *Polymerase Chain Reaction***PEP** – fosfoenolpiruvato, do inglês *phosphoenolpyruvate***PFL** – Piruvato-formiato liase**qRT-PCR** – *quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction***PFOR** – Piruvato:ferredoxina oxido-redutase**TSI** – *Triple Sugar and Iron***UASB** – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket***VP** – Voges-Proskauer

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo de transesterificação para a produção de biodiesel. Na presença de um catalisador alcalino, o metanol reage com a porção de ácidos graxos que compõe o triglicéride, formando moléculas de ésteres metílicos (biodiesel) e glicerol. Adaptado de Silva e colaboradores, 2009.....5
- Figura 2.** Conceito simplificado da integração de processos em uma biorrefinaria. Adaptado de Azapagic, 2014.....8
- Figura 3.** Esquema simplificado dos processos de produção biológica de hidrogênio por fotofermentação (esquerda) e fermentação escura (direita). Adaptado de Hallenbeck e Ghosh (2009).....13
- Figura 4.** Esquema simplificado da fermentação do glicerol em compostos de interesse comercial e vias de produção de hidrogênio por anaeróbios facultativos (via PFL) e anaeróbios estritos (via PFOR). DHA, dihidroxiacetona; DHAP, dihidroxiacetona-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato. Setas pontilhadas indicam a existência de várias reações. Adaptado de Silva e colaboradores (2009), Clomburg e Gonzalez (2013) e Goyal e colaboradores (2013).....15
- Figura 5.** Fluxograma dos experimentos realizados nesse trabalho.....30
- Figura 6.** Curvas de crescimento a 5 (triângulos), 10 e 14 (quadrados) e 40 gL⁻¹ (círculos) de glicerol para os isolados 3R (A) e 9R (B).....45
- Figura 7.** Produção cumulativa de H₂ (mmol) da fermentação de 5 (triângulos), 10 e 14 (quadrados) e 40 gL⁻¹ (círculos) de glicerol para os isolados 3R (A) e 9R (B).....46
- Figura 8.** Ajuste do modelo modificado de Gompertz aos dados experimentais do ensaio G10 para o isolado 9R, apresentado aqui como exemplo dos ajustes obtidos para os demais experimentos.....47
- Figura 9.** Monitoramento dos produtos da fermentação do glicerol em diferentes concentrações iniciais pelo isolado 3R. ▲ = G5 (glicerol inicial a 5 gL⁻¹) e ■ = G10.....54
- Figura 10.** Monitoramento dos produtos da fermentação do glicerol em diferentes concentrações iniciais pelo isolado 9R. ▲ = G5 (glicerol inicial a 5,00 gL⁻¹), ■ = G10 (glicerol inicial a 14,00 gL⁻¹) e ● = G40 (glicerol inicial a 40,00 gL⁻¹).....55
- Figura 11.** Modelagem dos dados de crescimento microbiano e consumo de glicerol nas condições (A) G5, (B) G10 e (C) G40. ○ – Dados experimentais do crescimento da biomassa; + – dados experimentais do consumo de glicerol; linha contínua – modelagem do crescimento da biomassa; linha tracejada – modelagem do consumo de glicerol. (A) e

(B) dados modelados pelo modelo de Monod e (C) dados modelados pelo modelo de Luong.....	67
Figura 12. Distribuição do fluxo de carbono pelo isolado 9R nas condições G5, G10 e G40. Esquerda: Rendimento (mol/mol glicerol) de biomassa e produtos produzidos previamente a acetil-CoA. Símbolos abertos: círculo – 1,3-PDO, quadrado – ácido succínico, triângulo – ácido láctico, triângulo invertido - biomassa. Direita: Rendimento (mol/mol glicerol) de produtos derivados de acetil-CoA. Símbolos fechados: círculo – etanol, quadrado – H ₂ , triângulo – ácido fórmico, triângulo invertido – ácido acético. Abaixo: Razão dos rendimentos dos produtos pós acetil-CoA/pré acetil-CoA nas três condições.....	69
Figura 13. Crescimento (esquerda) e produção de hidrogênio (direita) pelo isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R sob condições variadas de concentrações iniciais de glicerol para inóculos e ensaios de fermentação.....	73
Figura 14. Curvas de concentração dos metabólitos solúveis pelo isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R sob condições variadas de concentrações iniciais de glicerol para inóculos e ensaios de fermentação.....	74
Figura 15. Crescimento (esquerda) e produção de hidrogênio (direita) pelo isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R sob condições variadas de pH, oxigenação e concentrações iniciais de glicerol.....	76
Figura 16. Curvas de concentração dos metabólitos presentes no meio de fermentação do isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R sob condições variadas de pH, oxigenação e concentrações iniciais de glicerol.....	78
Figura 17. Crescimento da biomassa (esquerda) e produção de H ₂ (direita) pelo isolado 9R na presença de impurezas em diferentes concentrações.....	80
Figura 18. Concentração final dos produtos da fermentação do glicerol a 10 gL ⁻¹ pelo isolado 9R na presença de impurezas em diferentes concentrações.....	82
Figura 19. Consumo de glicerol e metabólitos produzidos após 24 horas de fermentação de glicerol a 40,00 gL ⁻¹ pelo isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R com diferentes concentrações iniciais de inóculo.....	84
Figura 20. Produção de H ₂ por uma amostra em uso (esquerda) ou descongelada (direita) do isolado 9R em ensaios durante 4 meses sem contato do isolado com glicerol.....	86
Figura 21. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável resposta Y _{P/S} de etanol.....	94

Figura 22. Superfície de resposta para a variável resposta $Y_{P/S}$ de etanol. A variável Inóculo foi fixada em $0,02 \text{ gL}^{-1}$	94
Figura 23. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável resposta $Y_{P/S}$ de hidrogênio.....	98
Figura 24. Superfície de resposta para a variável resposta $Y_{P/S}$ de hidrogênio. A variável Inóculo foi fixada em $0,02 \text{ gL}^{-1}$	98
Figura 25. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável resposta consumo de glicerol.....	103
Figura 26. Superfícies de resposta para a variável resposta consumo de glicerol. (Acima) A variável Inóculo foi fixada em $0,02 \text{ gL}^{-1}$. (Ao centro) A variável Glicerol foi fixada em $27,50 \text{ gL}^{-1}$. (Abaixo) A variável pH foi fixada em 8,0.....	104
Figura 27. Análise de desejabilidade para a configuração HEPG (maior consumo de glicerol e produção equilibrada de etanol, H_2 e 1,3-PDO).....	106
Figura 28. Análise de desejabilidade para a configuração PG (maior consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO).....	106
Figura 29. Análise de desejabilidade para a configuração HEG (maior consumo de glicerol e produção de etanol e H_2).....	107
Figura 30. Curvas de concentração dos metabólitos solúveis nas configurações HEPG (●), PG (■) e HEG (▲) durante as 48 horas de fermentação.....	111
Figura 31. Crescimento e produção de hidrogênio pelo isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R nas configurações HEPG (●), PG (■) e HEG (▲) durante as 48 horas de fermentação.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição média do glicerol bruto originário de diferentes biomassas e usinas de produção.....	6
Tabela 2. Comparação entre diferentes combustíveis em relação à capacidade calorífica e emissão específica de carbono. Adaptado de Das e colaboradores, 2014.....	12
Tabela 3. Vantagens da produção de biohidrogênio. Adaptado de Das e colaboradores, 2014.....	12
Tabela 4. Valores das variáveis pH, concentração inicial de glicerol e inóculo determinados pelo planejamento experimental de Doehlert.....	41
Tabela 5. Características morfológicas dos isolados do lodo de um reator anaeróbio tratando glicerol residual (NUNES, 2014).....	42
Tabela 6. Identidade entre a sequência do gene 16S rRNA dos isolados e de espécies de referência e produção volumétrica de biogás em 24 horas (NUNES, 2014).....	43
Tabela 7. Caracterização bioquímica dos isolados 3R e 9R.....	44
Tabela 8. Dados experimentais e modelados da produção de hidrogênio e dados experimentais do consumo de glicerol e rendimento de hidrogênio.....	48
Tabela 9. Concentrações e rendimentos finais ($Y_{P/S}$) dos produtos da fermentação do glicerol pelos isolados 3R e 9R nas condições G5, G10 e G40. Os rendimentos $Y_{P/S}$ são dados em mol produto/mol glicerol consumido.....	52
Tabela 10. Coeficientes estequiométricos de substratos e produtos para as condições G5, G14 e G40 para o isolado 9R.....	65
Tabela 11. Parâmetros cinéticos encontrados para os ensaios pelo modelo de Monod (para G5 e G10) e pelo Modelo de Luong (para G40).....	66
Tabela 12. Condições experimentais fornecidas pelo planejamento experimental de Doehlert e variáveis resposta obtidas para cada ensaio (24h).....	90
Tabela 13. Resultados da análise de variância (ANOVA) para a variável resposta $Y_{P/S}$ de etanol.....	93
Tabela 14. Resultados da análise de variância (ANOVA) para a variável resposta $Y_{P/S}$ de hidrogênio.....	97
Tabela 15. Dados obtidos com o modelo modificado de Gompertz e produção máxima de hidrogênio pelo isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R para os diferentes ensaios determinados pelo planejamento experimental.....	99

Tabela 16. Resultados da análise de variância (ANOVA) para a variável resposta consumo de glicerol.....	103
Tabela 17. Condições determinadas pela ferramenta de desejabilidade e quantidades médias dos produtos obtidos e glicerol consumido para cada configuração com 24 horas de fermentação. HEPG: maior consumo de glicerol e produção equilibrada de H ₂ , etanol e 1,3-PDO; PG: maior consumo de glicerol e favorecimento da produção de 1,3-PDO; e HEG: maior consumo de glicerol e favorecimento da produção de H ₂ e etanol.....	109
Tabela 18. Dados obtidos com o modelo modificado de Gompertz e produção máxima de hidrogênio pelo isolado <i>Enterobacter</i> sp. 9R para as diferentes configurações determinadas pela função de desejabilidade.....	113
Tabela 19. Rendimentos de etanol e hidrogênio e taxa volumétrica de produção de hidrogênio após 24 horas de fermentação do glicerol por <i>Enterobacter</i> sp. 9R.....	115
Tabela 20. Resultados obtidos para a produção de hidrogênio e/ou etanol por diferentes sistemas e culturas para a fermentação em batelada do glicerol.....	116

CAPÍTULO 1

1. Revisão de Literatura

1.1. Aumento da demanda energética e produção de biocombustíveis

A estrutura da sociedade moderna é fundamentada no uso de combustíveis fósseis, principalmente carvão mineral e petróleo, para a geração da energia necessária às atividades cotidianas. Entretanto, além da incerteza sobre a disponibilidade das reservas desses combustíveis, diversos problemas ambientais estão associados à sua produção e consumo (LI et al., 2013). Como exemplo, entre 1970 e 2004, o crescimento da demanda energética para as atividades industriais e de transporte, e do consequente consumo de combustíveis fósseis, aumentou em aproximadamente 70% as emissões mundiais de dióxido de carbono (PHILP et al., 2013). A liberação de grandes quantidades de CO₂ na atmosfera é alvo de grandes discussões e, há muitas décadas, é correlacionada a situações como o efeito estufa, o aquecimento global e o aumento do nível do mar (MERCER, 1978; NORDHAUS, 1991).

Levando em consideração os problemas citados, nos últimos anos é crescente a busca por formas alternativas de energia que sejam menos poluentes e que possuam ciclos de renovação mais rápidos, chamadas de energias limpas e renováveis, respectivamente. Entre os principais recursos energéticos renováveis em uso atualmente estão a energia eólica, solar, hidroelétrica e de biomassa – a qual inclui produtos e resíduos agroindustriais e os biocombustíveis (bioetanol e biodiesel). No Brasil, fontes renováveis são de grande importância para a matriz energética, sendo que enquanto a média mundial de geração de energia a partir de tais fontes é de 13%, 46% da energia em nosso país é oriunda de recursos renováveis. Com grande participação nesse percentual, devem ser ressaltados a energia hidrelétrica, os produtos da cana-de-açúcar (principalmente o etanol) e o biodiesel, o qual apresenta aumentos anuais crescentes em sua produção (EPE, 2018).

O uso de biocombustíveis no Brasil teve seu primeiro pico na década de 70, quando, frente à iminência de escassez do petróleo e à instabilidade política dos países produtores, o país iniciou o plano Pró-Álcool, uma medida governamental que, por meio da PETROBRAS, subsidiou a produção e a venda de etanol combustível produzido a partir da cana-de-açúcar. Atualmente, o etanol é consumido em sua forma anidra, a qual é misturada à gasolina no percentual de 27% para aumentar sua octanagem, ou hidratada, podendo ser usado diretamente como combustível (GOLDEMBERG, 2008; MME,

2018). Em 2009, a produção de etanol alcançou 24 bilhões de litros, alimentando 12,5 milhões de veículos no país e em 2017 foram produzidos mais de 27 bilhões de litros desse biocombustível (EPE, 2018; MORAES, 2011).

Outra alternativa ao uso de derivados de petróleo é o biodiesel, combustível composto de ésteres alquílicos obtidos da transesterificação de ácidos graxos (óleos vegetais e gorduras animais). A possibilidade de mistura do biodiesel ao diesel convencional tem aumentado progressivamente a produção e o consumo desse biocombustível. Em 2012, a produção dos países integrantes da União Europeia alcançou os 3 bilhões de galões, enquanto os Estados Unidos foram responsáveis por 1 bilhão de galões, soma equivalente a aproximadamente 15,2 bilhões de litros (SARMA *et al.*, 2013a).

No Brasil, como efeito do lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) em 2004, entre 2006 e 2012 a produção aumentou de 69 milhões para 2,7 bilhões de litros, sendo que a capacidade de plantas de produção instaladas no país em 2012 chegou a 6,2 bilhões de litros por ano (LEONETI *et al.*, 2012). Segundo o último balanço energético nacional, a produção de biodiesel no país ultrapassou os 4,2 bilhões de litros em 2017 e estima-se que o consumo em 2018 tenha chegado aos 5,3 bilhões de litros (EPE, 2018; MME, 2018). Esse crescimento da produção de biodiesel, apesar de trazer vários benefícios ambientais, acarreta também na geração de maiores quantidades de subprodutos residuais (constituídos principalmente pelo glicerol), os quais necessitam de atenção especial à sua destinação.

1.2. Ascensão do biodiesel e a questão da co-produção de glicerol residual

Em nosso país, desde 2005 o biodiesel vem sendo misturado ao diesel convencional vendido em postos varejistas, sendo que a partir de 2008 a adição de 2 % de biodiesel ao diesel (o chamado B2) tornou-se obrigatória, em 2010 foi elevada para 5 % e atualmente está a 10 %, com aumentos progressivos previstos para os próximos anos, tendo como máximo os 15 % até 2023. Em casos especiais, como uso industrial e agrícola, a legislação regulamenta a adição de 20 a 30 % de biodiesel ao diesel de petróleo. Em países da União Europeia e nos Estados Unidos (outros dois maiores produtores mundiais de biodiesel) o panorama atual e as previsões futuras são similares. Essa condição de obrigatoriedade legal acarretou no aumento da demanda nacional de biodiesel, tornando o Brasil o segundo maior produtor mundial e beneficiando pequenos produtores de grãos com inclusão social e desenvolvimento regional (YAZDANI e GONZALEZ, 2007;

LEONETI *et al.*, 2012; NAYLOR e HIGGINS, 2017; MME, 2018; PADULA *et al.*, 2012).

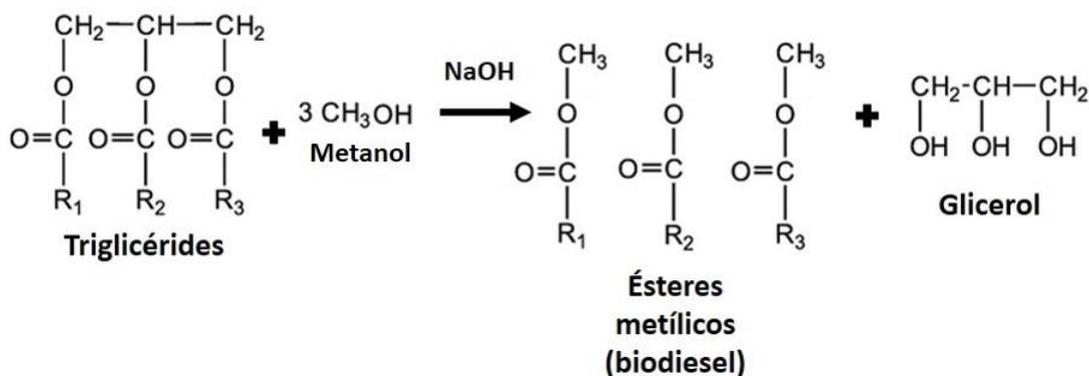
Fundamentado nas promessas de benefícios ambientais e sociais, a afirmação do biodiesel como integrante eminente da matriz energética mundial foi conseguida por meio da confirmação de sua viabilidade econômica. Essa, por envolver questões como o uso de terras que poderiam ser empregadas para a produção de alimentos e estar relacionada diretamente aos preços do petróleo, foi estabelecida e é mantida com o auxílio de diretivas e subsídios políticos e econômicos, principalmente em épocas de baixa no valor de mercado do petróleo (NAYLOR e HIGGINS, 2017). Além disso, a grande geração de subprodutos, principalmente o glicerol, é um fator ao qual se deve atenção permanente durante a era de produção do biodiesel, a fim de garantir sua sustentabilidade ambiental, sendo o manejo do glicerol considerado ainda como principal gargalo da indústria desse biocombustível (MONTEIRO *et al.*, 2018).

A co-produção de glicerol residual é um fato inerente à maioria dos processos de produção de biodiesel realizados atualmente, visto que esse biocombustível é obtido pela reação de transesterificação (Figura 1) de ácidos graxos, na qual um álcool (metanol ou etanol) e um catalisador alcalino (hidróxido de sódio ou de potássio) são adicionados a uma mistura de triglicérides (óleos vegetais ou gorduras animais). Durante a reação, após interação do catalisador com o álcool, ocorre um processo de substituição acílica nucleofílica, no qual as moléculas de triglicérides são convertidas em glicerol e ésteres alquílicos de ácidos graxos, o biodiesel. Em alguns processos, ao invés do uso de um catalisador básico e um álcool, é empregado diretamente o íon alcóxido do metanol ou outro álcool de cadeia curta. Com aquecimento a 55°C, a reação é completada em aproximadamente 3 horas, sendo necessárias de 24 a 48 horas adicionais para a separação, por sedimentação, dos ésteres e do glicerol (MONTEIRO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2009).

Como produto inevitável da reação, o glicerol é gerado na razão de 10 kg para cada 100 kg de biodiesel produzidos. Além da reação de transesterificação, a presença de água e ácidos graxos livres (AGL) em óleos vegetais acarreta na ocorrência da saponificação dos AGL, decorrente de sua reação com o catalisador alcalino (LEUNG *et al.*, 2010). Desse modo, ao final do processo, o principal resíduo da produção de biodiesel é o glicerol bruto, uma mistura de glicerol, sabão, ácidos orgânicos livres, sais inorgânicos, água, ésteres metílicos e metanol, além de mono-, di- e triglicérides que não reagiram. Tanto a composição quanto a proporção dos componentes podem variar

dependendo da matéria-prima, método de transesterificação e condições de separação do glicerol residual (CHATZIFRAGKOU e PAPANIKOLAOU, 2012). A tabela 1 mostra os principais componentes do glicerol bruto bem como a faixa de variação de sua porcentagem em dependência do tipo de óleo vegetal empregado para a produção de biodiesel.

Figura 1. Processo de transesterificação para a produção de biodiesel. Na presença de um catalisador alcalino o metanol reage com a porção de ácidos graxos que compõe o triglicéride, formando moléculas de ésteres metílicos (biodiesel) e glicerol. Adaptado de Silva e colaboradores, 2009.



Inicialmente considerado um co-produto, o glicerol bruto, após purificação, era vendido a indústrias de cosméticos, de bebidas, farmacêuticas e alimentícias (YAZDANI *et al.*, 2010). No entanto, o crescimento da oferta do glicerol bruto, que acompanhou a expansão do setor do biodiesel, fez com que seu preço no mercado internacional caísse em aproximadamente dez vezes apenas entre 2004 e 2006 (YAZDANI e GONZALEZ, 2007). No Brasil, em 2005, o preço médio do glicerol era de R\$ 3,00/kg, sendo que em 2012 (ano em que foram produzidos 270 milhões de litros de glicerol residual de biodiesel) esse valor chegou a R\$ 0,60/kg. Apesar de variações positivas e negativas no valor de mercado do glicerol em decorrência da falência de indústrias que produziam esse composto antes do crescimento das usinas de biodiesel, dados do ano de 2017 mostram que o resultado líquido dessas alternâncias foi a queda do preço do glicerol para R\$ 0,25/kg (Biomercado, 2017).

Tabela 1. Composição média do glicerol bruto originário de diferentes biomassas e usinas de produção.

Composto	Porcentagem (m/m)
Glicerol	22,90 – 96,50
Metanol	0,00 – 22,70
Sais	0,01 – 6,60
Água	1,0 – 28,7
Sabão	0,0 – 31,4
Ésteres alquílicos de ácidos graxos	0,5 – 28,8
Glicerídeos	0,4 – 7,0
Ácidos graxos livres	0,0 – 34,8
Cinzas	0,0 – 29,4

Fonte: Adaptado de Chen e Walker, 2011; Hansen *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2012; Kerr *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2010; Mothes *et al.*, 2007; Rywinska *et al.*, 2016; Venkataramanan *et al.*, 2012.

A queda no preço, aliada aos altos custos de purificação do glicerol bruto, aumentou drasticamente a razão oferta/demanda desse subproduto, transformando o que era antes um co-produto em um resíduo da produção de biodiesel para o qual o descarte sem tratamento pode acarretar em problemas ambientais. Tendo em vista o crescimento previsto para a indústria de biodiesel e os valores do glicerol bruto até o ano de 2017, era consenso que a expansão dessas usinas dependeria fortemente do desenvolvimento de métodos para a conversão do glicerol bruto residual em outros produtos com maior valor agregado (HUANG *et al.*, 2017; LEONETI *et al.*, 2012).

Tal conjuntura impulsionou o desenvolvimento de vários estudos na área de conversão do glicerol. No entanto, variações inesperadas e abruptas nos preços tanto para o glicerol quanto para os produtos oriundos de sua transformação devem ser considerados devido às flutuações do mercado, de modo que a busca por métodos de conversão do glicerol deve ser justificada não só por agregar valor a este substrato mas também por aumentar a gama de *commodities* que pode ser oferecida por uma indústria de biodiesel, convertendo-a, de fato, em uma biorrefinaria.

Além disso, apesar de ocorrer em menores proporções, o glicerol também é um resíduo da produção de etanol, o mais importante biocombustível nacional. Durante a conversão de açúcares em etanol, as leveduras responsáveis pelo processo produzem

glicerol, o qual é encontrado na concentração de 2% (m/v) no caldo ao final da fermentação e, caso seja de interesse da usina, também pode ser direcionado para um processo de transformação (YAZDANI et al., 2010).

Portanto, a despeito das oscilações de mercado, a conversão do glicerol em outros produtos químicos apresenta-se como uma solução tanto para o problema de destinação de resíduos quanto para a consolidação de indústrias de biodiesel como biorrefinarias, nas quais todos os compostos gerados possam ser considerados produtos de interesse econômico, seja de maneira imediata ou a médio e longo prazo.

1.3. Transformação de indústrias de produção de biodiesel em biorrefinarias

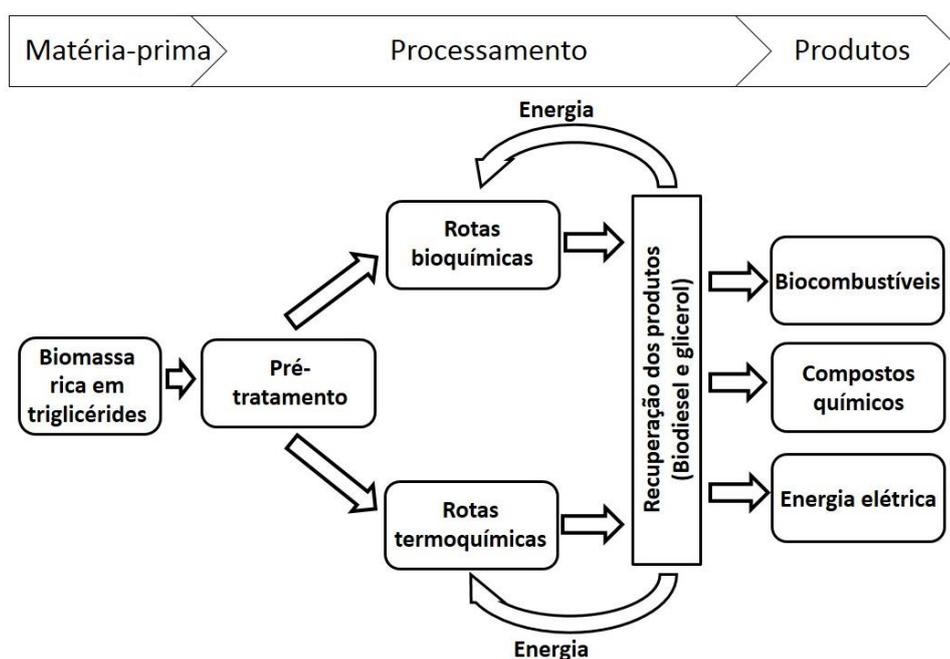
A possibilidade de conversão do glicerol residual de biodiesel em produtos com maior potencial de mercado ou que sirvam como recurso energético propicia a transformação de indústrias de biodiesel em biorrefinarias. O conceito de biorrefinaria pode ser definido como uma unidade fabril na qual a biomassa é convertida em um produto final e os resíduos do processo podem ser transformados – por meio de vias termoquímicas ou bioquímicas – em produtos químicos, energia (eletricidade ou calor) e biocombustíveis, de modo que tudo que resulte do processo produtivo apresente algum ganho para a usina (AZAPAGIC, 2014). Uma explicação simplificada do conceito de biorrefinaria aplicado às indústrias de biodiesel pode ser visto na figura 2.

Processos de transformação do glicerol residual em outros bens de capital ou consumo podem ser realizados através de aplicação direta, transformação química ou conversão microbiana. Um exemplo de aplicação direta do glicerol é seu emprego na alimentação de gado. No entanto, a presença de metanol e outros compostos no glicerol bruto exige o pré-tratamento do resíduo para a diminuição de efeitos danosos desses contaminantes sobre os animais (YANG et al., 2012).

Devido às suas características químicas peculiares, o glicerol pode ser convertido em compostos químicos variados, tanto por meios termoquímicos quanto por processos biológicos. Entre as conversões termoquímicas, podem ser citados os processos de polimerização, reforma a vapor, eterização, oligomerização e pirólise. Apesar de úteis na obtenção de produtos como polímeros cíclicos, acroleína, acetaldeído, alcanos e hidrogênio, essas reações ocorrem em temperaturas entre 90 e 650°C, sendo que algumas são dependentes de catalisadores químicos e de alterações na pressão do sistema, fatores que elevam os gastos com o processo (ALSAMAD *et al.*, 2018; MEDEIROS et al., 2011). Wu e colaboradores (2013) demonstraram a produção simultânea de hidrogênio e

nanotubos de carbono a partir da reforma do glicerol, processo que exige o uso de catalisadores químicos complexos e temperaturas de 700 °C. Como visto, a despeito dos produtos obtidos, os processos termoquímicos requerem, além de catalisadores, alto gasto energético para a operação dos reatores.

Figura 2. Conceito simplificado da integração de processos em uma biorrefinaria. Adaptado de Azapagic, 2014.



Por outro lado, tais exigências não são encontradas em processos biológicos de conversão do glicerol residual. Na literatura são descritas várias linhagens bacterianas com a capacidade de metabolizar o glicerol na presença ou ausência de aceptores finais de elétrons (em processos de respiração ou fermentação, respectivamente) sendo que os processos fermentativos são mais interessantes pois, além de produzirem diferentes metabólitos e não necessitarem de gastos com a aeração dos reatores, também apresentam a possibilidade de co-produção sequencial de biogás contendo hidrogênio e/ou metano (ALMEIDA *et al.*, 2012 DAMS *et al.*, 2018; DIKSHIT *et al.*, 2018; LENG *et al.*, 2019; SARMA *et al.*, 2013; SPEECE, 1983). Entre as bactérias com a capacidade de fermentação do glicerol encontram-se espécies dos gêneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*,

Anaerobiospirillum e *Gluconobacter*, entre outras (DIKSHIT *et al.*, 2018; MURARKA *et al.*, 2008)

Além dessas bactérias, Dharmadi e colaboradores (2006) demonstraram a capacidade da bactéria *Escherichia coli* de utilizar o glicerol na ausência de aceptores finais de elétrons, ao contrário do que já tinha sido apresentado em outros trabalhos. Como discutido por Dharmadi e colaboradores (2006), a fermentação de glicerol por *E. coli* ainda não havia sido verificada devido à faixa de pH empregada para os meios de cultura. Segundo os autores, a alteração do pH de valores básicos para valores ácidos possibilitou a degradação anaeróbia do glicerol devido ao aumento da atividade do complexo FHL em condições ácidas, acarretando na maior disponibilidade de CO₂, um composto importante para várias vias anabólicas em *E. coli*.

No entanto, trabalhos posteriores de outro grupo mostraram que a degradação do glicerol por *E. coli* pode ocorrer em faixas iniciais de pH básico, auxiliando na atividade das enzimas glicerol desidrogenase e dihidroxiacetona quinase (primeiras a atuarem na degradação do substrato) e que a consequente acidificação intracelular causada pela formação de ácidos orgânicos possibilitaria a atuação do complexo FHL (TRAN *et al.*, 2015). Levando em consideração o conhecimento sobre o genoma e a similaridades entre o metabolismo de *E. coli* e de outros micro-organismos (principalmente da família *Enterobacteriaceae*), tal descoberta apresenta grande importância para estudos sobre as vias metabólicas de conversão do glicerol, mesmo que as taxas de metabolização do glicerol por essa bactéria ainda sejam muito menores que as encontradas para outras espécies (ITO *et al.*, 2005; TRAN *et al.*, 2014).

Quando comparado a açúcares como glicose, xilose, arabinose e sacarose (substratos comuns utilizados em biorrefinarias lignocelulósicas), o uso de glicerol em processos de fermentação apresenta a vantagem de este ser um co-produto inerente a um biocombustível em expansão contínua no mercado além de não ser usado como recurso para alimentação humana. Outro ponto a favor do uso de glicerol para a produção biológica de compostos químicos é o maior grau de redução (κ) de seus átomos de carbono ($\kappa = 4,67$) em relação aos açúcares supracitados – todos com $\kappa = 4,00$ – e também em relação à massa celular bacteriana ($\kappa = 4,30$) (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013; NIELSEN *et al.*, 2003).

O grau de redução por carbono (κ) de uma molécula pode ser interpretado como o número de elétrons disponíveis por unidade de carbono ou, em outras palavras, a “quantidade de energia” disponível por carbono do substrato orgânico. Visto o maior κ

do glicerol em relação à massa celular, seu consumo pelos micro-organismos acarreta no excesso de equivalentes redutores durante a produção de biomassa bacteriana. Para garantir a manutenção do estado redox intracelular, os micro-organismos redirecionam tais equivalentes redutores para vias que possam consumi-los, possibilitando uma maior obtenção de compostos mais reduzidos (tais como 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol e propanol) quando comparado à fermentação da glicose (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013; HUANG *et al.*, 2017).

Por meio de fenômenos de regulação enzimática, esse maior grau de redução do glicerol facilita a produção simultânea de etanol e hidrogênio por anaeróbios facultativos, o que é mais difícil de se obter quando a glicose é usada como substrato, além de também ser possível a produção de demais produtos comuns da fermentação (como lactato, succinato, formiato, propanol e butanol) (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013; LI *et al.*, 2013; NIELSEN *et al.*, 2003). Detalhes da fermentação do glicerol e da regulação enzimática serão apresentados a frente, no item 1.5.

Além dos biocombustíveis e outros compostos orgânicos, alguns trabalhos mostram a possibilidade de produção direta de eletricidade durante a degradação do glicerol com o uso de sistemas bioeletroquímicos, como as células de combustível microbianas. Esses sistemas aliam o tratamento de resíduos à produção de energia elétrica por meio da oxidação bacteriana da matéria orgânica em câmaras similares às baterias elétricas. O processo consiste da respiração anaeróbia do substrato – e consequente liberação de prótons e elétrons – por micro-organismos aderidos a um anodo, o qual serve como receptor final de elétrons. A migração dos prótons (através da solução) e dos elétrons (através de um circuito externo) até o cátodo dá origem a uma corrente elétrica (NIMJE *et al.*, 2011). Nimje e colaboradores (2011), reportaram a capacidade de geração de 60 mW/m² de potência por meio da degradação do glicerol bruto pela bactéria *Bacillus subtilis*. Nesse âmbito, Chookaew e colaboradores (2014) demonstraram a possibilidade de produção sequencial de H₂ e eletricidade em um sistema de dois estágios para a conversão de glicerol residual em bioenergia por uma comunidade mista. No sistema reportado pelos autores, o resíduo foi primeiramente fermentado a hidrogênio (com rendimento de 0,55 mol de H₂/mol de glicerol) e ácidos orgânicos. Na segunda etapa, os ácidos foram empregados como substrato em uma célula de combustível microbiana, gerando uma potência de 92 mW/m².

Como demonstrado nos trabalhos discutidos acima, a bioconversão do glicerol residual é uma alternativa interessante para a geração de diferentes bens de interesse

econômico por indústrias de biodiesel, por meio da produção de energia, biocombustíveis e de outros compostos com potencial de mercado. Em nosso trabalho, o foco foi voltado principalmente para a produção de hidrogênio, etanol e 1,3-propanodiol, compostos que podem ser produzidos simultaneamente e apresentam características físico-químicas que facilitam sua separação.

1.4. Produção e vantagens do hidrogênio

Entre os biocombustíveis que podem ser obtidos por meio da fermentação do glicerol residual, o hidrogênio é um produto ao qual é dedicada atenção crescente nos últimos anos. Frente a outros biocombustíveis, o biohidrogênio mostra três principais vantagens que o tornam um promissor carreador de energia limpo e renovável. Em primeiro lugar, o H₂ é o único combustível livre de carbono, de modo que durante sua conversão no interior de células de combustão o principal resíduo gerado é a água, sem que haja liberação de gases causadores do efeito estufa. Em segundo lugar, o dióxido de carbono emitido na produção biológica de hidrogênio pode ser facilmente capturado, visto que é liberado durante a produção – e não durante o consumo – desse biocombustível. Outra vantagem do hidrogênio é sua maior capacidade calorífica (em termos mássicos) em comparação a combustíveis fósseis convencionais ou mesmo os demais biocombustíveis (BIELEN *et al.*, 2013; VALLE *et al.*, 2017). As principais diferenças entre o H₂ e outros combustíveis podem ser vistas na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação entre diferentes combustíveis em relação à capacidade calorífica e emissão específica de carbono. Adaptado de Das e colaboradores, 2014.

Combustível	Estrutura química	Conteúdo de carbono (% m/m)	Capacidade calorífica (MJ/kg)	Emissão específica de carbono (kg C/kg combustível)
Hidrogênio	H ₂	0,0	141,90	0,00
Etanol	C ₂ H ₅ OH	52,0	29,90	0,50
Biodiesel	Ésteres alquílicos de ácidos graxos (C12 a C22)	77,0	37,00	0,50
Metanol	CH ₃ OH	37,5	22,30	0,50
Metano	CH ₄	75,0	50,00	0,46
Gasolina	C4 a C12	74,0	47,40	0,86

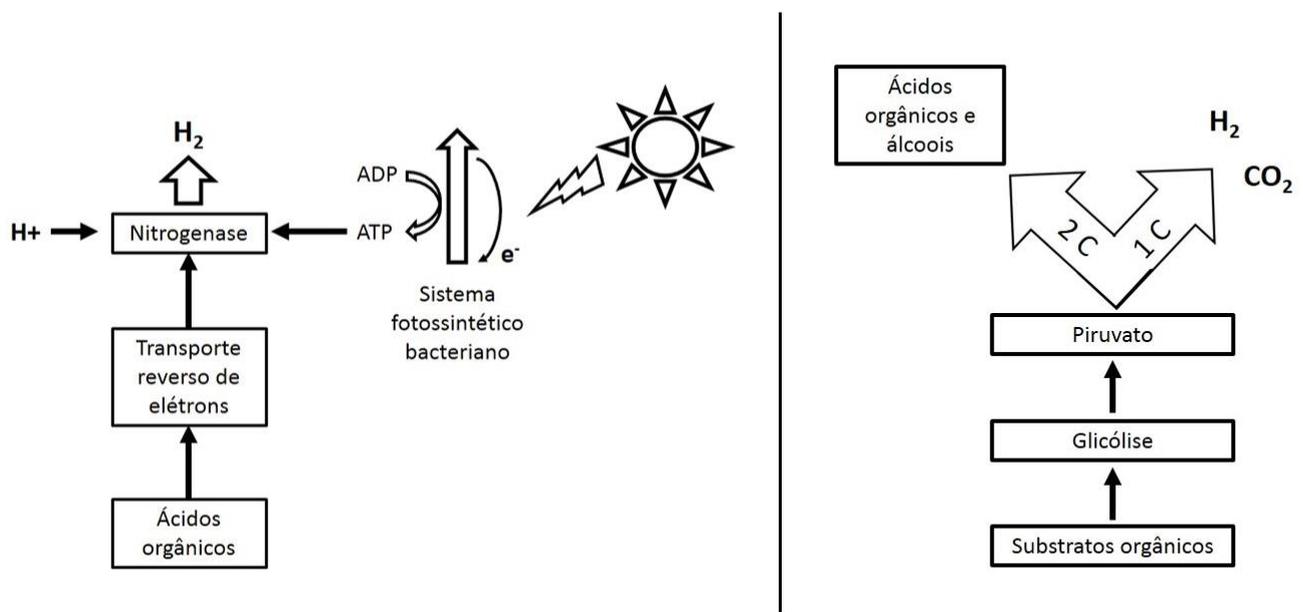
Como ocorre para outros produtos químicos, o hidrogênio também pode ser obtido por processos termoquímicos de conversão do glicerol ou outros substratos. Para a obtenção de H₂ são utilizados praticamente apenas insumos fósseis e, até os dias de hoje, os principais métodos de produção desse gás são: reforma a vapor de gás natural (48%), reforma de óleos e nafta (30%), gaseificação de carvão mineral (18%) e eletrólise da água (3,9%) (DAS e VEZIROGLU, 2008; ŁUKAJTIS *et al.*, 2018; MOHAN e PANDEY, 2013). Contudo, além de muitos desses métodos serem baseados em recursos não renováveis, eles também apresentam as mesmas desvantagens citadas anteriormente para as conversões termoquímicas do glicerol, como a exigência de altas temperaturas e o alto gasto energético. Mesmo o processo de eletrólise da água, que pode usar energia elétrica obtida de geradores eólicos ou fotovoltaicos, apresenta grandes perdas energéticas e emprega na geração de hidrogênio uma forma já refinada de energia (eletricidade), a qual poderia ser usada diretamente para consumo (HALLENBECK, 2009). Por outro lado, a produção biológica de hidrogênio ocorre em condições mais brandas de temperatura e pressão, além de aliar o tratamento de resíduos à produção de H₂. Outras vantagens da produção de biohidrogênio são listadas na tabela 3.

Tabela 3. Vantagens da produção de biohidrogênio. Adaptado de Das e colaboradores, 2014.

Vantagens do biohidrogênio	Comentário
Naturalidade	Produzido por micro-organismos sob condições ambientais de temperatura e pressão.
Neutralidade	Produção não acarreta na emissão de gases causadores do efeito estufa, desde que o dióxido de carbono seja retido.
Versatilidade	Pode ser produzido de uma grande variedade de substratos, incluindo glicerol residual.
Garantia de substratos	Certeza da produção contínua de resíduos em grandes quantidades.
Sustentabilidade	Produção e consumo atual não interferem negativamente em processos futuros.
Segurança energética	Redução da dependência energética de países politicamente instáveis.
Acessibilidade	Mais rentável quando comparado aos combustíveis fósseis.
Eficiência	A combustão do H ₂ é 50% mais eficiente do que da gasolina.

Os processos biológicos de produção de H_2 podem ser separados em dois principais grupos: os que necessitam de luz (fotofermentação e biofotólise direta ou indireta) ou os que ocorrem na ausência de luz (fermentação escura), sendo que os processos de fotofermentação e fermentação escura recebem maior atenção, devido aos resultados mais promissores (HALLENBECK e GHOSH, 2009; KHETKORN *et al.*, 2017; YANG e WANG, 2018). O esquema simplificado dos dois processos pode ser visto na figura 3.

Figura 3. Esquema simplificado dos processos de produção biológica de hidrogênio por fotofermentação (esquerda) e fermentação escura (direita). Adaptado de Hallenbeck e Ghosh (2009).



No processo de fotofermentação, bactérias fotossintéticas usam a luz e substratos orgânicos (preferencialmente ácidos carboxílicos) para a obtenção de ATP e elétrons, por meio de um processo chamado fluxo reverso de elétrons. Esses elétrons são usados para reduzir a proteína ferredoxina, a qual, juntamente com as moléculas de ATP geradas, direciona a redução de prótons (H^+) a hidrogênio (H_2) realizada, com auxílio da enzima nitrogenase na ausência de nitrogênio. Apesar da conversão praticamente completa de alguns substratos a H_2 e CO_2 , a operação contínua do processo de fotofermentação depende da exposição constante dos reatores à luz, necessidade que acarreta em gastos adicionais com energia para iluminação. Além disso, os fotobiorreatores têm que ser construídos com materiais acrílicos transparentes e impermeáveis ao hidrogênio, o que

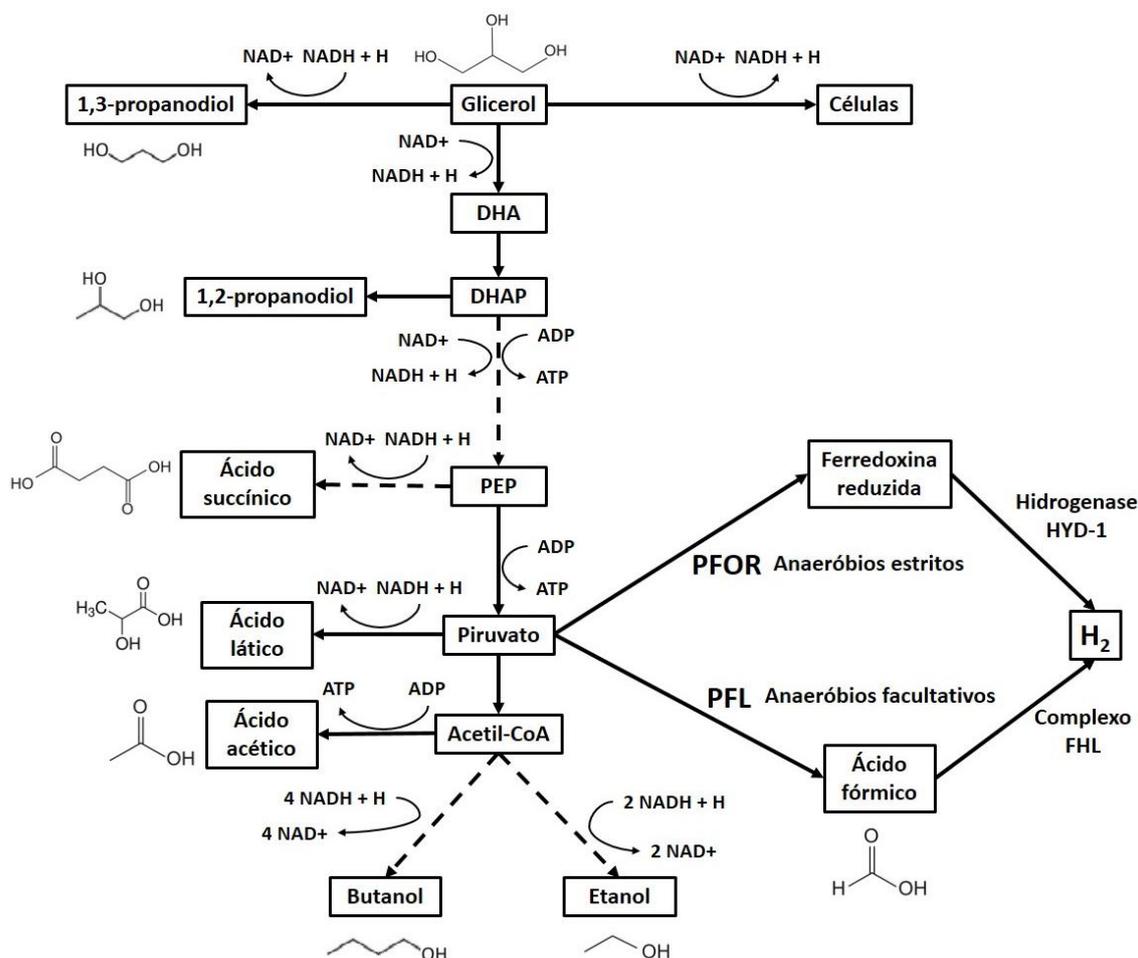
também torna o processo mais oneroso (HALLENBECK e GHOSH, 2009; KHETKORN *et al.*, 2017).

Tais desvantagens não são encontradas nos processos de fermentação escura, os quais ocorrem na ausência de luz e podem ser realizados em reatores convencionais, mas também impermeáveis ao hidrogênio. Além disso, devido à variada capacidade de degradação de micro-organismos fermentativos, diferentes tipos de resíduos, inclusive o glicerol bruto, podem ser empregados para a produção de biohidrogênio. Outros resíduos orgânicos (como restos de alimentos, resíduos de suinocultura e bagaço de cana-de-açúcar) também podem ser empregados para a produção biológica de hidrogênio. No entanto, materiais lignocelulósicos (como o bagaço de cana-de-açúcar) requerem métodos de pré-tratamento severos para que seus açúcares se tornem disponíveis para os micro-organismos produtores de hidrogênio, enquanto que resíduos sólidos (como os de suinocultura ou alimentícios) necessitam de moagem e/ou mistura para que possam ser submetidos à fermentação. Por outro lado, o glicerol residual produzido pela indústria de biodiesel pode ser diretamente consumido por micro-organismos fermentativos após a diluição do resíduo e tratamentos menos severos, mostrando-se como um substrato ideal para futura a produção em larga escala de hidrogênio, como já demonstrado para diferentes bactérias (SARMA *et al.*, 2012; YANG e WANG, 2018)

1.5. Fermentação do glicerol a hidrogênio, etanol e outros metabólitos

Como citado anteriormente, o glicerol apresenta características químicas que propiciam a produção biológica não só de hidrogênio, mas de vários bens econômicos, principalmente o etanol, quando a bioconversão é realizada por alguns tipos de enterobactérias. A produção de ácidos e outros compostos orgânicos durante a fermentação escura também pode ser considerada como uma vantagem desse método biológico, visto que esses podem ser purificados e empregados em variados processos químicos ou usados como substrato em uma segunda etapa de produção de hidrogênio, dessa vez por fotofermentação. Alguns trabalhos mostram também a possibilidade de uso do efluente ou das células geradas durante a fermentação escura de diferentes fontes de carbono como substrato para a produção de metano por digestão anaeróbia (BAËTA *et al.*, 2016; JUNG *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2011; NWACHUKWU *et al.*, 2012; SARMA *et al.*, 2013a). A conversão biológica do glicerol a variados produtos pode ser vista, de maneira simplificada, na figura 4.

Figura 4. Esquema simplificado da fermentação do glicerol em compostos de interesse comercial e vias de produção de hidrogênio por anaeróbios facultativos (via PFL) e anaeróbios estritos (via PFOR). DHA, dihidroxiacetona; DHAP, dihidroxiacetona-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato. Setas pontilhadas indicam a existência de várias reações. Adaptado de Silva e colaboradores (2009), Clomburg e Gonzalez (2013) e Goyal e colaboradores (2013).



As vias de bioconversão de açúcares ou glicerol a hidrogênio apresentam módulos em comum para todas as bactérias, no entanto, algumas diferenças importantes podem ser notadas entre bactérias anaeróbias estritas e anaeróbias facultativas ou mesmo entre membros desses grupos e serão ressaltadas no texto quando necessário (Figura 4) (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013; GOYAL et al., 2013).

Após sua internalização, o glicerol pode ser direcionado a três vias principais: produção de massa celular; redução a 1,3-propanodiol pela enzima glicerol desidratase (codificada pelo gene *dhaB*); ou oxidação a dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase (*dhaD*). Como durante a produção de massa celular existe a liberação de

equivalentes redutores, a via de produção de 1,3-propanodiol serve como um sistema de manutenção do estado redox intracelular, consumindo o excesso desses equivalentes na redução do glicerol (TRINH e SRIENC, 2009). Micro-organismos com a capacidade de fermentar glicerol e que não possuem essa via direcionam o excesso de elétrons para a produção de 1,2-propanodiol, a partir da redução de dihidroxiacetona-fosfato (METSOVITI *et al.*, 2012). A produção de 1,3-PDO é de grande interesse da indústria, visto o seu uso na produção de diferentes poliésteres e fibras têxteis especiais baseadas em um de seus derivados, o polítrimetileno tereftalato (PTT), o qual vêm apresentando crescimento contínuo de mercado nos últimos anos (HUANG *et al.*, 2017; WISCHRAL *et al.*, 2016).

A via oxidativa, terceira via de metabolização do glicerol, é empregada pelos micro-organismos para a geração de energia e produção de compostos para o suprimento das demais rotas metabólicas microbianas. Do ponto de vista da produção de ácidos orgânicos, monômeros, hidrogênio e outros combustíveis (como etanol), a via oxidativa é a que apresenta o maior número de estudos e tentativas de manipulação, visto o grande número de etapas (e, conseqüentemente, de genes e enzimas) envolvidas nos processos de transformação. Além disso, tal processo apresenta grande similaridade com as vias de oxidação de açúcares, sendo, portanto, alvo de vários estudos (ALMEIDA *et al.*, 2012; CLOMBURG e GONZALEZ, 2013; WESTBROOK *et al.*, 2018).

Visto a complexidade da via oxidativa e sua relação com demais vias metabólicas, o rendimento teórico da produção de H₂ a partir do glicerol pode variar em dependência dos micro-organismos empregados, das condições do processo e dos co-produtos gerados durante a fermentação. Por exemplo, quando o acetato é o subproduto majoritário da fermentação pela bactéria termofílica *Thermotoga maritima* podem ser gerados teóricos 4 mol de H₂ (e 1 mol de ácido acético) por mol de glicerol, ao passo que a co-produção exclusiva de etanol por *E. coli* ou *Enterobacter* sp. resulta na liberação teórica máxima de 1 mol de H₂ (junto a 1 mol de etanol) por mol de glicerol consumido (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013; DOUNAVIS *et al.*, 2015; MARU *et al.*, 2013). É importante ressaltar que tais valores são baseados no balanço estequiométrico entre produtos e reagentes da conversão de modo que, para sistemas biológicos, esse valor serve como base para comparações, mas pode variar em decorrência do consumo de outras fontes de carbono e da atividade das demais vias metabólicas dos micro-organismos.

A oxidação do glicerol se inicia após sua internalização através de uma proteína facilitadora de difusão (codificada pelo gene *glpF*) e pela ação da enzima glicerol

desidrogenase (DhaD) sendo convertido em dihidroxiacetona (DHA). Em seguida a DHA é fosforilada e convertida em um intermediário da glicólise, a dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) a qual alimenta a via glicolítica. Nessa etapa ocorre a principal diferença entre o metabolismo do glicerol e de outras fontes de carbono, pois a enzima dihidroxiacetona quinase (DhaK, codificada pelos genes *dhaKLM*) usa o fosfoenolpiruvato (PEP) como doador do grupo fosfato para a fosforilação da DHA. Desse modo, uma característica única da metabolização do glicerol por *E.coli* é que a conversão de PEP a piruvato é acoplada à fosforilação de DHA e realizada por uma única enzima, a DhaK. Para outras fontes de carbono o piruvato é obtido a partir do fosfoenolpiruvato pela ação da enzima piruvato quinase. A obtenção de piruvato é de grande importância para a geração de etanol e H₂, visto que serve de composto chave para a produção desse gás tanto por bactérias anaeróbias estritas quanto por anaeróbias facultativas (ABO-HASHESH e HALLENBECK, 2012; CINTOLESI *et al.*, 2012).

Em organismos anaeróbios facultativos sob condições favoráveis, o piruvato é convertido a acetil-CoA e formiato, o qual é transformado em CO₂ e H₂. Para anaeróbios estritos, durante a conversão de piruvato a acetil-CoA, ocorre a redução simultânea da ferredoxina, a qual é empregada na redução de uma hidrogenase para a produção de hidrogênio (DAS e VEZIROGLU, 2008). As vias de produção de hidrogênio a partir do piruvato em cada grupo bacteriano recebem o nome da primeira enzima responsável pelo processo, desse modo, em anaeróbios facultativos a via é denominada PFL (piruvato-formiato liase), enquanto que para anaeróbios estritos a principal via é a PFOR (piruvato-ferredoxina oxido-redutase).

Neste ponto do metabolismo, para anaeróbios facultativos, o uso de glicerol como substrato também favorece a produção de H₂ comparado a outras fontes de carbono, pois o piruvato também poderia ser convertido a acetil-CoA e CO₂ pela enzima piruvato-desidrogenase. Apesar dessa enzima ser ativa principalmente em condições aeróbias, ainda apresenta alguma atividade na ausência de oxigênio. No entanto, sua atividade é reprimida por altas razões NADH/NAD⁺, como ocorre durante a fermentação do glicerol (DURNIN *et al.*, 2009), como exposto no item 1.3. Em determinados tipos de enterobactérias, a molécula de acetil-CoA oriunda dessa etapa pode ser convertida em etanol por meio da ação da enzima acetaldeído/álcool-desidrogenase, fato que, do ponto de vista de obtenção de energia é uma grande vantagem, devido aos benefícios ambientais em relação aos combustíveis fósseis apresentados por esse biocombustível.

Além das vias convencionais citadas acima, existe também a possibilidade de produção de H₂ por meio de enzimas capazes de aproveitar os prótons e elétrons adicionados às moléculas de NAD⁺ durante o catabolismo de substratos orgânicos, as chamadas NADH:ferredoxina oxido-redutases (NFOR) para anaeróbios estritos e uma suposta hidrogenase membranar estudada em *Enterobacter aerogenes* (HALLENBECK *et al.*, 2012; NAKASHIMADA *et al.*, 2002).

No entanto, a operação das NFOR no sentido da redução da molécula de ferredoxina é extremamente desfavorável termodinamicamente e ocorre apenas em condições de pressões parciais de hidrogênio muito baixas (KHANAL, 2008). Desta forma pode-se considerar que a diminuição da pressão parcial de hidrogênio do meio favoreceria a ação das NFOR e portanto poderia levar a uma maior produção de hidrogênio pelas bactérias anaeróbias estritas (ABO-HASHESH e HALLENBECK, 2012). Entretanto, níveis de baixa pressão parcial de hidrogênio (abaixo de 10⁻³ atm) são reportados apenas para ambientes em que encontram-se comunidades compostas por bactérias fermentativas e por micro-organismos consumidores de hidrogênio, tais como comunidades anaeróbias mistas contendo metanogênicos hidrogenotróficos. Porém o consumo do H₂ liberado por bactérias fermentativas resulta na produção quase nula do gás. Outra alternativa para direcionar o funcionamento das enzimas NFOR para a redução da ferredoxina seria a remoção do H₂ dissolvido por meio do *stripping* de gases do meio, entretanto, os fluxos necessários são considerados impraticáveis e a mistura com outros gases dificultaria o processo de purificação do hidrogênio (HALLENBECK, 2005).

Quanto à provável hidrogenase NADH-dependente citada para *Enterobacter aerogenes*, existem estudos realizados com glicose como substrato que levantam suposições sobre sua ocorrência baseadas (i) em suposições termodinâmicas que explicariam sua existência; (ii) na diferença encontrada por alguns autores entre a produção molar de hidrogênio e a soma da produção molar de acetato e etanol ou outros produtos oriundos da conversão da molécula de acetil-CoA; (iii) na evolução de H₂ a partir de NADH mediada apenas pela fração membranar de células de *E. aerogenes* e (iv) no rendimento encontrado estar acima do teórico máximo para a conversão da fonte de carbono (KUMAR; GHOSH; DAS, 2001; NAKASHIMADA *et al.*, 2002; TANISHO *et al.*, 1989; ZHAO *et al.*, 2009).

Porém, essa diferença quantitativa poderia estar relacionada (i) ao consumo de acetato decorrente de alterações no metabolismo bacteriano ocasionadas pela diminuição da disponibilidade de fontes de carbono e redução do pH no decorrer da fermentação; (ii)

diferenças na quantidade excretada (ou re-internalizada) dos produtos da metabolização de acetil-CoA; (iii) pelo consumo de outros fatores nutricionais presentes encontrados no meio de cultura para a produção de formiato; (iv) pela conversão de acetil-CoA a componentes da biomassa e (v) pela interconversão de formiato a acetato (CHONG *et al.*, 2009; COZZONE, 1998; GONG *et al.*, 2016; LEONHARTSBERGER *et al.*, 2002; NGUYEN *et al.*, 2008; SAWERS, 2005; WOLFE, 2005; ZELCBUCH *et al.*, 2016).

Somado a isso, apesar da crescente atenção destinada a essa via, não existe a confirmação experimental da existência de nenhuma enzima que participe diretamente da conversão de NADH a H₂, além do que essas também estariam sujeita às limitações termodinâmicas ressaltadas anteriormente para as NFOR (LIU *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2011). Tais discrepâncias demonstram que, a despeito do conhecimento parcial sobre a produção biológica de H₂, ainda existem muitas informações sobre o metabolismo microbiano a serem obtidas e confirmadas para que esse processo possa ser aplicado com sucesso em escala real.

A exemplo do que ocorre para outros substratos, apesar do enorme potencial biotecnológico da fermentação do glicerol residual a hidrogênio, algumas questões ainda inviabilizam a aplicação em grande escala desse processo. Entre as principais questões a serem resolvidas estão a sensibilidade dos micro-organismos aos outros componentes do glicerol bruto e a produção de H₂ apenas em concentrações muito baixas de glicerol, fatores que tornam o processo mais oneroso devido principalmente à necessidade de diluição do glicerol residual (CHATZIFRAGKOU e PAPANIKOLAOU, 2012; ŁUKAJTIS *et al.*, 2018; SARMA *et al.*, 2013a,c).

Desta forma, a fim de garantir a aplicabilidade do processo, torna-se imprescindível tanto a busca por linhagens bacterianas que produzam hidrogênio com uma menor diluição do glicerol quanto a compreensão dos efeitos de altas concentrações desse substrato sobre o metabolismo microbiano, uma vez que essas inibem não só a produção de H₂, mas o desempenho das culturas de forma geral.

1.6. Alternativas para melhoria da bioconversão do glicerol

Atualmente, as abordagens de otimização da bioconversão de substratos orgânicos a hidrogênio podem ser divididas em três vertentes principais: busca por novas linhagens, adequação das condições de fermentação e modificação das vias metabólicas microbianas. Tais abordagens serão discutidas nos itens a seguir.

1.6.1. Engenharia metabólica e análise do fluxo metabólico

A produção final de hidrogênio e outros compostos é considerada baixa por muitos autores quando comparada ao potencial teórico de conversão de substratos orgânicos a esses produtos. Dessa forma, muitos trabalhos ressaltam a necessidade de abordagens que possibilitem a transposição de barreiras adaptativas e termodinâmicas para aumentar o rendimento da bioconversão de resíduos, entre eles o glicerol, a H₂ e outros produtos (DELLOMONACO *et al.*, 2010; GHOSH *et al.*, 2013; HALLENBECK e GHOSH, 2012a; POLADYAN *et al.*, 2018; SABOURIN-PROVOST e HALLENBECK, 2009; VALLE *et al.*, 2017; YOSHIDA *et al.*, 2006; WESTBROOK *et al.*, 2018).

Baseados na potencialidade de aperfeiçoamento do consumo de substrato, produtividade e rendimento de compostos alvo, uma grande parcela dos pesquisadores julga a engenharia metabólica a alternativa mais promissora para alcançar a produção em larga escala de biocombustíveis e outros produtos de origem biológica. Essa linha de pensamento é baseada na pressuposta possibilidade de alteração das vias metabólicas de conversão de substratos a produtos de interesse comercial (CHA *et al.*, 2013; DHARMADI *et al.*, 2006; HALLENBECK *et al.*, 2012; MAJIDIAN *et al.*, 2018).

No âmbito dos trabalhos sobre engenharia genética, seja para a compreensão do metabolismo ou visando melhorias na obtenção de bioprodutos, grande atenção é dada a bactéria *Escherichia coli* devido ao amplo conhecimento acerca de sua fisiologia, seu rápido crescimento e a facilidade relativa de manipulação de seu material genético (PONTRELLI *et al.*, 2018). Além disso, até o início da atual década, estudos de engenharia metabólica visando a produção de hidrogênio, por exemplo, avaliavam preferencialmente processos de conversão de substratos comerciais, principalmente a glicose (GOYAL *et al.*, 2013). Outros açúcares para os quais linhagens mutantes de *E. coli* foram usadas para a produção de hidrogênio são arabinose, xilose, frutose, sacarose, maltose e lactose (GHOSH e HALLENBECK, 2009).

No que diz respeito ao glicerol, logo após surgirem os primeiros indicativos de expansão da indústria de biodiesel, houve um crescimento no número de trabalhos empregando técnicas com o foco de otimizar a bioconversão de glicerol (puro ou residual) para a obtenção de produtos como 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, succinato, lactato, etanol e hidrogênio (LI *et al.*, 2013; YAZDANI e GONZALEZ, 2010; ZHANG *et al.*, 2011).

Entre os trabalhos que fazem uso de engenharia genética para a conversão de glicerol a H₂ cita-se o de Hu e Wood (2010). Tais autores empregaram técnicas de

adaptação evolutiva e mutagênese química induzida por nitrosoguanidina para obter uma linhagem de *E. coli* (HW2) com uma taxa de crescimento específico em glicerol puro 5 vezes maior que a cepa parental. Além disso, a produtividade volumétrica e a produção de hidrogênio na linhagem HW2 foram aumentadas em 20 e 14 vezes, respectivamente. A análise do transcrito total (feito por microarranjos de DNA) e a confirmação dos resultados por qRT-PCR comparando a expressão de genes específicos nas duas cepas mostraram que a melhoria do desempenho da linhagem está relacionada às alterações na expressão de vários genes. Segundo os autores, o aumento da expressão do gene *eno* (que codifica para a enzima enolase) pode ter contribuído para a maior geração de dihidroxiacetona-fosfato e formiato; enquanto que a repressão dos genes *focA* e *gatYZ* e *fbp* pode ter aumentado a quantidade intracelular de formiato e diminuído o consumo de gliceraldeído-3-fosfato pela gliconeogênese, respectivamente.

Além de técnicas de mutação aleatória, alguns trabalhos demonstram a possibilidade de direcionar as modificações genéticas por meio da análise da cinética das reações e da quantidade de metabólitos gerados durante a fermentação do glicerol. Cintolesi e colaboradores (2012), empregando análises de controle metabólico (ACM) para a fermentação de glicerol pela bactéria *E. coli*, identificaram as vias (e conseqüentemente as enzimas e genes) a serem regulados para aumentar a produtividade de etanol a partir de glicerol. Visto que a técnica de ACM permite inferir como a concentração de um determinado metabólito pode influenciar tanto em passos individuais da via quanto nas demais etapas da reação em estudo, ao invés de alterações múltiplas, foram definidas apenas duas enzimas (GlyDH e DhaK, codificadas pelos genes *gldA* e *dhaKLM*, respectivamente) como responsáveis por controlar o consumo de glicerol e sua conversão a etanol. A superprodução dessas e das demais enzimas pertencentes a essa via comprovou os resultados previstos no modelo, de modo que a degradação de glicerol e a concentração final de etanol foram aumentadas apenas quando houve superexpressão dos genes que codificam para GlyDH e DhaK. Como discutido em trabalho posterior do grupo, a manipulação da via propiciou não apenas maior produção de etanol, mas também o aumento da produção de H₂ a partir de glicerol, considerando a produção equimolar de etanol e formiato (e sua completa conversão a hidrogênio) durante a fermentação (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013).

O estudo das vias de conversão do glicerol também pode ser útil para a escolha de genes a serem deletados visando o direcionamento do metabolismo microbiano para a produção de etanol e H₂. O emprego dessa metodologia visa reduzir o fluxo de carbono e

elétrons que é direcionado para vias que competem com a produção desses dois compostos. Yazdani e Gonzalez (2008) mostraram que a deleção dos genes que codificam para as enzimas fumarato redutase (*frdA*) e fosfotransacetilase (*pta*), responsáveis pela produção de succinato e acetato, respectivamente, deu origem a uma linhagem de *E. coli* (denominada SY03) capaz de produzir 1 mol de etanol e 1 mol de H₂ (considerando a conversão total do formiato a hidrogênio) para cada mol de glicerol consumido. Segundo os autores, os resultados são comparáveis aos obtidos para linhagens modificadas para a conversão de açúcares aos mesmos produtos.

Em dois trabalhos mais recentes, Tran e colaboradores (2014 e 2015) empregaram técnicas de mutação aleatória ou direcionada em *E. coli*, na tentativa de identificar deleções que beneficiassem a produção de H₂ a partir de glicerol. Com as mutações randômicas (TRAN *et al.*, 2015), feitas por meio do uso de do transposon Tn5, foram obtidos quatro mutantes que apresentaram aumento (variando de 1,1 a 1,6) no rendimento de hidrogênio por quantidade de glicerol consumido. Interessantemente, dois dos genes que sofreram mutação (*ycgR* e *ycgI*) não apresentam relação direta com a via metabólica de dissimilação do glicerol, sendo um deles envolvido na estrutura flagelar e o outro com função desconhecida. Além disso, os autores verificaram um aumento na produção de formiato (e H₂) e uma diminuição na produção de etanol, contraditoriamente ao que é mostrado em outros trabalhos (YAZDANI e GONZALEZ, 2008), mostrando que talvez o favorecimento da produção de etanol pode não ser diretamente correlacionado a uma maior produção de hidrogênio.

No trabalho com mutações direcionadas (TRAN *et al.*, 2014), realizadas com uso do sistema de transdução P1, foram realizadas deleções de genes diretamente relacionados ao consumo e conversão do glicerol a variados metabólitos, além da combinação entre tais mutações. Os autores mostram que, como esperado, deleções que ajudam na evolução de hidrogênio a partir de glicose podem não apresentar os mesmos efeitos para a fermentação do glicerol e que deleções que são benéficas isoladamente podem apresentar efeitos nulos (ou mesmo negativos) quando usadas em conjunto. Como principal resultado, foi obtido um mutante sêtu plo que apresentou um aumento de 5 vezes na produtividade e no rendimento da produção de hidrogênio, sendo que deleções posteriores nesse mutante interferiram de maneira negativa no metabolismo celular (supostamente no balanço redox) de modo a prejudicar a produção de H₂.

No entanto, o aumento na produtividade e no rendimento de H₂ apresentados no trabalho de Tran e colaboradores (2014) foram compensados negativamente com uma

queda acentuada no crescimento celular e no consumo de glicerol pelo mutante sétuplo acarretando em uma produção máxima de hidrogênio próxima ao da espécie selvagem e na presença de maiores concentrações de glicerol residual após a fermentação, fatos que ainda inviabilizam a aplicação do processo fora dos limites de um laboratório.

Como abordado por Wu e colaboradores (2015), a manipulação excessiva de vias metabólicas pode causar um desequilíbrio entre o metabolismo energético e de carbono, de modo que apenas micro-organismos que apresentam produções naturalmente muito baixas possam ter suas vias manipuladas com sucesso e ostentar resultados expressivos. Como exemplo prático dessa afirmação, podem ser comparados os dados obtidos nos trabalhos de Tran e colaboradores (2014) e Ito e colaboradores (2005), apresentados anteriormente. O que pode ser visto é que, apesar do aumento no rendimento da produção de H₂ alcançado após a deleção de sete genes de vias competitivas, a linhagem de *E. coli* modificada apresentou uma produção máxima de H₂ (e etanol) levemente superior à alcançada por uma cepa selvagem de *E. aerogenes*, porém em um tempo de ensaio 8 vezes maior e sem consumir completamente o glicerol (o qual, quando comparados ensaios na mesma concentração, não foi mais detectado no mosto de *E. aerogenes* HU-101 após 6 horas de fermentação).

Ainda segundo Wu e colaboradores (2015), a despeito das evoluções biotecnológicas alcançadas com o uso de modificações genéticas, a vertente dos biocombustíveis ainda apresenta apenas o etanol, um metabólito obtido por vias naturais, como único produto economicamente viável e em uso em larga escala na atualidade. Para contornar tal situação, os autores sugerem a busca por linhagens diferentes das empregadas como *workhorses* em processos fermentativos, visto a possibilidade da existência de novas vias metabólicas, e também análises mais aprofundadas do metabolismo microbiano (como análises do fluxo metabólico – AFM – e do balanço de fluxo – ABF) previamente a modificações genéticas.

A análise do fluxo metabólico (AFM) consiste, basicamente, no levantamento (em bancos de dados) das vias metabólicas para o micro-organismo selecionado e determinação, com auxílio de dados experimentais e modelos matemáticos, daquelas que apresentam maior atividade nas condições testadas (TOYA *et al.*, 2011). A aplicação dessa análise previamente às etapas de manipulação genética pode ser de grande valia para a otimização dos processos biológicos de produção de H₂, tanto para determinar modificações genéticas quanto para adequar as condições ambientais do processo. A despeito de sua funcionalidade já demonstrada para outros sistemas (CAI *et al.*, 2010,

2011), a busca na literatura não revelou trabalhos que apliquem essa técnica para aumentar a conversão de glicerol a hidrogênio.

Mesmo para produtos com fins diferentes dos biocombustíveis, o conhecimento que se tem hoje sobre o metabolismo microbiano não permite alcançar resultados aplicáveis industrialmente por meio da manipulação genética, como ressaltado por Sun e colaboradores (2018) para a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol.

Pelo exposto, os trabalhos citados mostram que, apesar da conversão de glicerol a diferentes produtos obtida em alguns trabalhos estar próxima, ou mesmo idêntica, ao rendimento teórico, muitos estudos sobre o metabolismo microbiano ainda são necessários para resolver questões tais como a capacidade de crescimento, consumo total e taxa de consumo do substrato, principalmente em concentrações elevadas de glicerol; o aumento da produção, rendimento e taxas de conversão; resistência à toxicidade dos contaminantes presentes no glicerol bruto; e a compreensão e direcionamento de vias metabólicas para a conversão do glicerol a H_2 e demais produtos sem prejudicar o crescimento celular e o consumo do substrato.

Portanto, considerando o que foi exposto para o campo da engenharia metabólica, estudos acerca da influência das condições ambientais sobre o metabolismo de linhagens com a capacidade de conversão do glicerol ainda são de extrema importância para o desenvolvimento de sistemas úteis para a bioconversão desse resíduo em um futuro próximo.

1.6.2. Escolha do tipo de cultura microbiana e otimização das condições de fermentação

Esta abordagem busca a seleção de culturas microbianas puras ou mistas capazes de fermentar o substrato de interesse. O uso combinado de várias culturas microbianas, as chamadas comunidades mistas, apresenta a possibilidade de união de diferentes capacidades hidrolíticas, além de outros fatores importantes como a capacidade de depleção de oxigênio, formação de grânulos e quebra de substratos complexos. Entretanto, a presença de vários micro-organismos pode trazer instabilidade ao processo de produção de hidrogênio, devido à ocorrência de competição pelo substrato, consumo de hidrogênio (principalmente por bactérias homoacetogênicas) e mudança do metabolismo de alguns membros frente à condição ambiental instável (GUWY *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-MERINO *et al.*, 2013).

Considerando que o resíduo do biodiesel é constituído principalmente pelo glicerol (um substrato de baixa complexidade), a presença de bactérias com diferentes capacidades hidrolíticas não se mostra vantajosa para a produção de hidrogênio e, desse modo, o emprego de micro-organismos isolados para a bioconversão de glicerol a H_2 torna-se mais adequado. O uso de culturas puras facilita o controle do processo e o direcionamento do metabolismo para a produção do composto desejado.

Culturas bacterianas puras para a conversão do glicerol podem ser obtidas de fontes comerciais ou podem ser isoladas de comunidades naturais ou comunidades já adaptadas ao substrato, tal como em reatores aplicados ao tratamento de resíduos da produção de biodiesel. O isolamento segue adotando-se meios de cultura específicos acrescidos de glicerol como fonte de carbono. Como demonstrado por Ito e colaboradores (2005), a linhagem HU-101 de *Enterobacter aerogenes*, isolada de lodo metanogênico, foi capaz de produzir aproximadamente 1 mol de H_2 e 1 mol de etanol por mol de glicerol bruto consumido, além de outros compostos como lactato, acetato, formiato e 1,3-propanodiol em menores quantidades.

Reungsang e colaboradores (2013) mostraram a capacidade da cepa KKU-S1 de *E. aerogenes*, obtida de lodo empregado para o tratamento de resíduos com alta quantidade de açúcares, em produzir 0,12 mol de H_2 e 0,83 mol de etanol por mol de glicerol puro, obtendo uma conversão de 70% da energia contida no substrato na formação de tais produtos. Vale ressaltar que, apesar dos altos rendimentos, em ambos os casos citados, e nos demais trabalhos encontrados na literatura, a produção de hidrogênio ocorreu apenas com a complementação do meio com outros nutrientes (na maioria das vezes com suplementos complexos como extrato de levedura, carne ou malte, ou peptona, os quais também podem servir como fonte de carbono). Além disso, também se mostram necessárias medidas de adequação de outros parâmetros do processo, como pH, temperatura, concentração dos suplementos e uso de sais (CHONG *et al.*, 2009; DUTTA *et al.*, 2009; KHANNA *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2010; TRCHOUNIAN *et al.*, 2016)

Nesse âmbito é que atuam as abordagens pertencentes à linha de otimização das condições de fermentação. Em ambos os trabalhos citados acima, o consumo de glicerol e a produção de hidrogênio foram dependentes da adição de extrato de levedura ou solução de vitaminas (ITO *et al.*, 2005; REUNGSANG *et al.*, 2013). Segundo Fountoulakis e Manios (2009) e Sarma e colaboradores (2013a, b), esse fato levanta a possibilidade de co-fermentação do glicerol com outros resíduos para aumentar a

produção de compostos de interesse. O uso de outros resíduos para a suplementação do meio com elementos traço e fontes de nitrogênio é uma alternativa para alcançar alta produção de hidrogênio e diminuir o custo com o meio de fermentação (SARMA *et al.*, 2013a). Nesta linha, vários trabalhos mostram melhorias na geração de diferentes produtos ao empregar a co-digestão de glicerol com resíduos como lodo, restos de alimentos, esterco, vinhaça, biomassa de algas, entre outros (BUŁKOWSKA *et al.*, 2018; MENESES-REYES *et al.*, 2018; SILVA, F. M. S. *et al.*, 2018).

Além da composição do meio, alguns trabalhos mostram que alterações nas configurações do reator podem ser úteis para a conversão microbiana do glicerol. Han e colaboradores (2012) mostraram a aplicabilidade do aumento da concentração celular por meio da imobilização de células de *E. aerogenes* em pérolas de diferentes polímeros (ágar, alginato, sílica, entre outros). O maior número de células propiciou, até certo ponto, o aumento da produção de H₂. Outros trabalhos demonstraram que parâmetros como a quantidade de inóculo, a concentração inicial de glicerol, o *headspace* dos reatores, a presença de oxigênio e, concentração de sais e taxa da carga orgânica podem influenciar no processo (CHAUDHARY *et al.*, 2011; JITRWUNG e YARGEAU, 2011; MARKOV, 2012; SITTIJUNDA e REUNGSANG, 2017).

Com o intuito de auxiliar na determinação de melhores condições para a produção dos bioprodutos de interesse, são reportados na literatura diferentes ferramentas estatísticas. O uso de delineamentos experimentais baseados nas matrizes do Composto Central ou de Doehlert combinados com análises de superfícies de resposta é uma estratégia já consolidada em estudos de otimização da conversão de substratos a produtos de interesse (BERIKTEN e KIVANC, 2014; IMANDI *et al.*, 2007). Outra ferramenta que apresenta a possibilidade de ser usada para direcionar a melhoria de processos é a função de desejabilidade, a qual, apesar de sua relativa simplicidade para a predição e otimização de respostas múltiplas ainda é empregada apenas para processos termoquímicos (LEE *et al.*, 2018), não sendo encontrados trabalhos aplicando essa função diretamente em processos biológicos, o que abre a possibilidade de seu uso como uma nova alternativa para tais sistemas.

Levando em consideração os conhecimentos apresentados, esse trabalho tem como objetivo principal o entendimento das vias de bioconversão do glicerol a H₂, etanol e 1,3-PDO em cepas bacterianas isoladas de sistemas de tratamento de glicerol bruto. Para isso, vários dos fatores ambientais tidos como influentes sobre o metabolismo microbiano foram avaliados e a otimizados.

CAPÍTULO 2

2.1. Justificativa

A evolução e o desenvolvimento da sociedade humana estão estritamente ligados com o uso de fontes de energia. Até recentemente, a disponibilidade natural, a relativa facilidade de obtenção e a ideia de inesgotabilidade de combustíveis fósseis regeram o consumo de recursos naturais para a obtenção de energia. Tal quadro implica em diversos problemas ambientais de nosso tempo, como poluição, degradação de ambientes naturais e aquecimento global, além da constante ameaça de escassez de tais fontes que, junto a oscilações de mercado, causa também cenários de instabilidade e problemas socioeconômicos.

Felizmente, em resposta a oscilações do preço de combustíveis fósseis, nas últimas décadas vêm crescendo a busca por fontes alternativas de energia, as quais possam ser manipuladas durante todo seu ciclo de vida, como é o caso dos biocombustíveis (principalmente bioetanol e biodiesel). No entanto, apesar de superiores no que diz respeito à sustentabilidade e à reutilização de dióxido de carbono, o balanço de massa do processo de produção dos biocombustíveis está longe de ser fechado, visto a quantidade de resíduos gerados nas etapas de transformação da biomassa. Como exemplo, a despeito do incentivo à sua produção, o biodiesel traz como subproduto enormes quantidades de glicerol, sub-produto para o qual são necessárias ações de destinação apropriadas.

Desse modo, visando alcançar o conhecimento necessário para a instauração de biorrefinarias de biodiesel, são buscados diferentes métodos que propiciem a recolocação do glicerol na cadeia energética e/ou econômica da produção de biodiesel, convertendo-o a produtos com maior potencial de mercado. Entre esses métodos, aqueles que aplicam micro-organismos têm recebido grande atenção, devido principalmente à maior compatibilidade ambiental desses processos em relação à processos termoquímicos e à capacidade de obtenção de produtos energéticos, como hidrogênio e etanol, dois biocombustíveis considerados como extremamente promissores.

Nesse âmbito, nos últimos anos, muitos trabalhos mostraram a evolução do conhecimento e aperfeiçoamentos desse processo, empregando diferentes culturas, otimização das condições, variações na configuração do sistema e engenharia metabólica. No entanto, apesar das melhorias alcançadas, a aplicabilidade da transformação biológica de glicerol ainda esbarra em complicações inerentes a sistemas reais, principalmente no

que diz respeito às altas concentrações de substrato e à presença de impurezas que ainda inviabilizam a aplicação prática do processo.

Desse modo, esse trabalho visou estudar as diferenças no metabolismo de isolados bacterianos produtores de H₂ e etanol quando em contato com diferentes concentrações iniciais de glicerol e diferentes parâmetros operacionais, com o intuito de conhecer os fatores metabólicos que podem limitar o desempenho microbiano em altas concentrações desse substrato e, assim, obter informações para posteriores otimizações do processo.

2.2. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a fermentação de glicerol a hidrogênio e etanol por *Enterobacter* sp.

Objetivos específicos

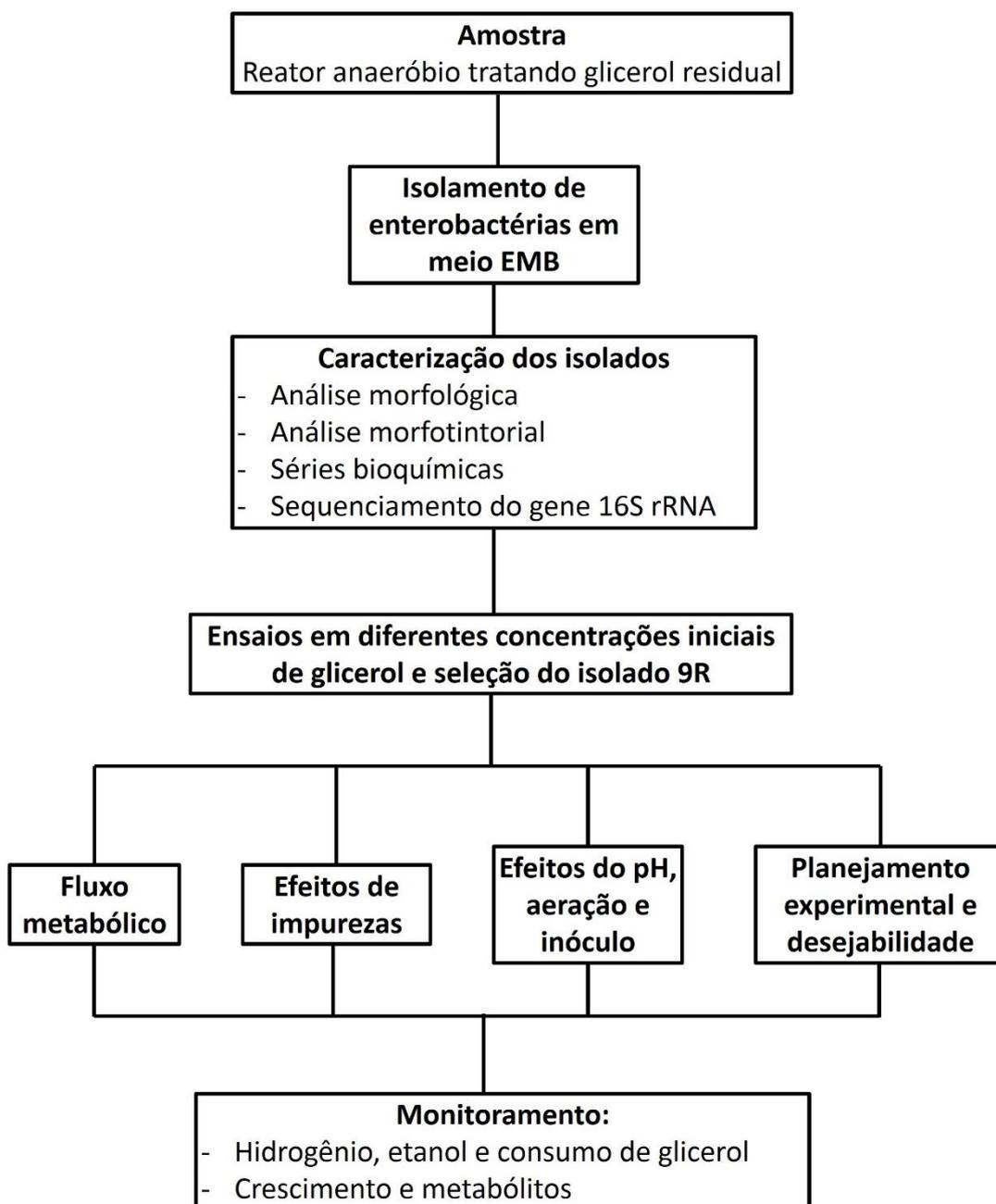
1. Isolar, caracterizar e selecionar enterobactérias capazes de consumir glicerol.
2. Avaliar a influência da concentração do substrato sobre o desempenho dos isolados na fermentação do glicerol a H₂ e etanol.
3. Analisar a influência de parâmetros da fermentação, como pH, aerobiose, impurezas e quantidade de inóculo, sobre a capacidade de consumo e conversão do glicerol a H₂ e etanol pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R.
4. Buscar os melhores valores para os parâmetros pH, concentração de inóculo e concentração de substrato visando a produção de hidrogênio e etanol e o consumo de glicerol.

CAPÍTULO 3

3. Metodologia

As metodologias descritas abaixo foram realizadas no Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos (LBTM) e no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental (LQTA) da Universidade Federal de Ouro Preto. A figura 5 mostra a sequência de experimentos realizados.

Figura 5. Fluxograma dos experimentos realizados nesse trabalho.



3.1. Isolamento das bactérias

O isolamento dos micro-organismos foi feito a partir do lodo de um reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) em escala de bancada empregado para o tratamento do resíduo de produção de biodiesel (ALBUQUERQUE, 2014). Para isso, 10g de lodo foram diluídos em 90 mL de tampão fosfato salino estéril pH 7,8 (KH_2PO_4 2mM, Na_2PO_4 6 mM e NaCl 10mM) e homogeneizados com o auxílio de agitador de tubos por 2 minutos. Um volume de 100 μL da suspensão de micro-organismos foi plaqueado no meio de cultura EMB (meio eosina azul de metileno), específico para membros da família *Enterobacteriaceae*. As placas foram incubadas a 25°C em estufa bacteriológica sob condições aeróbias (NUNES, 2014).

3.2. Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados

Os isolados foram caracterizados quanto à cor e formato das colônias e também empregando a coloração de Gram e posterior visualização em microscópio óptico.

Para a caracterização bioquímica, foram realizados os testes de: produção de H_2S , motilidade, produção de indol, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), citrato, lisina, hidrólise de uréia, consumo de glicose e lactose, produção de gás e ágar triplo açúcar e ferro (TSI) (Breed et al., 1957).

3.3. Sequenciamento do gene rRNA 16S

Previamente ao sequenciamento, o DNA genômico dos isolados foi extraído seguindo o protocolo descrito por Cheng e Jiang (2006). Para isso, 1 mL de células crescidas *overnight* em meio mínimo acrescido de glicerol foi coletado e centrifugado a 8.000 g por 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 400 μL de tampão STE (100 mM NaCl , 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) e novamente centrifugadas a 8.000 g por 2 minutos. O pellet foi ressuspenso em 200 μL de tampão TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) e à suspensão foram adicionados 100 μL de fenol saturado em Tris 10 mM. A mistura foi agitada por 60 segundos e centrifugada a 12.470 g por 5 minutos a 4 °C. 160 μL da fase aquosa foram transferidos para um novo tubo, ao qual foram adicionados 40 μL de tampão TE e 100 μL de clorofórmio. O tubo foi centrifugado a 12.470 g por 5 minutos a 4°C e a etapa de transferência, adição de clorofórmio e TE e centrifugação foi repetida até a eliminação da interface branca entre a fase aquosa e a fase orgânica.

Para a amplificação do fragmento RNAr 16S foram empregados os iniciadores *Epsilon* 10 (5'-GAGASTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1541R (5'-AAGGAGGTGATC CAGCC-3') para o domínio *Bacteria*. A mistura de PCR foi constituída de: 2,5 µL de Tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (2,0 mM), 1,25 µL de cada iniciador (0,5 pmol/µl), 0,5 µL da mistura de dNTP (0,2 mM), 0,125 µL de Taq polimerase (1,25 u/µl; Fermentas), 2,0 µl de DNA molde e água para um volume final de 25 µl. Os tubos foram submetidos às seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; 25 ciclos compostos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C; e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. A amplificação do gene de interesse foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Para o sequenciamento, os amplicons foram extraídos do gel de acordo com o protocolo descrito por Aitken e colaboradores (1998). As bandas foram excisadas do gel, transferidas para microtubos e mantidas em banho-maria a 65 °C até o derretimento das mesmas. O mesmo volume de fenol foi adicionado aos tubos e, após agitação manual, os mesmos foram centrifugados a 12.470 g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos aos quais foi adicionado o mesmo volume de uma mistura (1:1) de fenol/clorofórmio. Após agitação, os microtubos foram novamente centrifugados a 12.470 g por 10 minutos e a fase aquosa transferida para novos microtubos. À fase aquosa, foi adicionado 1/10 (em volume) de acetato de sódio 3M pH5,5 e o dobro de volume de etanol 100%.

Após agitação, os microtubos foram centrifugados a 12.470 g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. 500 µL de etanol 70% foram adicionados aos microtubos, seguido de nova centrifugação e descarte do sobrenadante. Após evaporação do etanol à temperatura ambiente, o *pellet* foi ressuspensão em 20 µL de água destilada. Os fragmentos de DNA purificados foram enviados para sequenciamento pela empresa Genomic Engenharia Molecular Ltda., e os resultados analisados pelo programa *Ribosomal Database Program* (RDP, Release 8.1; MAIDAK *et al.*, 1996) conforme Wang e colaboradores (2007).

3.4. Ensaios de crescimento bacteriano, consumo de glicerol e produção de H₂ e outros metabólitos em reatores em batelada sob diferentes condições

Diferentes ensaios foram realizados a fim de caracterizar o comportamento dos isolados durante o consumo anaeróbio de glicerol e de otimizar a bioconversão desse substrato pelo isolado *Enterobacter* sp 9R. Previamente à realização dos ensaios, os

isolados foram conservados a 4°C em placas de Petri contendo ágar nutriente e, exceto quando descrito no texto, glicerol. Durante o processo fermentativo foram coletadas amostras da fase gasosa para verificação da produção de H₂ e da fase líquida para avaliação do crescimento microbiano e da produção de metabólitos solúveis dos reatores em batelada. As particularidades de cada ensaio, juntamente com os protocolos de análise, são dadas nos tópicos e subtópicos seguintes. Abaixo são dadas as características gerais a todos os ensaios.

O meio empregado para todos os ensaios de fermentação de glicerol, denominado como meio mínimo, foi adaptado de Homann e colaboradores (1990) sendo composto de 3,40 gL⁻¹ K₂HPO₄; 1,30 gL⁻¹ KH₂PO₄; 2,00 gL⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,005 gL⁻¹ FeSO₄.7H₂O; 0,20 gL⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,02 gL⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 0,25g NaHCO₃ e 1 gL⁻¹ extrato de levedura (em substituição ao conjunto de vitaminas empregado no meio original).

Com o intuito de garantir as condições de anaerobiose dos ensaios, todas as soluções empregadas (meio, glicerol e água) foram preparadas com água fervida. Além disso, os ensaios foram realizados em frascos âmbar de 250 mL selados com tampa de borracha e lacre metálico. Após serem lacrados, a atmosfera dos frascos foi purgada com nitrogênio por 1 minuto com o intuito de eliminar o oxigênio presente. Essa purga com N₂ também foi realizada a cada amostragem dos frascos, para garantir que todo o hidrogênio produzido no intervalo analisado fosse removido antes da próxima leitura da fase gasosa.

Para a realização dos ensaios, uma colônia das culturas mantidas em placas de Petri foi coletada e inoculada em um tubo de ensaio com tampa de rosca com 5 mL de meio mínimo contendo glicerol ainda sob condições aeróbias. Após 16 horas de incubação a 35 °C e 170 rpm, 500 µL dessa cultura foram repicados em um frasco âmbar lacrado (sob condições anaeróbias) contendo meio mínimo acrescido de glicerol, em um volume final de 150 mL. Para o início dos ensaios, essa última cultura foi inoculada para uma densidade óptica a 550 nm de 0,035 (exceto quando especificado um valor diferente no texto) em frascos lacrados e esses reatores foram incubados a 35 °C e 170 rpm.

3.4.1. Determinação da massa seca de células

O crescimento dos micro-organismos foi acompanhado por meio da medição da densidade óptica da cultura a 550 nm com auxílio de um espectrofotômetro UV-Visível (SP-2000UV, Spectrum). Para o isolado *Enterobacter* sp. 9R também foi realizada a determinação da massa seca de células. Para isso, foi realizado um ensaio de fermentação

do glicerol como descrito no tópico 4.4 e 10 mL da fase líquida foram coletados entre 0 e 24 horas de ensaio em intervalos de duas horas.

Após a coleta, a fase líquida foi filtrada por sistema de vácuo em membranas pré-pesadas de éster de celulose com porosidade de 0,45 μm . Em seguida, as membranas foram mantidas em estufa de secagem a 80 °C até que não fosse verificada nenhuma alteração de massa. O uso desse procedimento permitiu a determinação da equivalência entre 1,0 ponto de absorbância a 550 nm e 0,49 gL^{-1} de massa seca de células para o isolado 9R.

3.4.2. Verificação da influência da concentração inicial de glicerol sobre o metabolismo dos isolados

Um dos principais problemas a serem resolvidos quanto a conversão biológica do glicerol é a dificuldade dos micro-organismos em lidar com altas concentrações desse composto (SARMA *et al.*, 2013b). Considerando esse fato, os primeiros ensaios de fermentação realizados visaram compreender as atividades das rotas metabólicas dos isolados em diferentes concentrações iniciais de glicerol.

Para isso, a montagem geral dos reatores em batelada seguiu o descrito no item 3.4. Os experimentos foram realizados em meio mínimo com pH 6,5 em três diferentes concentrações iniciais de glicerol: 5,00; 14,00 e 40,00 gL^{-1} , empregadas desde as placas para manutenção dos micro-organismos, até os frascos de adaptação, inóculo e ensaios de fermentação. Os reatores em batelada foram incubados a 35 °C e 170 rpm e foram monitorados até o encerramento da produção de hidrogênio. O pH dos meios também foi definido com base no trabalho de Homann e colaboradores (1990). A escolha das concentrações de glicerol foi baseada nos valores iniciais empregados para a fermentação desse substrato em vários trabalhos apresentados na literatura e discutidos durante a revisão de literatura, com o intuito de serem testadas concentrações consideradas como baixas, medianas e elevadas.

Para estimar o direcionamento de carbono em cada situação, os rendimentos produto/substrato ($Y_{P/S}$) foram calculados dividindo a quantidade de produto (em gL^{-1} ou molL^{-1}) pela quantidade de substrato consumido em cada condição testada. Além disso, o direcionamento relativo do carbono foi calculado por meio das razões entre os rendimentos $Y_{P/S}$ de produtos derivados de acetil-CoA e os rendimentos $Y_{P/S}$ de produtos gerados previamente à geração de acetil-CoA.

Em um segundo momento, foi avaliada a possibilidade de pré-adaptação do metabolismo do isolado 9R à concentração de glicerol presente no frasco inóculo. A fim de verificar essa hipótese, foram realizados ensaios similares aos descritos no parágrafo anterior, com a diferença de que células pré-condicionadas em alta concentração de glicerol (50 gL^{-1}) durante o período de crescimento do inóculo foram inoculadas em ensaios de fermentação com concentração intermediária de glicerol (20 gL^{-1}) e vice-versa.

3.4.3. Avaliação dos impactos de contaminantes do glicerol bruto sobre o metabolismo do isolado *Enterobacter* sp. 9R

Além da dificuldade em se trabalhar com altas concentrações de substrato, outro obstáculo para o tratamento biológico do glicerol residual é a presença de diversas impurezas em sua composição (SAMUL *et al.*, 2014). Desse modo, foram realizados testes para a verificação dos efeitos de alguns desses contaminantes sobre o metabolismo do isolado *Enterobacter* sp. 9R. Para os testes, foram escolhidas as impurezas NaCl, KCl e metanol, as quais apresentam maior ubiquidade e concentração média em amostras de glicerol e/ou maior efeito tóxico sobre micro-organismos, com base na informação disponibilizada por vários autores (HANSEN *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2012; KERR *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2010; MOTHEs *et al.*, 2007; RYWINSKA *et al.*, 2016; VENKATARAMANAN *et al.*, 2012). As concentrações de cada impureza também foram calculadas a partir dos valores reportados por esses estudos.

Assim, os ensaios foram montados de acordo com o que é descrito no item 4.4, com a adição individual em cada teste de NaCl (na concentração final de 0,86 ou $1,43 \text{ gL}^{-1}$) ou KCl (na concentração final de 0,86 ou $1,43 \text{ gL}^{-1}$) ou metanol (na concentração final de 2,00 ou $3,14 \text{ gL}^{-1}$).

3.4.5. Avaliação dos efeitos da quantidade inicial de células sobre o metabolismo do isolado *Enterobacter* sp. 9R

Vários valores referentes à quantidade de células usadas como inóculo são reportados na literatura para ensaios de conversão do glicerol, tanto para culturas puras como para culturas mistas (LIU *et al.*, 2013; PARATE *et al.*, 2018; REUNGSANG *et al.*, 2013; VIKROMVARASIRI *et al.*, 2016). A fim de verificar a influência desse fator sobre o metabolismo do glicerol pelo isolado 9R foram montados reatores em batelada como descrito no item 4.4 e os ensaios foram realizados com valores de densidade óptica inicial da cultura 2 e 7 vezes maiores que o valor padronizado nos primeiros ensaios (0,035),

empregando para cada condição, um valor inicial de DO de 0,070 e 0,245, respectivamente.

3.4.6. Avaliação dos efeitos da aerobiose e do pH sobre o metabolismo do isolado *Enterobacter* sp. 9R

Alguns autores reportam grandes diferenças metabólicas para a mesma linhagem em processos de conversão de substratos sob condições de anaerobiose ou aerobiose, sendo para alguns micro-organismos e produtos a presença de oxigênio pode ser benéfica (CHEN *et al.*, 2006; HALLENBECK, 2005; MAZUMDAR *et al.*, 2013). Além da presença de oxigênio, o pH dos meios empregados para processos de bioconversão realizados apresenta inúmeros exemplos de tentativas de otimização (LEE *et al.*, 2017; LIN e LAY, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2018; TRCHOUNIAN *et al.*, 2015).

Desse modo, a influência desses dois fatores também foi analisada. Para analisar os efeitos do pH, foram realizados os mesmos procedimentos descritos no item 3.4, no entanto, com o pH inicial fixado em 8,0. Já para avaliar os efeitos da oxigenação, também foram realizados os mesmos procedimentos descritos no item 3.4, com exceção da purga com N₂, a qual não foi realizada inicialmente. Em vez disso, os frascos foram mantidos com atmosfera ambiente e nos pontos de 4, 8, 10, 14, 26, 54, 72 horas, foram purgados com ar sintético (20,0% O₂ e % 80,0 N₂, WhiteMartins). Para todos os outros pontos de coleta desse ensaio, a purga foi realizada com N₂.

3.5. Técnicas analíticas

3.5.1. Coleta da fase líquida e quantificação dos compostos por cromatografia líquida

Para verificar quais compostos foram produzidos durante os ensaios, amostras de 1,5 mL foram tomadas em diferentes intervalos de tempo, filtradas em membranas de 0,45 µm com auxílio de uma seringa e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Com o auxílio de um auto injetor (modelo SIL 30AC - Shimadzu®), um volume de 20 µL foi injetado em um sistema HPLC Shimadzu equipado com duas colunas em série (HPX-87H e *Fermentation Monitoring*, Bio-Rad).

A separação dos metabólitos foi monitorada com o uso de um detector UV-Vis (SPD-10AV Shimadzu®, nos comprimentos de onda de 210 nm e 284 nm) seguido de um detector de índice de refração (RID-6A Shimadzu®). A fase móvel empregada foi

ácido sulfúrico a 6 mM (grau HPLC, Sigma) na vazão de 0,5 mL/min e a temperatura do forno (CTO-10A Shimadzu®) foi mantida a 36 °C.

Para a verificação dos compostos produzidos, os tempos de retenção dos picos dos cromatogramas foram comparados com os cromatogramas obtidos da separação da mistura de padrões de diferentes metabólitos. Foram inseridos no *pool* de padrões, além do glicerol, variados compostos que podem ser produzidos durante a fermentação desse substrato ou que podem estar presentes em amostras de glicerol bruto: lactato, succinato, formiato, acetato, propionato, butirato, iso-butirato, valerato, iso-valerato, metanol, etanol, propanol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol e butanol. A quantificação foi realizada empregando-se curvas padrão na faixa de concentração de 100 mgL⁻¹ a 5.000 mgL⁻¹ para álcoois, poliálcoois e ácidos orgânicos e 100 mgL⁻¹ a 40.000 mgL⁻¹ para o glicerol.

3.5.2. Coleta da fase gasosa e determinação do H₂ produzido

Previamente a cada amostragem da fase gasosa, a pressão dos frascos foi aferida com uso de um manômetro. Em seguida, com auxílio de uma seringa, uma amostra da fase gasosa foi injetada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de condutividade térmica (GC-TCD, GC-2014 Shimadzu) equipado com colunas CP-Molsieve 5A e CP Pora BOND Q. Para a separação dos gases, nitrogênio foi empregado como gás de arraste, as temperaturas do forno e do detector foram mantidas a 40°C e 120°C, respectivamente, e a velocidade linear mantida a 50,0 cm/s. Os valores da concentração dos gases foram obtidos usando a teoria de gases ideais e corrigidos para condições de pressão de 1 atm e temperatura de 273 K.

3.6. Cálculos, planejamento experimental e modelagem

Para auxiliar na compreensão e comparação dos dados experimentais, foram empregadas diferentes ferramentas matemáticas, apresentadas nos sub-itens abaixo. Os métodos apresentados nessa seção foram colocados em prática por meio dos softwares MATLAB (Math Works, 2010) e STATISTICA (Tibco, 2010).

3.6.1. Análise da cinética de produção de H₂

Para a modelagem e análise cinética dos dados de produção de H₂ foi empregado o modelo modificado de Gompertz como descrito por Zwietering e colaboradores (1990), segundo a equação abaixo:

$$\text{Produção de H}_2 \text{ (mmol)} = P e^{-e^{[(\frac{R_m e}{P}) * (\lambda - t) + 1]}}$$

Onde:

P = produção máxima produção de hidrogênio (mmol);

R_m = taxa máxima de produção do gás (mmol/h);

λ = tempo de fase *lag* (horas);

e = constante de Euler (2,71828)

O uso do modelo modificado de Gompertz já é consolidado na literatura para análises da produção biológica de H₂ (LO *et al.*, 2013; MARU *et al.*, 2013; SEIFERT *et al.*, 2009; SELEMBO *et al.*, 2009) e por isso foi empregado para a modelagem de nossos dados.

3.6.2. Análise da cinética de consumo de substrato e crescimento microbiano

Para a modelagem dos dados de consumo de substrato e crescimento microbiano foi empregado, primeiramente, o modelo de Monod. Buscando o melhor ajuste dos dados, devido à hipótese de inibição pelo substrato outros modelos foram testados, entre eles os de Moser, Tan, Haldane e Luong (DUTTA, 2015). As equações dos modelos de Monod e Luong são mostradas abaixo:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(K_s + S)} \quad \text{Equação de Monod}$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \gamma_s}{(K_s + \gamma_s)} \left[1 - \frac{\gamma_s}{\gamma_s^*} \right]^n \quad \text{Equação de Luong}$$

Onde: μ = velocidade específica de crescimento;

μ_{max} = velocidade específica máxima de crescimento;

S = concentração de substrato;

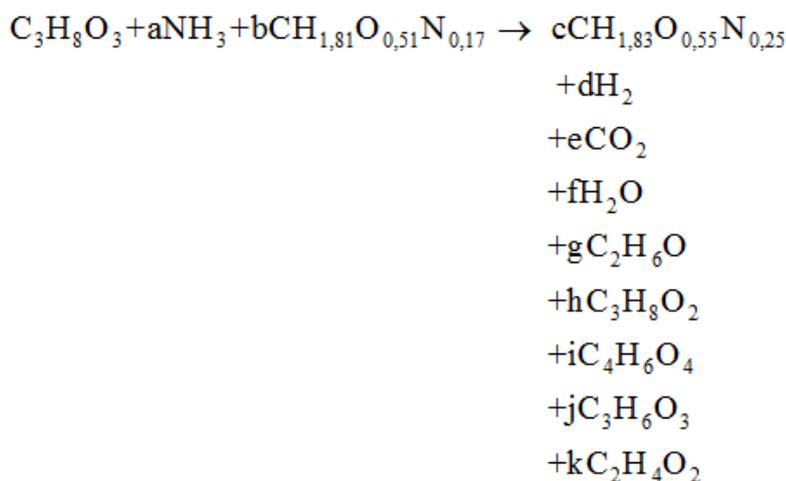
K_s = constante de saturação (igual a S quando μ = 0,5 μ_{max});

γ_s = concentração de substrato;

γ_s^{*} = concentração máxima de substrato acima da qual o crescimento é completamente inibido.

3.6.3. Equação estequiométrica da conversão de glicerol em produtos

Para verificar o efeito das diferentes concentrações de glicerol sobre o conversão de substrato a produtos, foi estabelecida uma equação com os coeficientes estequiométricos para todos os metabólitos encontrados ao final da produção de hidrogênio para o isolado 9R, nos ensaios de verificação da influência da concentração inicial de glicerol sobre o metabolismo do mesmo, a qual é mostrada abaixo:



Onde: a = coeficiente estequiométrico da amônia;

b = coeficiente estequiométrico do extrato de levedura (NIELSEN *et al.*, 2003);

c = coeficiente estequiométrico da biomassa de *Enterobacter* (NIELSEN *et al.*, 2003);

d = coeficiente estequiométrico do hidrogênio;

e = coeficiente estequiométrico do dióxido de carbono;

f = coeficiente estequiométrico da água;

g = coeficiente estequiométrico do etanol;

h = coeficiente estequiométrico do 1,3-propanodiol;

i = coeficiente estequiométrico do ácido succínico;

j = coeficiente estequiométrico do ácido láctico;

k = coeficiente estequiométrico ácido acético.

3.6.4. Planejamento experimental e determinação dos parâmetros de desejabilidade para a obtenção de diferentes produtos de interesse

Os dados obtidos durante os experimentos de caracterização do metabolismo do isolado 9R foram usados para definir as variáveis pH, concentração inicial de glicerol e concentração inicial de células como os parâmetros ambientais relevantes a serem

ajustados para aumentar a bioconversão do glicerol. Tais melhorias foram avaliadas por meio da realização de uma série de 19 ensaios delineada empregando para o planejamento experimental a matriz de Doehlert, como descrito por Ferreira e colaboradores 2004.

Para cada um dos ensaios foram definidos diferentes valores para as variáveis supracitadas. Para a realização do planejamento, foram definidos como mínimos e máximos, respectivamente, para cada variável os valores de pH: 6,50 e 9,50; glicerol inicial: 5,00 e 50,00 gL⁻¹; e inóculo: 0,009 a 0,031 gL⁻¹. Os valores determinados para cada variável são mostrados na tabela 4, juntamente com as respectivas razões carbono/nitrogênio (C/N) de cada ensaio. Os valores de máximo e mínimo para cada variável analisada foram determinados com base nos resultados dos ensaios realizados previamente.

Após a realização dos ensaios, os valores obtidos para cada variável resposta (produtos de interesse) foram verificados por meio de análise de variância (ANOVA), diagrama de Pareto e superfície de resposta. As informações extraídas dessas análises foram então submetidas à ferramenta de desejabilidade, para obter condições otimizadas para a produção de diferentes conjuntos de metabólitos.

Tabela 4. Valores das variáveis pH, concentração inicial de glicerol e inóculo determinados pelo planejamento experimental de Doehlert.

Experimento	pH	Glicerol (gL ⁻¹)	Inóculo (gL ⁻¹)	Razão C/N
1	9,50	27,50	0,020	15,26
2	8,75	50,00	0,020	27,74
3	8,75	35,00	0,031	19,42
4	6,50	27,50	0,020	15,26
5	7,25	5,00	0,020	2,77
6	7,25	19,99	0,009	11,09
7	8,75	5,00	0,020	2,77
8	8,75	19,99	0,009	11,09
9	7,25	50,00	0,020	27,74
10	8,00	42,49	0,009	23,58
11	7,25	35,00	0,031	19,42
12	8,00	12,51	0,031	6,94
13	8,00	27,50	0,020	15,26
14	8,00	27,50	0,020	15,26
15	8,00	27,50	0,020	15,26
16	8,00	27,50	0,020	15,26
17	8,00	27,50	0,020	15,26
18	8,00	27,50	0,020	15,26
19	8,00	27,50	0,020	15,26

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

4.1. Isolamento, caracterização e análises metabólicas iniciais

Os subtópicos do item 4.1 contemplam os dados referentes ao isolamento e identificação dos micro-organismos e a caracterização do metabolismo do isolado *Enterobacter* sp. 9R em diferentes concentrações iniciais de glicerol.

4.1.1. Obtenção e caracterização morfológica, bioquímica e molecular dos isolados obtidos no meio EMB

O isolamento de enterobactérias presentes no lodo biológico envolvido no tratamento de glicerol bruto, realizado em meio EMB e sob condições aeróbias. Revelou a presença de diversas colônias. Colônias com característica macroscópicas e morfotintoriais distintas foram selecionadas e estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Características morfológicas dos isolados do lodo de um reator anaeróbio tratando glicerol residual (NUNES, 2014).

Isolado	Característica da colônia em meio EMB	Morfologia celular	Parede celular
3R	Marrom	Bacilo curto	Gram-negativo
9R	Marrom	Bacilo curto	Gram-negativo
12R	Branca	Bacilo longo	Gram-negativo
101R	Amarelo creme	Bacilo curto	Gram-negativo
6D	Branca	Coco/Bacilo	Gram-negativo
9D	Vermelho	Bacilo curto	Gram irregular

A identificação dos isolados foi conseguida com a amplificação e o sequenciamento do gene rRNA 16S, seguidos da comparação das sequências obtidas com banco de dados disponibilizado no *Ribosomal Database Project* (Release 8.1, Maidak *et al.*, 2016), e os resultados são mostrados na tabela 6. Como um dos objetivos do trabalho é a compreensão do metabolismo microbiano responsável pela degradação do glicerol, a busca por membros da família *Enterobacteriaceae* foi baseada na maior quantidade de informações disponibilizada sobre a fisiologia e as vias metabólicas desses. Além disso, trabalhos anteriores de nosso grupo mostraram, por meio de análises proteômicas, o enriquecimento de enterobactérias em um cultura mista após seu contato com glicerol,

nos reatores UASB que serviram como fonte da biomassa usada na etapa de isolamento (ZOREL, 2013). Somado a esse fato, vários autores relatam a obtenção de enterobactérias após o isolamento de micro-organismos consumidores de glicerol e ressaltam vantagens (como velocidade de crescimento, consumo de substrato e taxa de produção de vários compostos) desse tipo de bactéria sobre outras para a conversão desse substrato a produtos de interesse (HOMANN *et al.*, 1990; ITO *et al.*, 2005; KUROKAWA; TANISHO, 2005; REUNGSANG *et al.*, 2013).

Tabela 6. Identidade entre a sequência do gene 16S rRNA dos isolados e de espécies de referência e produção volumétrica de biogás em 24 horas (NUNES, 2014).

Isolado	Índice de similaridade – Espécie mais próxima	Produção de hidrogênio em 24 horas (mL)
3R	0,992 – <i>Enterobacter aerogenes</i>	21,4
9R	0,998 – <i>Enterobacter cloacae</i>	29,8
12R	0,992 – <i>Enterobacter cloacae</i>	16,1
101R	0,992 – <i>Enterobacter cloacae</i>	12,3
6D	0,998 – <i>Enterobacter cloacae</i>	14,6
9D	0,998 – <i>Enterobacter cloacae</i>	16,6

Interessantemente, a identificação molecular mostrou que todos os isolados obtidos pertencem ao gênero *Enterobacter*. Esse fato pode ser explicado pela alta taxa de crescimento e consumo de substrato no meio EMB por esse gênero, como já demonstrado em outros trabalhos (ZHAO, *et al.*, 2009).

Seguido ao isolamento, os micro-organismos foram submetidos a ensaios preliminares de crescimento e produção de hidrogênio em meio líquido contendo glicerol (Tabela 6). Desses ensaios, dois isolados, 3R e 9R, foram selecionados, devido à maior produção de biogás e melhor reprodutibilidade nos testes.

Algumas de suas características fisiológicas foram avaliadas com o uso de séries bioquímicas para corroborar os resultados do sequenciamento bem como para buscar indicativos das possíveis rotas metabólicas presentes nos isolados. Os resultados das séries bioquímicas são mostrados na tabela 7. As análises permitiram confirmar a identificação dos dois isolados como pertencentes ao gênero *Enterobacter*, sendo que, como diferenças no perfil bioquímico, enquanto o isolado 3R possui as características de fermentação ácido-mista de glicose (vermelho de metila positivo) e de não produzir 2,3-

butanodiol a partir desse substrato (Voges-Proskauer negativo), o isolado 9R não realizou fermentação ácido-mista e apresentou a produção do poli-álcool.

Tabela 7. Caracterização bioquímica dos isolados 3R e 9R.

Teste	Isolado	
	3R	9R
Lactose	+	+
Indol	+	+
Citrato	+	+
Sacarose	-	-
Glicose	+	+
Gás	+	+
H ₂ S	-	-
Lisina	+	+*
Motilidade	-	-
Urease	-	-
Vermelho de metila	+	-
Voges-Proskauer	-	+

* Positivo com 48 horas.

Os resultados dos testes bioquímicos, além de corroborarem as análises moleculares, permitem inferir sobre alguns dos produtos que podem ser encontrados durante a fermentação (como por exemplo 2,3-butanodiol, como indica o teste de Voges-Proskauer, ou diferentes ácidos carboxílicos, pelo teste de vermelho de metila) e também sobre a capacidade de uso de outros nutrientes além da fonte de carbono principal (como indicado pelos testes de citrato, lisina e indol).

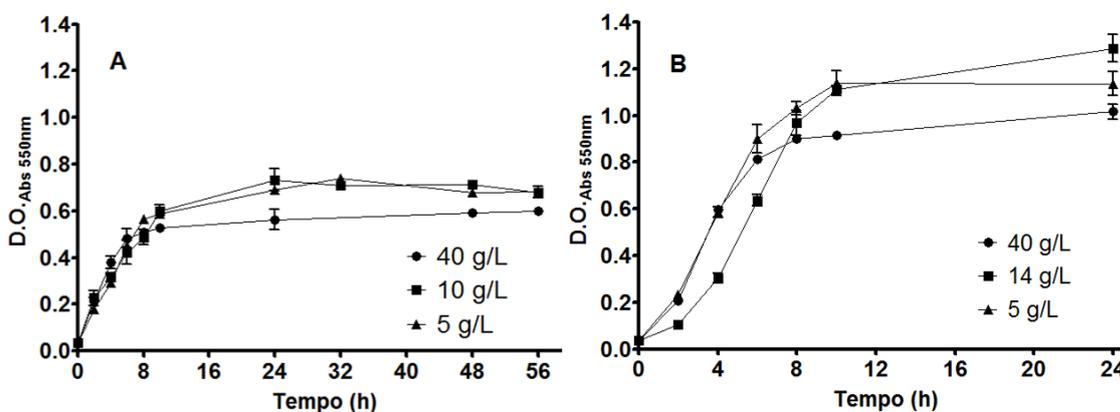
4.2. Influência da concentração inicial de glicerol na produção de H₂, no crescimento microbiano e no consumo de substrato

A obtenção de hidrogênio a partir do glicerol residual pode auxiliar na sustentabilidade de indústrias de biodiesel. No entanto, considerando os rendimentos (em mol de H₂/mol de glicerol consumido), os melhores resultados descritos na literatura foram obtidos com baixas concentrações iniciais de glicerol. A produção de hidrogênio empregando concentrações iniciais de glicerol mais altas é desejável, visto que o alto fator

de diluição do glicerol (puro ou bruto) necessário atualmente implica em custos com o meio para fermentação (Sarma *et al.*, 2013). Desse modo, essa seção do trabalho visou identificar os fatores da fermentação (crescimento microbiano, cinética de produção de hidrogênio e fluxo de carbono) afetados por variações na concentração inicial de glicerol.

Primeiramente, os dois isolados foram comparados quanto à capacidade de crescimento, produção de hidrogênio e consumo de substrato em três diferentes concentrações iniciais de glicerol: 5,00, 10,00 e 40,00 gL⁻¹ (chamadas de G5, G10 e G40, respectivamente). As razões C/N para cada condição foram de, respectivamente, 2,77; 5,55; e 22,20. Neste ponto, faz-se uma ressalva quanto à condição G10 para o isolado 9R, a qual teve como concentração inicial real, conforme resultados da análise por HPLC, 14,00 gL⁻¹ de glicerol e, conseqüentemente, razão C/N de 7,77. Como mostrado na figura 6, o isolado 9R apresentou um maior crescimento (estimado por densidade óptica) quando comparado ao isolado 3R em todas as concentrações testadas.

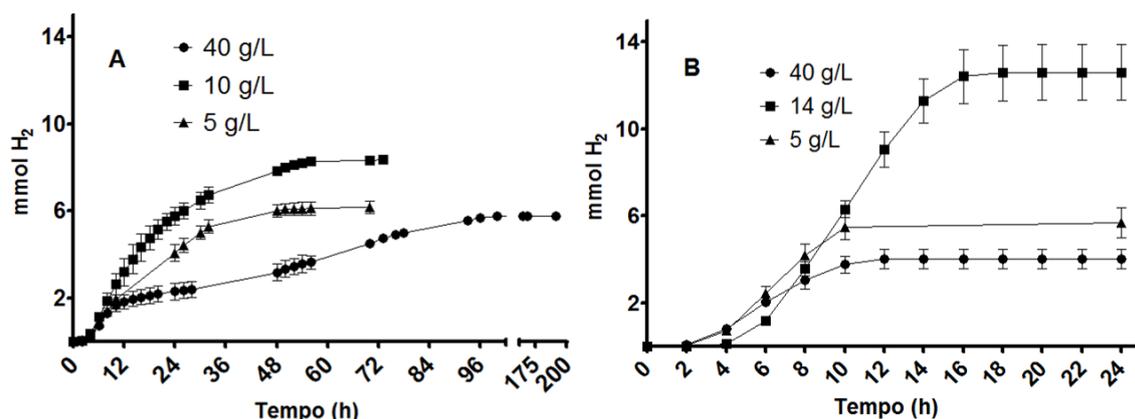
Figura 6. Curvas de crescimento a 5 (triângulos), 10 e 14 (quadrados) e 40 gL⁻¹ (círculos) de glicerol para os isolados 3R (A) e 9R (B).



Foi observada a influência negativa de maiores concentrações de glicerol sobre o crescimento de ambos os isolados, mas essa foi mais pronunciada para o isolado 9R. Em processos fermentativos, o crescimento dos micro-organismos é um fator importante, visto que o número de células pode influenciar os resultados finais do processo tanto positiva quanto negativamente. Uma maior densidade celular é desejável, pois a completa bioconversão do substrato é obtida mais rapidamente quanto mais células ativas estiverem presentes no sistema. Por outro lado, o crescimento excessivo de células resulta em uma maior quantidade de biomassa que necessitará de um pós-tratamento (AIVASIDIS e DIAMANTIS, 2005). Além disso, quanto mais células são obtidas, menor é o rendimento

produto/biomassa ($Y_{P/X}$). Portanto, uma conclusão sobre o efeito líquido de mudanças no crescimento microbiano pode ser estimada apenas quando confrontado com a produção, rendimentos finais e taxa de produção dos produtos de interesse. O perfil de produção de H_2 pelos dois isolados pode ser visto na figura 7.

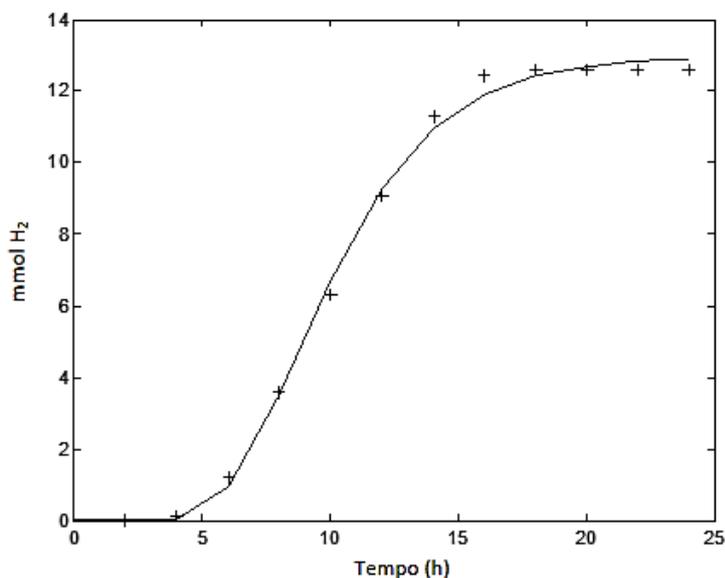
Figura 7. Produção cumulativa de H_2 (mmol) da fermentação de 5 (triângulos), 10 e 14 (quadrados) e 40 g/L^{-1} (círculos) de glicerol para os isolados 3R (A) e 9R (B).



De uma forma geral observa-se a diminuição na produção de hidrogênio para ambos os isolados na maior concentração de glicerol testada. Para auxiliar na análise do desempenho dos isolados, foi empregado o modelo modificado de Gompertz (ZWIETERING *et al.*, 1990). Por meio da modelagem dos dados experimentais, essa ferramenta permite calcular a produção máxima, a taxa máxima de produção e o tempo de fase *lag* (λ) para um produto de interesse. Como exemplo da adequabilidade do modelo, o ajuste desse para um dos ensaios é apresentado na figura 8 e os resultados da modelagem são mostrados na tabela 8. Devido ao perfil de produção de H_2 pelo isolado 3R na condição G40 apresentar dois patamares, os dados desse ensaio foram modelados por um modelo de primeira ordem, como feito por Ferreira e colaboradores (2013).

Quando comparada a produção de H_2 nas três condições (figura 7 e tabela 8), três observações iniciais podem ser feitas: todos os ensaios apresentaram uma fase *lag* de produção, a concentração intermediária de glicerol foi a melhor para ambos os isolados e o tempo necessário para que o isolado 9R atingisse a produção máxima foi muito menor em todos os ensaios.

Figura 8. Ajuste do modelo modificado de Gompertz aos dados experimentais do ensaio G10 para o isolado 9R, apresentado aqui como exemplo dos ajustes obtidos para os demais experimentos.



Apesar de não desejada em processos fermentativos, a fase *lag* para a geração de um produto é comum quando há a transferência de células de um meio para outro, devido ao tempo necessário para a reestruturação da maquinaria celular em resposta às condições do novo ambiente (Pin *et al.*, 2009). Quanto ao tempo para atingir a produção máxima, para o isolado 9R esse variou entre 18 a 24 horas, enquanto que para o 3R, esse intervalo chegou a atingir 173 horas. Na condição G10, as produções máximas para o 3R e o 9R foram de 8,35 e 12,60 mmol de H₂, respectivamente. Devido à diferença na concentração inicial de glicerol e no consumo do substrato pelos dois isolados (Tabela 8), esses valores podem ser comparados apenas quando tomados como rendimento $Y_{P/S}$ (em mols de H₂ produzido/mols de glicerol consumido). Para o 3R, o $Y_{P/S}$ para o H₂ foi de 0,86, enquanto para o 9R foi de 0,55 (Tabela 8).

Esses rendimentos equivalem a 85,7% e 55,3% do valor teórico de 1 mol de H₂/mol de glicerol que pode ser obtido por linhagens de *Enterobacter* na fermentação de glicerol a H₂ e etanol (co-produto preferencial para a obtenção de hidrogênio em enterobactérias) (NWACHUKWU *et al.*, 2012; YAZDANI e GONZALEZ, 2008). Para

Tabela 8. Dados experimentais e modelados da produção de hidrogênio e dados experimentais do consumo de glicerol e rendimento de hidrogênio.

Modelagem de Gompertz									
Isolado	Ensaio (mmol total em 150 mL)	Produção experimental de H ₂ (mmol)	P ₀	R _m	λ	R ²	Glicerol consumido		Rendimento
			Produção máxima de H ₂ (mmol)	Taxa de produção (mmol H ₂ /hora)	Fase lag (horas)	(% consumida)	mmol	(mmol H ₂ /mmol glicerol)	
	G5 (8,65)	6,17	6,23	0,21	2,53	0,99	4.288,54	6,99	0,88
							(80,81)		
3R	G10 (16,29)	8,35	8,22	0,29	2,04	0,99	5.980,35	9,74	0,86
							(59,79)		
	G40 (65,15)	5,75	6,73*	0,02*	-	0,94	ND		ND
	G5 (8,65)	5,69	5,72	1,08	3,63	0,99	5.313,04	8,65	0,66
							(100,00%)		
9R	G10 (22,80)	12,60	12,96	1,64	5,88	0,99	14.000,02	22,80	0,55
							(100,00%)		
	G40 (65,15)	4,04	4,08	0,69	2,94	0,99	7.750,88	12,62	0,32
							(19,37%)		

Onde*: Ajustado por modelo de primeira ordem, ND: Não determinado.

a fermentação do glicerol por diferentes isolados do gênero *Enterobacter*, são reportados na literatura valores de rendimento entre 12 e 89% (ITO *et al.*, 2005; MARKOV *et al.*, 2011; REUNGSANG *et al.*, 2013). Considerando que grande parte dos trabalhos sobre fermentação do glicerol fazem uso de concentrações próximas às da condição G10 (CINTOLESI *et al.*, 2012; SARMA *et al.*, 2013), os rendimentos apresentados por nossos isolados são comparáveis aos obtidos em diferentes sistemas.

A despeito do maior rendimento obtido pelo isolado 3R, o tempo necessário para alcançá-lo foi de 73 horas, frente a 22 horas pelo 9R. Esse menor intervalo de evolução de hidrogênio acarretou em uma taxa máxima de produção 5,7 e 34,5 vezes maior para o 9R em relação ao isolado 3R nas condições G10 e G40, respectivamente. (Tabela 8). A relação inversa entre taxas de produção e rendimentos encontrada para os dois isolados é comum para sistemas biológicos de produção de H₂, independentemente da técnica, do inóculo e do substrato empregados, como ressaltado por Hallenbeck e colaboradores (2012). Em um trabalho de revisão sobre diferentes sistemas, os autores observaram que reatores de fermentação escura com maiores taxas de produção apresentam baixos valores de rendimento.

Além das maiores taxas de produção, nas condições G5 e G10, o isolado 9R consumiu a totalidade de substrato adicionado em 24 horas, enquanto o caldo fermentado do 3R ainda continha, respectivamente, aproximadamente 20 e 40% de substrato, após 56 horas de fermentação. Essa capacidade de consumo rápido do substrato é uma vantagem do isolado 9R sobre outros micro-organismos estudados para a conversão de glicerol a H₂ e que faz dele um candidato promissor para o tratamento de glicerol residual, visto que o tempo é um fator importante no estabelecimento de um processo.

O consumo de glicerol apresentado pelo isolado 9R pode ser considerado alto mesmo quando comparado com micro-organismos geneticamente modificados. Como exemplo, Tran e colaboradores (2104) demonstraram que a deleção de sete genes de vias competitivas à geração de hidrogênio na linhagem de *E.coli* BW25113 aumentaram os rendimentos obtidos para a produção de H₂. Entretanto, tais modificações também acarretaram na diminuição do crescimento microbiano e do consumo de glicerol, de modo que, mesmo após 120 horas de fermentação, menos de 40 % do substrato (em uma concentração inicial de 10 gL⁻¹) foi consumido pela cepa mutante.

Provavelmente, o maior consumo de substrato pelo 9R foi devido ao crescimento mais acentuado desse isolado, o qual pode estar relacionado com a maior capacidade de

lidar com o excesso de equivalentes redutores gerado pelo consumo de glicerol por meio da produção de 1,3-propanodiol, como será discutido a seguir.

Esse excesso de equivalentes redutores reportado pela literatura pode ter sido uma das causas para a menor produção de H₂ para os dois isolados na condição G40. Devido ao maior grau de redução do glicerol em relação à biomassa, seu consumo gera excesso de NADH, aumentando a razão NADH/NAD⁺ (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013). Como o NAD⁺ é necessário no primeiro passo da oxidação do glicerol, sua falta pode diminuir o consumo desse substrato e fazer com que a célula dê preferência a vias que regenerem mais rapidamente esse cofator, diminuindo, conseqüentemente, a produção de hidrogênio. Interessantemente, Barbirato e colaboradores (1996), demonstraram, em um estudo com *E. agglomerans*, que concentrações altas de glicerol também podem influir de maneira contrária na razão NADH/NAD⁺ e, da mesma forma, interferir negativamente na atividade da via glicolítica e no consumo do glicerol.

Esse impedimento do consumo de glicerol pôde ser notado para o isolado 9R, o qual, na condição G40, apesar da maior disponibilidade de substrato, consumiu apenas 7.750,88 mgL⁻¹ (12,62 mmols) de glicerol, aproximadamente 55% do consumido na condição G10. Infelizmente, esse comparativo não pôde ser realizado para o isolado 3R, devido à contaminação das amostras que seriam submetidas à cromatografia.

Por outro lado, alguns autores atribuem a diminuição da produção e do rendimento de H₂ e co-produtos ao estresse osmótico e à conseqüente perda de água pelas células causada por altas concentrações de glicerol (REUNGSANG et al., 2013). No entanto, o glicerol é altamente difusível pela membrana de bactérias (DILLS *et al.*, 1980) e, contrariamente a outros osmólitos, não demonstra efeitos negativos sobre a expressão de enzimas do complexo FHL (complexo multiproteico responsável pela dissimilação de formiato em CO₂ e H₂) (GOUESBET *et al.*, 1993). Como demonstrado por Gouesbet e colaboradores (1993), o estresse osmótico não foi verificado para o glicerol na concentração de 75,5 gL⁻¹ (o equivalente a 820 mosM), de modo que esse efeito pode ser descartado também em nossos ensaios, os quais foram realizados em concentrações inferiores de glicerol. Desse modo, pode-se supor que a diminuição da produção de hidrogênio causada pela maior concentração de glicerol testada pode estar relacionada também com a alteração de outras vias indiretamente relacionadas com esse processo – como consumo de substrato e direcionamento do fluxo de carbono – visto que, em ensaios de quimiotaxia, já foram demonstradas alterações do comportamento de células de *E. coli*

quando em contato com a mesma concentração de glicerol empregada na condição G40 (LI e ADLER, 1993).

Li e Adler (1993) demonstraram que as alterações de comportamento de células de *E.coli* observados com a adição de glicerol foram dependentes de receptores presentes na membrana, indicando que esse carboidrato pode induzir alterações em processos celulares prévios à sua internalização. Em suma, os efeitos negativos de altas concentrações de glicerol podem estar ligados diretamente ao seu consumo (devido a variações nos níveis de NADH ou produtos inibitórios) ou à influência da presença do substrato sobre a regulação do metabolismo microbiano. Desse modo, a análise dos metabólitos produzidos em cada condição (exposta em seguida) torna-se imprescindível para a formulação de qualquer suposição sobre as causas para o que foi observado.

Como o foco desse capítulo do trabalho é a compreensão do metabolismo de um micro-organismo com a capacidade de aliar o tratamento de um resíduo à produção de H₂ e co-produtos de uma maneira economicamente e ambientalmente favorável, nos tópicos abaixo é dada maior atenção ao metabolismo do isolado 9R, devido às maiores taxas de produção de H₂ e consumo de glicerol. Por outro lado, considerando a produção e o rendimento de outros compostos, principalmente o etanol, o isolado 3R pode ser alvo de futuros trabalhos do grupo, desde que suas taxas de conversão pudessem ser melhoradas.

4.2.1. Influência da concentração inicial de glicerol sobre os produtos da fermentação e a relação desses com a produção de H₂

Considerando que a fermentação do glicerol pode produzir, além do hidrogênio, outros compostos de interesse e que a quantificação desses pode indicar quais as principais vias metabólicas ativas nos isolados, foi realizada a análise do caldo fermentado em diferentes intervalos de tempo. No que tange a produtos em potencial, em comparação aos valores apresentados na literatura para os compostos encontrados (LI et al. 2013), somado ao H₂, ambos os isolados mostraram uma produção considerável de etanol (levando em conta posteriores otimizações do sistema), como pode ser visto na tabela 9. A atenção especial dada ao H₂ deve-se ao fato de que as melhores condições de consumo de substrato e crescimento do isolado foram acompanhadas pelos melhores resultados relacionados a esse produto, de modo que, além de suas outras vantagens já destacadas, o hidrogênio pode servir como indicador do desempenho do isolado 9R durante a fermentação do glicerol.

Tabela 9. Concentrações e rendimentos finais ($Y_{P/S}$) dos produtos da fermentação do glicerol pelos isolados 3R e 9R nas condições G5, G10 e G40. Os rendimentos $Y_{P/S}$ são dados em mol produto/mol glicerol consumido.

Ensaio	Glicerol consumido		Ácido succínico			Ácido láctico			Ácido acético		
	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	$Y_{P/S}$	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	$Y_{P/S}$	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	$Y_{P/S}$
G5	4288,54	46,57	63,05	0,53	0,01	251,10	2,79	0,06	114,40	2,05	0,04
3R G10	5980,35	64,94	108,25	0,92	0,01	403,35	4,48	0,07	123,35	1,91	0,03
G5	5313,04	57,69	235,20	1,99	0,04	384,23	4,27	0,07	168,63	2,81	0,05
9R G10	14000,02	152,02	326,00	2,76	0,02	580,55	6,44	0,04	163,70	2,73	0,02
G40	7750,88	84,16	267,70	2,27	0,03	1164,4	12,93	0,15	113,87	1,90	0,02
Ensaio	Biomassa		1,2-PDO			1,3-PDO			Etanol		
	gL ⁻¹		mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	$Y_{P/S}$	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	$Y_{P/S}$	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	$Y_{P/S}$
G5	-		144,94	1,90	0,04	-	-	-	2245,9	48,75	1,05
3R G10	-		287,06	3,77	0,06	-	-	-	2797,4	60,72	0,94
G5	0,5598		-	-	-	626,65	8,24	0,14	2224,9	48,29	0,84
9R G10	0,6343		-	-	-	1024,06	13,46	0,09	4183,40	90,81	0,60
G40	0,5006		-	-	-	1648,85	21,67	0,26	1400,27	30,40	0,36

Nos ensaios G5 e G10, o isolado 3R apresentou altos rendimentos de conversão de glicerol a etanol, sendo que na condição G5 esse superou em 5% o rendimento teórico máximo de 1 mol de etanol/mol de glicerol para essa transformação (NWACHUKWU, R. *et al.*, 2012). Rendimentos levemente acima dos teóricos para o etanol já foram encontrados para outros micro-organismos consumidores de glicerol e podem ser explicados pelo consumo de outras fontes nutricionais presentes no meio – em nosso caso, o extrato de levedura (ITO *et al.*, 2005; NWACHUKWU *et al.*, 2012; YAZDANI e GONZALEZ, 2008).

Em contrapartida aos altos rendimentos do isolado 3R, o isolado 9R produziu quantidades próximas ou superiores às do 3R para todos os metabólitos encontrados (com exceção do 1,2-propanodiol, o qual foi observado apenas para o primeiro isolado) em menor tempo, e apresentou maior consumo de glicerol, sendo que nas concentrações iniciais de 5,00 e 14,00 gL⁻¹ consumiu todo o substrato. Por outro lado, assim como para o H₂, os rendimentos $Y_{P/S}$ do isolado 9R foram menores, devido ao maior consumo de glicerol e maior produção de biomassa.

Entretanto, os menores rendimentos do isolado 9R não indicam pior desempenho do mesmo em comparação ao isolado 3R, visto que as maiores produções, o maior consumo e o menor tempo de fermentação do 9R são pontos positivos quando se considera o desenvolvimento de um processo de conversão de determinado substrato. Desse modo, considerando as características do isolado, a regulação dos rendimentos apresentados pelo 9R se mostram como uma ótima alternativa para a otimização da bioconversão do glicerol por esse micro-organismo.

Apesar de menos promissores do ponto de vista quantitativo, os demais metabólitos da fermentação são úteis para a compreensão de alterações no comportamento microbiano em decorrência de mudanças no sistema e servem como indicadores de parâmetros do processo a serem otimizados. Como exemplo, a produção de diferentes polióis pelos isolados (1,2-PDO para o 3R e 1,3-PDO para o 9R) indica a presença de diferentes vias metabólicas para a destinação de equivalentes redutores em excesso e para a renovação de moléculas de NAD⁺ nas duas linhagens e pode ter sido um dos fatores determinantes para o melhor desempenho do 9R.

Segundo Clomburg e Gonzalez (2013), a via de produção de 1,3-PDO é mais comum entre micro-organismos e resulta em maiores quantidades desse polioliol em relação ao 1,2-PDO. Como a produção dos dois compostos auxilia na manutenção do estado redox intracelular, a capacidade de produção de 1,3-PDO em maiores quantidades facilita

a oxidação de moléculas de NADH e sua reintegração – na forma de NAD^+ – à via glicolítica, mantendo o funcionamento da mesma e garantindo a continuidade do consumo de substrato.

A produção dos compostos metabólitos em função do tempo também foi analisada e os resultados dessas análises para os isolados 3R e 9R são mostrados nas figuras 9 e 10, respectivamente

Figura 9. Monitoramento dos produtos da fermentação do glicerol em diferentes concentrações iniciais pelo isolado 3R. \blacktriangle = G5 (glicerol inicial a 5 gL^{-1}) e \blacksquare = G10.

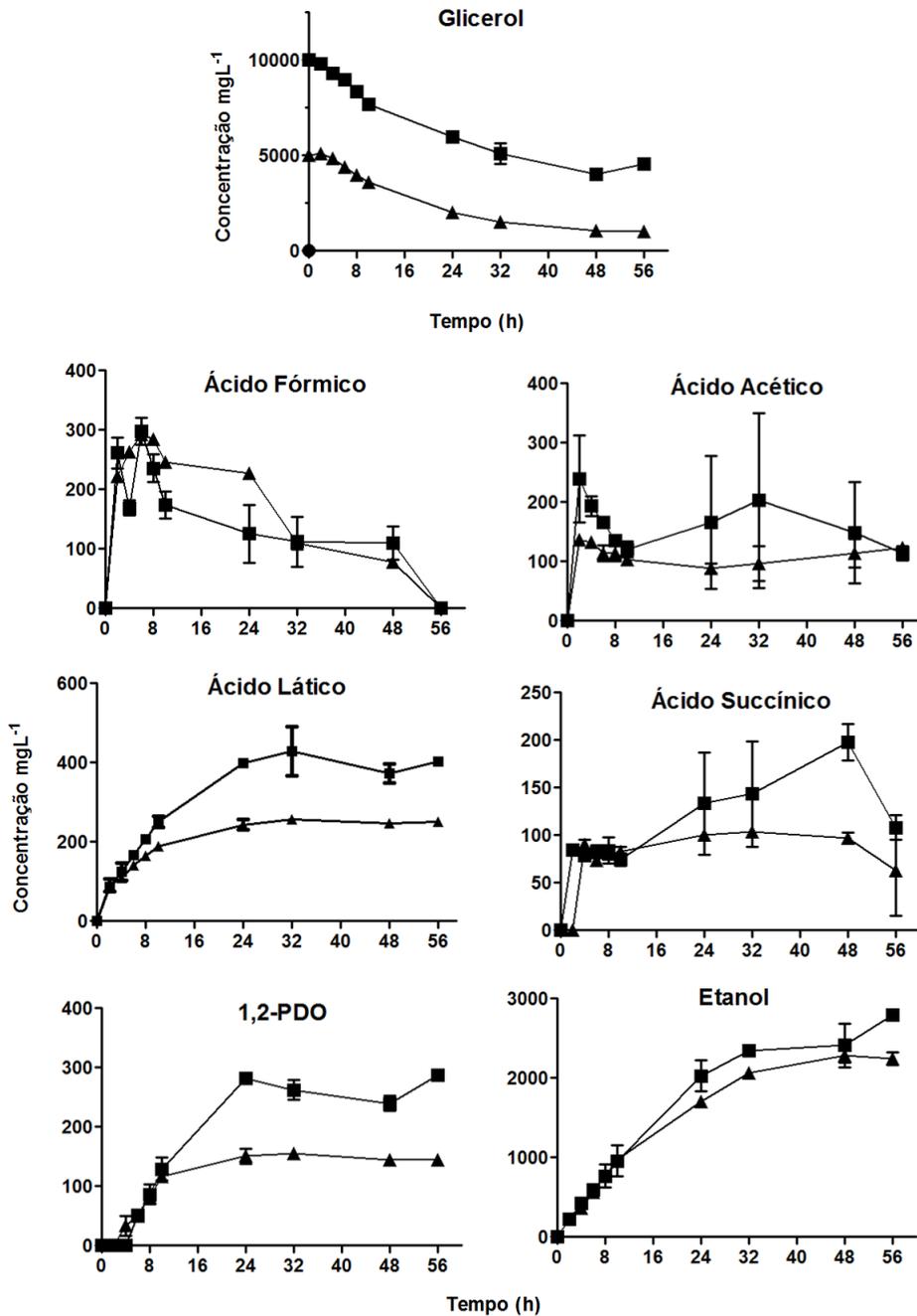
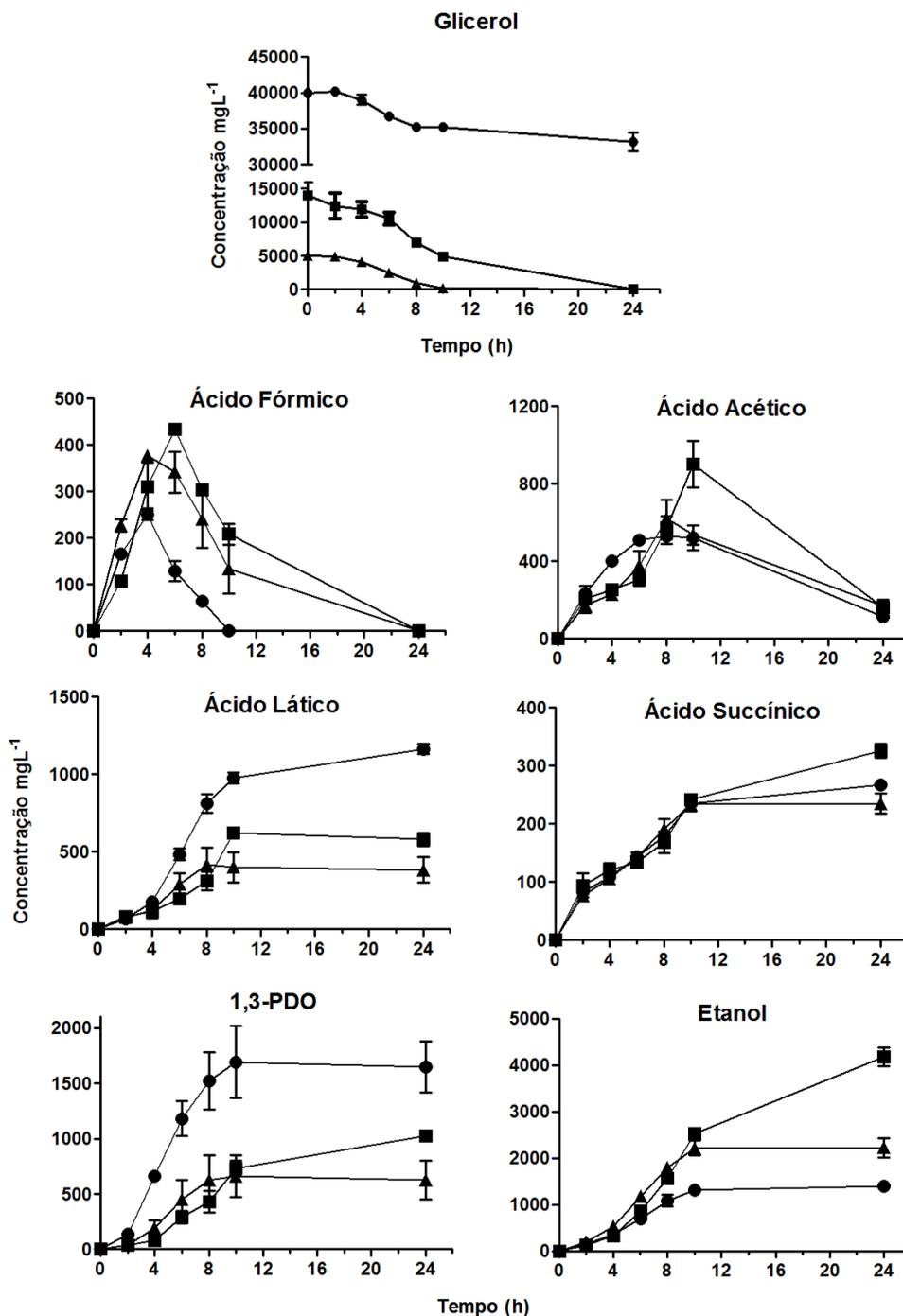


Figura 10. Monitoramento dos produtos da fermentação do glicerol em diferentes concentrações iniciais pelo isolado 9R. ▲ = G5 (glicerol inicial a 5,00 gL⁻¹), ■ = G10 (glicerol inicial a 14,00 gL⁻¹) e ● = G40 (glicerol inicial a 40,00 gL⁻¹).



No decorrer do processo fermentativo podem acontecer alterações no metabolismo microbiano. Entre elas, pode ser citada inclusive o consumo dos produtos ao invés da fonte de carbono adicionada inicialmente (GHOSE *et al.*, 1977). Assim, era esperado que alguns dos compostos estudados aparecessem em maior concentração em

pontos intermediários do que no final da fermentação. A análise desse comportamento é importante tanto para obter maiores quantidades de um produto de interesse quanto para compreender as variações do metabolismo microbiano durante o processo. De fato, pela análise das figuras 9 e 10, nota-se que para os dois micro-organismos alguns dos ácidos orgânicos apresentaram concentrações maiores em pontos intermediários do processo, sendo o ácido fórmico o exemplo mais claro desse acontecimento. Conforme discutido anteriormente, abaixo são analisados os comportamentos de produção e/ou consumo de cada um dos metabólitos e sua relação com a produção de H₂.

4.2.1.1. Ácido fórmico

Para ambas as linhagens, o ácido fórmico foi verificado em maior concentração no meio entre 4 a 6 horas e não foi detectado ao final dos ensaios. Além disso, foi verificado que o intervalo que compreende a maior concentração de ácido fórmico e seu imediato e contínuo decaimento coincide com o ponto de inflexão ascendente da curva de produção de H₂ (Figuras 7, 9 e 10). Essa correlação era esperada, visto que para as enterobactérias o formiato é inicialmente excretado e, com a acidificação do meio ocorrida durante a fermentação, o ácido é reinternalizado e convertido principalmente a H₂ e CO₂ pelo complexo FHL (LEONHARTSBERGER *et al.*, 2002).

Apesar dessas similaridades, os isolados apresentaram diferenças na concentração e no perfil de consumo de ácido fórmico que podem auxiliar na compreensão da quantidade de H₂ produzido e da taxa de produção do gás por cada um. De modo geral, o isolado 9R apresentou concentração máxima e velocidade de consumo de ácido fórmico superiores, de modo que com 24 horas o composto não foi detectado no meio em nenhuma das condições analisadas. Essa maior produção, somada à rápida reinternalização de formiato, provavelmente influenciaram na maior produção de H₂ apresentada pelo isolado, pois a expressão de genes do complexo FHL é dependente de altas concentrações intracelulares de formiato (SAWERS, 2005). Por outro lado, para o isolado 3R, além da menor concentração, o ácido fórmico desapareceu do meio de forma bem mais lenta e foi encontrado mesmo após 48 horas de fermentação, dados que podem ser relacionados às menores produções finais, menores taxas de produção e maior tempo de evolução de hidrogênio para o isolado.

A importância da capacidade de obtenção de ácido fórmico para a produção de H₂ pode ser verificada quando comparadas as três condições iniciais para o isolado 9R. A concentração máxima de formiato foi superior na condição G10, aproximadamente 1,7 e

1,2 vezes maior que nas condições G40 e G5, respectivamente. Em relação à condição G5, a maior concentração de formiato encontrada para a condição G10 pode ser explicada pela maior disponibilidade de substrato. No entanto, a elevação da concentração inicial de glicerol para 40 gL⁻¹ na condição G40 reduziu expressivamente a quantidade de ácido fórmico encontrada no meio (e, conseqüentemente, a quantidade de H₂ produzido). Essa observação indica, como suposto no item acima, que o aumento na disponibilidade de substrato pode ter redirecionado o metabolismo microbiano para a produção de compostos que sirvam como um escape para o excesso de equivalentes redutores, reduzindo o fluxo de carbono e elétrons que é direcionado para a produção de formiato.

4.2.1.2. Ácido láctico e 1,3-propanodiol

Para o isolado 9R, dois metabólitos, 1,3-propanodiol e ácido láctico, foram produzidos em maiores quantidades quanto maior a concentração inicial de glicerol. A produção de ambos os compostos emprega moléculas de NADH, permitindo sua oxidação a NAD⁺ (BARBIRATO *et al.*, 1997). Apesar de sua funcionalidade na manutenção do balanço redox, a produção desses compostos pode interferir de maneira negativa no desempenho microbiano.

Como exemplo, a transformação do glicerol a 1,3-PDO começa com a ação da enzima glicerol desidratase, que converte o glicerol a 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA), o qual é reduzido, com o uso de uma molécula de NADH, a 1,3-PDO pela enzima 1,3-propanodiol oxidoreductase. Em altas concentrações de glicerol, alguns trabalhos relatam o acúmulo de 3-HPA, o qual, devido à reatividade de seu grupo carbonila, torna-se altamente tóxico e pode impedir o consumo de glicerol e o crescimento celular (MA *et al.*, 2013). De fato, como pode ser visto nas figuras 6 e 9 e na tabela 8, na condição G40 para o isolado 9R foram obtidos os menores valores de densidade óptica e de porcentagem de consumo de glicerol.

Já o ácido láctico, outro composto produzido em maiores quantidades na condição G40, é obtido pela redução NADH-dependente do piruvato pela enzima lactato desidrogenase. Lu e colaboradores (2010), comparando o metabolismo de uma cepa selvagem de *E. aerogenes* e seu mutante deficiente na produção de lactato, observaram um maior crescimento celular, consumo de substrato (no caso, glicose) e produção final de H₂ na ausência de produção de ácido láctico. Os autores atribuíram parte dos efeitos benéficos à menor acidificação do meio pelo mutante, devido à menor produção não só de ácido láctico, mas também acético e succínico, o que permitiu que a cepa mutante

mantivesse sua atividade por mais tempo. Por outro lado, Barbirato e colaboradores (1996), em trabalho com três espécies de enterobactérias (*Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii*) em diferentes concentrações de glicerol, verificaram que a adição de lactato (de 1,98 a 9,64 gL⁻¹) – bem como acetato (de 2,70 a 5,83 gL⁻¹), succinato (de 0,47 a 2,95 gL⁻¹), formiato (de 1,38 a 4,79 gL⁻¹), etanol (de 0,18 a 2,30 gL⁻¹) e 1,3-PDO (de 9,28 a 32,64 gL⁻¹) – não apresentou toxicidade aos micro-organismos, sendo esta atribuída exclusivamente ao 3-HPA. Interessantemente, no mesmo trabalho, o aumento da concentração de glicerol causou a elevação na concentração de lactato apenas para *K. pneumoniae* e *C. freundii* e não para *E. agglomerans*.

4.2.1.3. Etanol

Além do aumento dos títulos de 1,3-PDO e ácido láctico, o redirecionamento metabólico decorrente do aumento da concentração de glicerol diminuiu não só a produção de ácido fórmico (e H₂), mas também de etanol, indicando um efeito negativo de maiores concentrações de glicerol sobre a obtenção de acetil-CoA e derivados. Essa diminuição na produção de etanol pode parecer contrária ao raciocínio apresentado para o lactato e o 1,3-PDO, pois a conversão de acetil-CoA a etanol regenera 2 moléculas de NAD⁺, que seriam de extrema importância para a manutenção do estado redox celular em altas concentrações de glicerol. No entanto, quando em condições que aumentam expressivamente a razão NADH/NAD⁺, a transformação de piruvato em lactato mostra-se como opção preferencial para os micro-organismos, visto que pode ser realizada mais rapidamente do que a indução de outras vias fermentativas (CLARK, 1989). O mesmo raciocínio se aplica à produção de 1,3-PDO, na qual a molécula de glicerol passa por apenas 2 transformações enzimáticas. Desse modo, a menor produção de etanol pode ser consequência do menor fluxo de carbono direcionado para a geração de acetil-CoA.

A diminuição na produção de etanol em concentrações elevadas de glicerol já foi observada para *E. agglomerans* e diferentes linhagens de *E. aerogenes* (BARBIRATO *et al.*, 1996; ITO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2012). Além da diminuição na concentração final, os dados de Lee e colaboradores (2012) e Ito e colaboradores (2005) mostram que o consumo (absoluto ou em taxa) de substrato e o rendimento (mols de etanol/mols de glicerol consumido) também diminuíram com o aumento da concentração de glicerol. Por outro lado, Reungsang e colaboradores (2013), em um trabalho sobre otimização das condições da fermentação de glicerol por *E. aerogenes*, observaram aumentos

progressivos na quantidade de etanol produzido com a elevação da concentração inicial de glicerol de 10,00 a 48,31 gL⁻¹, porém com perdas no rendimento de H₂. Tais discrepâncias podem estar relacionadas com as diferentes condições de cultivo (incluindo composição do meio e pH inicial) e com variações nas vias metabólicas dependendo da linhagem empregada. Interessantemente, para a condição G10, a produção de etanol foi observada também durante a fase estacionária de crescimento do isolado, coincidindo com o consumo de ácido acético. Essa possibilidade de conversão de outros subprodutos a etanol por nosso isolado também é um ponto a ser explorado em trabalhos futuros e alguns dos fenômenos metabólicos envolvidos nesse processo são discutidos no item abaixo.

4.2.1.4. Ácido acético

Da mesma forma que ocorreu para o formiato, a figura 10 evidencia claramente o acúmulo de acetato até determinado momento da fermentação seguido da redução de sua concentração no meio. A comparação entre os pontos de 10 e 24 horas de fermentação para o isolado 9R na condição G10 mostra que a concentração do ácido diminuiu 5,5 vezes nesse intervalo (de 902,6 para 163,7 mgL⁻¹). Apesar da diferença na concentração máxima de ácido acético observada entre os ensaios – também inversamente proporcional à concentração inicial de glicerol – a concentração final de acetato nas três condições apresentou valores parecidos e menores do que os encontrados para a maioria dos pontos intermediários da fermentação. Essa análise indica que houve o consumo, ou pelo menos a internalização, do ácido acético primeiramente exportado para o meio.

Segundo Wolfe (2005), a produção e excreção de acetato ocorrem devido a tentativa de limitar o ciclo do ácido tri-carboxílico; reciclagem de coenzima A; regeneração de NAD⁺ e obtenção de energia (pelo modulação da razão etanol/acetato) e fatores externos (como estado de oxidação do substrato e pH). Ainda segundo o mesmo autor, a reinternalização do ácido acético acontece em diferentes tipos de fermentação e é desencadeada principalmente por fatores como: entrada na fase estacionária de crescimento, acidificação do meio ou proximidade da depleção de substrato. Essa internalização, reportada para enterobactérias desde a década de 40 do século passado (Slade e Werkman, 1942), geralmente acontece com a co-assimilação do substrato e fornece para o micro-organismo uma fonte de carbono auxiliar que pode ser prontamente convertida a acetil-CoA, auxiliando na elevação do pH externo.

Portanto, nossos dados indicam que as suposições, citadas na revisão de literatura, acerca da existência em linhagens de *Enterobacter* de uma via funcional de produção de hidrogênio NADH-dependente (KUMAR; GHOSH; DAS, 2001; NAKASHIMADA et al., 2002; TANISHO et al., 1989; ZHAO et al., 2009) podem ter sido baseadas em valores subestimados de acetato produzido. Como a dissimilação de piruvato em formiato gera também uma molécula de acetil-CoA, vários trabalhos supõem que o número de mols de H₂ produzido por essa via seja impreterivelmente igual ao número de mols de derivados de acetil-CoA (etanol e acetato ou outros ácidos) excretados menos o número de mols de formiato remanescente. Devido à incoerência entre esses valores que ocorre na maioria dos trabalhos, ou seja, o número de mols de H₂ é superior ao dos produtos de acetil-CoA levados em consideração, é suposto que o “excesso” de hidrogênio seja proveniente de uma outra via, a qual emprega NADH diretamente como doador de prótons e elétrons para a produção do gás.

No entanto, o primeiro trabalho a conjecturar sobre a existência de tal via foi baseado em cálculos *termodinâmicos* supondo a existência dessa, tendo como evidências experimentais apenas dados de pH ótimo de evolução de hidrogênio (TANISHO et al., 1989). Em trabalhos posteriores do mesmo grupo, a hipótese foi alimentada com o desbalanço de massa entre os valores encontrados para os produtos excretados de acetil-CoA e o rendimento de hidrogênio (também apresentado na forma de H₂ calculado a partir da quantidade estimada de NADH remanescente em dependência dos metabólitos encontrados no meio) (KUROKAWA e TANISHO, 2005; TANISHO e KADOKURAT, 1998; TANISHO e ISHIWATA, 1994).

A partir de então, vários trabalhos consideram o “excesso” de hidrogênio como oriundo de uma via NADH dependente (JAWED et al., 2016; LU et al., 2009, 2010; LU et al., 2011; LU et al., 2011; PI et al., 2016; WANG et al., 2013; ZHANG et al., 2011; ZHANG et al., 2009; ZHAO et al., 2015, 2009). Entretanto, apenas um trabalho dá indícios da evolução de H₂ *in vitro* a partir da fração membranar de extratos celulares de *E. aerogenes* em contato com NADH ou NADPH, não tendo sido encontradas investigações posteriores na literatura (NAKASHIMADA et al., 2002; LIU et al., 2017). Além disso, nenhum dos trabalhos supracitados leva em consideração a participação de acetil-CoA na produção de componentes da biomassa celular (como aminoácidos e lipídeos) ou a possibilidade de conversão do acetato a outros metabólitos (inclusive o formiato).

Ainda, a maioria desses trabalhos analisa os produtos da fermentação ao final do ensaio, ou por menos tempo ou ainda em intervalos maiores do que os empregados em nosso trabalho, de modo que esse fenômeno de excreção/reinternalização pode ter passado despercebido. A fragilidade da proposição dessa nova via metabólica empregando apenas o balanço de massa de produtos excretados torna-se maior quando analisados trabalhos recentes sobre a reversibilidade *in vivo* de dois processos enzimáticos essenciais para a produção de hidrogênio via fermentação: a conversão de piruvato a acetil-CoA e formiato (via PFL) e a dissimilação de formiato a H₂ e CO₂ (via FHL) (PINSKE e SARGENT, 2016; ZELCBUCH *et al.*, 2016).

Pinske e Sargent (2016), usando uma linhagem de *E. coli* deficiente para os genes *pflA*, *hyaB*, *hybC* e *fdhE* – sem a capacidade de produção endógena de formiato e desprovida de demais hidrogenases ou formiato-desidrogenases, exceto o complexo FHL – observaram a fixação H₂-dependente de CO₂ na forma de formiato realizada pelo complexo FHL. Com o uso de substratos marcados com C¹³, Zelcbuch e colaboradores (2016) verificaram a internalização de acetato e formiato e sua conversão a piruvato (e, posteriormente a aminoácidos) por uma cepa de *E. coli* deficiente para o ciclo do glioxilato ($\Delta aceA$). Esses achados, somados ao que foi discutido acima e à existência de meios de conversão de acetato a formiato – ou formiato a acetato – por meio da via redutiva de acetil-CoA (Zelcbuch *et al.*, 2016), ilustram a complexidade da proposição de novas vias metabólicas bem como do destino final de seus metabólitos baseando-se apenas em cálculos feitos sobre vias já conhecidas.

Portanto, é provável que as afirmações sobre a existência dessa via NADH-dependente para a produção de hidrogênio em espécies do gênero *Enterobacter* sejam fundamentadas apenas em balanços de massa subestimados e cálculos teóricos que desconsideram as demais vias metabólicas bacterianas.

4.2.1.5. Ácido succínico e 2,3-butanodiol

Além dos produtos discutidos acima, também foi verificada a produção, pelo isolado 9R, de ácido succínico e de alguns picos que não corresponderam a nenhum dos padrões avaliados. A análise de uma amostra do meio de cultura antes do início dos ensaios revelou que esses picos são relativos a componentes da formulação do meio, provavelmente oriundos do extrato de levedura. Quanto ao succinato, este não apresentou variações consideráveis em sua produção com o aumento da concentração inicial de glicerol de 10 para 40 gL⁻¹, contrariamente ao que ocorre na fermentação de glicose por

E. aerogenes, na qual os títulos de ácido succínico acompanham o aumento da concentração de substrato (CONVERTI e PEREGO, 2002).

Para a fermentação do glicerol empregando culturas mistas ou linhagens de *Enterobacter* ou *E. coli*, são reportados valores baixos ou mesmo a ausência da produção desse ácido (BARBIRATO *et al.*, 1996; MOSCOVIZ *et al.*, 2016; MURARKA *et al.*, 2008). Segundo Murarka e colaboradores (2008), o succinato não é um metabólito essencial para a fermentação do glicerol por *E. coli*. Por outro lado, os mesmos autores afirmam que os efeitos negativos de altas pressões de hidrogênio sobre o crescimento e o metabolismo desse micro-organismo podem estar relacionados ao aumento da síntese de ácido succínico nessas condições. É provável que esse fenômeno não ocorra da mesma forma para linhagens de *Enterobacter*, visto que essas são menos sensíveis a altas pressões parciais de hidrogênio (NAKASHIMADA *et al.*, 2002) e que variações na concentração de succinato não foram verificadas em nossos ensaios.

Outro fato a ser ressaltado sobre o quadro geral de produtos da fermentação do isolado 9R é a ausência de 2,3-butanodiol (2,3-BDO) entre os metabólitos detectados. Dado que o isolado foi classificado, em testes com glicose, como positivo no teste de Voges-Proskauer, era esperado que esse polioliol fosse encontrado durante o ensaio. No entanto, apesar do 2,3-BDO ser um dos produtos majoritários da fermentação de glicose por linhagens de *Enterobacter* (CONVERTI e PEREGO, 2002), Nakashimada e colaboradores (2002), ao analisarem a fermentação de diferentes fontes de carbono por *Enterobacter aerogenes*, observaram que os rendimentos de 2,3-BDO variaram em dependência do substrato, sendo que para a fermentação do glicerol a produção desse álcool foi praticamente nula quando comparada à fermentação da glicose.

4.2.1.6. Consumo de glicerol

Somado às alterações na quantidade dos produtos gerados, a maior concentração inicial de glicerol também reduziu a quantidade de substrato consumido. Como discutido acima, de acordo com a literatura, essas alterações metabólicas podem estar relacionadas a um maior consumo de glicerol e conseqüentes variações (positivas ou negativas) na razão NADH/NAD⁺. No entanto, como pode ser visto na figura 10, apesar das diferenças na quantidade total de substrato consumido, o consumo de glicerol pelo isolado 9R nas três condições foi muito similar nas seis primeiras horas da fermentação, em despeito às diferenças nos produtos apresentados em cada condição.

Essa observação mostra a necessidade de análises mais aprofundadas sobre o direcionamento do fluxo de massa e energia realizado pelos micro-organismos durante a fermentação do glicerol.

4.2.1.7. Alterações do direcionamento de carbono e indicativos de inibição para o isolado 9R

O aumento da concentração inicial de glicerol acarretou na variação não uniforme da concentração dos metabólitos excretados e na diminuição do consumo do substrato, fato que permite supor uma redistribuição do fluxo de carbono em decorrência da disponibilidade, e não diretamente do uso, do glicerol. A fim de verificar como a concentração inicial de glicerol influenciou nos fluxos metabólicos, foram adotadas três abordagens: o estabelecimento de uma equação para o balanço de massa ao término da fermentação, a modelagem do consumo de substrato e crescimento da biomassa e a análise do direcionamento do substrato consumido para cada produto em diferentes intervalos.

Para a montagem da equação de balanço de massa (Materiais e Métodos, Seção 3.6.3) foram considerados os produtos encontrados após 24 horas de fermentação e também o dióxido de carbono. Apesar do CO₂ não ter sido quantificado em nossos ensaios devido a limitações do sistema cromatográfico, a atribuição de coeficientes estequiométricos para os substratos e os produtos da reação nos permite estimar a quantidade de CO₂ produzido. Outra consideração para a escolha dos fatores da equação foi de que o extrato de levedura pode servir como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento dos micro-organismos. Em trabalhos futuros, essa hipótese será verificada experimentalmente por análises de carbono orgânico total e conteúdo de nitrogênio.

De maneira simplificada, a equação proposta nos serviu, além de auxiliar na análise do fluxo de carbono, para corrigir os coeficientes estequiométricos da conversão de substratos a produtos, considerando o consumo do extrato de levedura, e para estimar a quantidade de dióxido de carbono liberado. Os coeficientes estequiométricos de cada componente do sistema podem ser vistos na tabela 10. Como visto, para a condição G5 alguns dos coeficientes apresentam valor negativo, fato que, apesar de solucionar a equação, não tem sentido físico e, desse modo, inviabiliza a inclusão desse ensaio nessa etapa da discussão. Provavelmente, a impossibilidade de adequação de alguns dos coeficientes nessa situação está relacionada à baixa quantidade de nitrogênio adicionada

ao meio, o que pode ser visto pelo valor negativo atribuído ao coeficiente a (relativo à amônia) na condição G5.

Para os metabólitos analisados por cromatografia, esses coeficientes apenas reiteram o que foi mostrado na tabela 9 para os rendimentos dos diferentes produtos. Por outro lado, a comparação do coeficiente b entre as duas condições (G10 e G40), indica que o consumo de extrato de levedura para cada mol de glicerol consumido foi aproximadamente 7 vezes maior na condição G40 em relação à condição G10. Quando considerada a redução de 55% no consumo de glicerol observada para a condição G40 (tabela 8), esse maior consumo de extrato de levedura, somado ao maior direcionamento de substrato para a geração de biomassa nessa condição (representada pelo coeficiente c), poderia justificar a diminuição de apenas 26% na massa de células em relação a condição G10 (Tabela 9). Além disso, a preferência pelo extrato de levedura na condição G40 permite a suposição de algum tipo de efeito inibitório exercido pelo glicerol ou da necessidade de algum micronutriente que auxiliaria no consumo do mesmo quando na maior concentração testada nessa etapa. Ademais, esse maior consumo relativo de extrato de levedura pode ter levado à extinção precoce da fonte de nitrogênio no meio e ter sido uma das causas do menor consumo de glicerol nessa condição. A maior razão C/N (de 22,20) na condição G40 também pode ter sido outro fator que influenciou negativamente o desempenho do isolado 9R nessa situação. No entanto, experimentos adicionais devem ser realizados para confirmar qualquer uma das suposições levantadas, visto que a literatura apresenta uma ampla faixa para os valores ótimos da razão carbono/nitrogênio, variando de 5 a 200, para processos de digestão anaeróbia (KOTHARI *et al.*, 2017).

O efeito inibitório da alta concentração de glicerol sob o isolado 9R também pode ser verificado quando analisados os dados de modelagem apresentados na figura 11 e na tabela 11. Como pode ser visto na figura 11, o modelo de Monod se adequou satisfatoriamente, tanto ao consumo de substrato quanto ao crescimento da biomassa nas condições G5 (R^2 de 0,950 e 0,970 para consumo de substrato e crescimento celular, respectivamente) e G10 (R^2 de 0,908 e 0,931 para consumo de substrato e crescimento celular, respectivamente). No entanto, o mesmo não ocorreu para os dados da condição G40 (Figura 11). Somadas à interrupção do consumo de substrato verificada no ensaio G40, a falta de ajuste e a alteração dos valores dos parâmetros da equação de Monod (tabela 11) confirmam a ocorrência de algum tipo de inibição nessa condição.

Tabela 10. Coeficientes estequiométricos de substratos e produtos para as condições G5, G14 e G40 para o isolado 9R.

Coeficiente Estequiométrico	Ensaio		
	G5	G14	G40
a (Amônia)	-0.1990	0.0408	0.0050
b (Ext. levedura)	1.8611	0.0567	0.3940
c (Biomassa)	0.4695	0.2019	0.2878
d (Hidrogênio)	0.8363	0.7185	0.4084
e (CO ₂)	1.0408	0.7102	0.4404
f (Água)	-0.4644	0.2203	0.2783
g (Etanol)	1.0586	0.7554	0.4567
h (1,3-PDO)	0.2185	0.1119	0.3255
i (Ác. succínico)	0.0436	0.0230	0.0341
j (Ác. lático)	0.0935	0.0536	0.1942
k (Ác. acético)	0.0615	0.0227	0.0285

Vários modelos que consideram a inibição por substrato (DUTTA *et al.*, 2015) foram testados para os dados desse ensaio, entre eles os modelos de Moser, Tan, Luong e Haldane, e os resultados da modelagem pela equação de Luong são mostrados na figura 11. Infelizmente, assim como para o modelo de Luong, os demais modelos testados não se adequaram aos dados. Provavelmente, isso ocorreu devido a efeitos combinados de inibição exercidos não só pelo substrato, mas também pelos produtos da fermentação, como já demonstrado por Vlysidis e colaboradores (2011). Os autores, ao trabalharem com um sistema de conversão de glicerol a ácido succínico empregando células de *Actinobacillus succinogenes*, verificaram a necessidade do desenvolvimento de um modelo que abrange ambos os tipos de inibição.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos encontrados para os ensaios pelo modelo de Monod (para G5 e G10) e pelo Modelo de Luong (para G40).

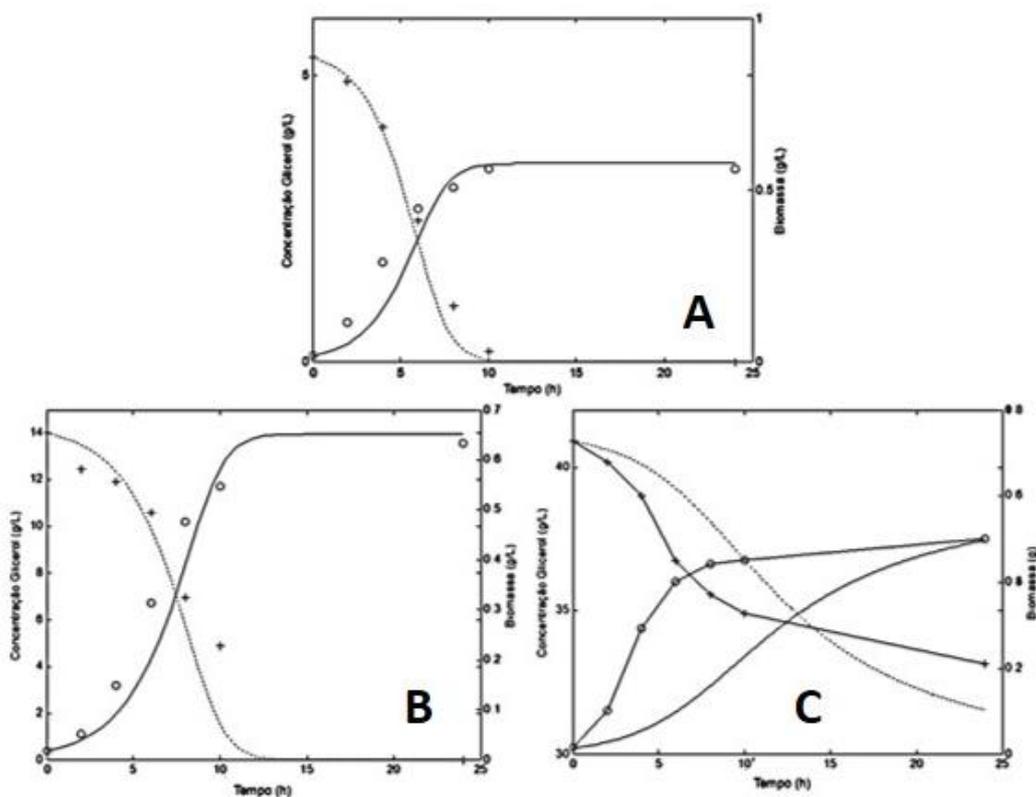
Parâmetros cinéticos	Ensaio				
	G5		G10		G40
μ_{\max} (h^{-1})	1,0801		0,648		3,975
K_s (gL^{-1})	4,7491		7,422		34,977
S_m	–		–		29,149
	Substrato	Isolado	Substrato	Isolado	
		9R		9R	
R^2	0,950	0,970	0,908	0,931	0,421
RMSE	0,560	0,0481	1,52	0,061	–
NRMSE (%)	10,50	8,840	10,8	9,6	–

Onde: μ_{\max} : velocidade específica de crescimento máximo; K_s : constante de saturação; S_m : concentração inibitória; R^2 : coeficiente de correlação; RMSE: raiz quadrada do erro médio; NRMSE: raiz quadrada normalizada do erro médio.

Como demonstrado pela modelagem de nosso sistema nas três diferentes condições, provavelmente o glicerol em altas concentrações exerce algum tipo de inibição sobre o isolado em análise. Baseado no que é exposto na literatura, esse fenômeno poderia ser atribuído principalmente: às variações da razão NADH/NAD^+ ocasionadas pela maior quantidade de glicerol que seria consumida nessa situação – atrapalhando a via oxidativa – ou a produtos (ou intermediários) tóxicos gerados durante o consumo do substrato. Ambas as situações citadas (alteração do balanço redox e produção de compostos inibitórios) podem interferir na distribuição do fluxo de carbono durante a fermentação e, portanto, esse parâmetro também foi analisado e os dados de rendimentos instantâneos para os diferentes intervalos da fermentação são mostrados na figura 12.

A análise da figura 12 revela alguns pontos em comum entre as três condições, como o acentuado direcionamento de carbono para a formação de biomassa nas primeiras 4 horas da fermentação e o rendimento muito similar para acetato, formiato e etanol no intervalo de 0 a 2 horas. Os rendimentos tanto do acetato quanto do formiato diminuíram no intervalo de 2 a 4 horas, exceto para a condição G10, para a qual houve aumento do fluxo de carbono para a geração de ácido fórmico, antes da queda no próximo intervalo. Interessantemente, na condição G10, o aumento do rendimento do formiato foi acompanhado pelo aumento do rendimento de etanol.

Figura 11. Modelagem dos dados de crescimento microbiano e consumo de glicerol nas condições (A) G5, (B) G10 e (C) G40. \circ – Dados experimentais do crescimento da biomassa; $+$ – dados experimentais do consumo de glicerol; linha contínua – modelagem do crescimento da biomassa; linha tracejada – modelagem do consumo de glicerol. (A) e (B) dados modelados pelo modelo de Monod e (C) dados modelados pelo modelo de Luong.



A partir das 4 horas até o final dos ensaios, também foi comum para todos a similaridade entre os perfis das curvas de etanol e H_2 , indicando uma correlação entre a produção dos dois compostos nas situações testadas. Quanto ao acetato, apesar de ser consumido junto com o substrato ao final das 24 horas (como indicado pelos valores de rendimento negativos), seu rendimento apresentou uma elevação entre 6 e 10 horas para as condições G5 e G10, enquanto que para a condição G40 esse foi reduzido continuamente a partir das 4 horas de fermentação. Essa diferença pode estar relacionada ao maior rendimento de lactato observado para esse ponto na condição G40 e se mostra como uma das principais diferenças entre esse ensaio e os demais. Outra diferença é o maior direcionamento do fluxo de carbono para a produção de 1,3-PDO na condição G40 durante todo o tempo de fermentação.

As diferenças no fluxo de carbono entre as condições de consumo completo do substrato (G5 e G10) e a condição G40 se tornam mais evidentes quando comparada a razão entre os rendimentos dos produtos derivados de acetil-CoA e dos produtos prévios a formação desse intermediário (Figura 12). Pode-se notar que para as condições G5 e G10 o isolado 9R direcionou o fluxo de carbono, desde o início da fermentação, preferencialmente para produtos derivados de acetil-CoA em relação aos produtos originados antes da formação desse intermediário, contrariamente ao que foi observado para a condição G40.

Considerando que o consumo de glicerol até as 6 horas de fermentação foi muito similar para as três condições testadas (Figura 10), é razoável supor que as diferenças no metabolismo microbiano sejam uma resposta prévia ao consumo, ou pelo menos não diretamente relacionada com a quantidade de glicerol consumida, nas primeiras horas da fermentação. Algumas suposições sobre os fatores fisiológicos e moleculares que poderiam justificar o que foi observado são discutidas abaixo.

Barbirato e colaboradores (1996), analisando aspectos fisiológicos do consumo de glicerol por *E. agglomerans*, observaram que mantendo uma concentração inicial fixa de substrato ($66,3 \text{ gL}^{-1}$) e alterando o pH do meio, nenhuma alteração no consumo da fonte de carbono foi notada nas primeiras 8 horas de fermentação. Porém, o consumo final após 32 horas variou entre 10 e 100% do substrato, em pH 6 e 8, respectivamente. Análises do pool de nucleotídeos e da atividade das enzimas da via redutiva e das primeiras enzimas da via oxidativa mostraram que nenhuma delas estaria ativa no início da fermentação e que diferenças no pH inicial influenciariam na formação de metabólitos por meio da alteração da atividade dessas enzimas.

Além disso, alguns autores mostram que dependendo da linhagem ou do meio utilizado, o pH influencia de maneira contrária a atividade de enzimas que quebram glicerol e que geram hidrogênio (DHARMADI *et al.*, 2006; ROSSMANN *et al.*, 1991). Essa diferença favoreceria a geração de outros produtos antes da formação de H_2 , os quais poderiam inibir a ação do isolado frente ao glicerol.

Outra possibilidade é que a determinação das vias de dissimilação do substrato tenha sido induzida pela percepção, por meio de receptores, da concentração de glicerol no meio e consequente regulação da expressão ou atividade das enzimas envolvidas no metabolismo desse carboidrato.

Oosawa e Imae (1983, 1984), realizando ensaios de quimiotaxia, observaram alterações do comportamento de células de *E. coli* em respostas a altas concentrações de glicerol. Essas alterações de comportamento foram relacionadas aos receptores de membrana MCP (*Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins*) indicando que esse carboidrato pode induzir alterações em processos celulares previamente à sua internalização. Em trabalhos posteriores do mesmo grupo, Li e Adler (1993) observaram um efeito repelente do glicerol sobre *E. coli* quando em contato com a mesma concentração de glicerol empregada na condição G40.

Além disso, foi demonstrado que mutantes desprovidos dos genes *tsr*, *tar*, *trg* e *tap* (que codificam para os receptores MCP) não apresentam respostas táticas a altas concentrações de glicerol. Zhulin et al. (1997) estenderam essas observações para *Salmonella typhimurium*. Além disso, demonstraram que tanto para *E. coli* quanto para *S. typhimurium*, baixas concentrações de glicerol exercem efeito quimioatraente e causam alterações no transporte de elétrons e no potencial de membrana, ambos os efeitos sendo mediados por outra proteína quimiotática CheB.

Desse modo, considerando o que é exposto na literatura e os achados de nosso trabalho (*i.e.* diferenças no direcionamento de carbono mesmo com o consumo similar de glicerol) pode-se supor que a definição de quais produtos serão formados com a utilização do glicerol ocorra antes de seu consumo, sendo determinada por sinais percebidos por receptores externos ou internos.

Na enterobactéria *Klebsiella pneumoniae*, os genes que codificam tanto para as duas enzimas da via redutiva (glicerol desidratase e 1,3-propanodiol oxidorreductase) quanto as duas primeiras enzimas da via oxidativa (glicerol desidrogenase e dihidroxiacetona quinase) do glicerol estão localizadas no chamado regulon *dha*, o qual codifica ainda, por meio do gene *dhaR*, a enzima DhaR com função regulatória para esse grupo de genes (SUN, J. *et al.*, 2003).

Sun e colaboradores (2003), em um estudo comparativo da estrutura de genes *dhaR* em diferentes bactérias, encontraram sequências correspondentes a vários domínios envolvidos em processos regulatórios e de transdução de sinal, entre eles os domínios GAF, domínio de interação com o fator σ^{54} , histidina HTH_8 e PAS. Interessantemente,

o domínio PAS está envolvido com o sensoriamento de luz, níveis internos de oxigênio, energia e potencial redox, sendo também atribuída a esse domínio a capacidade de interagir com diferentes cofatores, inclusive o glicerol (MÖGLICH *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2003; TAYLOR e ZHULIN, 1999).

De acordo com Möglich e colaboradores (2009), além de servirem como cofatores, em alguns casos essas moléculas são o sinal que desencadeia a resposta da proteína. Além disso, segundo Taylor e Zhulin (1999), alguns sensores contendo o domínio PAS são responsivos a alterações na concentração de glicerol e outras fontes de carbono. Logicamente, inúmeros experimentos ainda são necessários para construir essa hipótese, mas é possível que a maior quantidade de glicerol no meio possa ser percebida pela proteína DhaR, acarretando na preferência pela via reductiva em detrimento à via oxidativa, visto que, como demonstrado por Zheng e colaboradores (2006), essa proteína regulatória pode exercer efeitos distintos sobre a expressão dos genes do regulon *dha*.

Visto que não existem trabalhos analisando a conversão de glicerol a hidrogênio por bactérias com alguma modificação nos genes citados acima e considerando a influência dos mesmos sobre o comportamento de bactérias na presença de glicerol, estes podem ser considerados como alvos potenciais para otimizar a produção de H₂ a partir desse substrato.

Esse tópico encerra a etapa de seleção e análise do metabolismo de um isolado capaz de converter glicerol a hidrogênio e etanol. Desse modo, o isolado *Enterobacter* sp. 9R foi empregado em análises posteriores sobre os efeitos de fatores ambientais sobre seu metabolismo.

4.3. Avaliação dos efeitos de alterações nos parâmetros ambientais sobre o metabolismo de glicerol pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R

Após a análise das rotas metabólicas do isolado *Enterobacter* sp. 9R em diferentes concentrações iniciais de glicerol, foram realizados ensaios visando a otimização do consumo de glicerol e sua conversão a H₂ e etanol. Para tanto, a influência de vários parâmetros (concentração de substrato no inóculo; adição de impurezas presentes no glicerol bruto; pH; aeração; e concentração celular no inóculo) sobre o comportamento do isolado foram analisados.

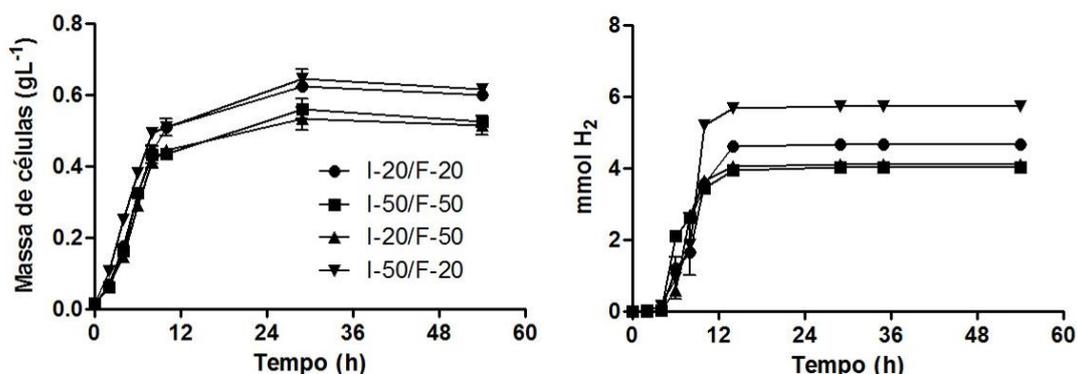
4.3.1. Avaliação da possibilidade de pré-adaptação do metabolismo do isolado 9R induzida pela concentração de substrato no pré-inóculo

O primeiro parâmetro a ser analisado foi a influência da concentração de glicerol no frasco de pré-inóculo sobre o desempenho do isolado, visando responder à hipótese levantada no tópico 4.3, acerca do pré-condicionamento das vias metabólicas durante a etapa de pré-inóculo. Para isso, em ensaios separados as concentrações de glicerol no pré-inóculo foram definidas como 20 ou 50 gL⁻¹. Após o crescimento do micro-organismo em uma das duas condições, o mesmo foi inoculado em frascos com diferentes concentrações de glicerol. As diferentes condições testadas foram nomeadas como: I-20/F-20 (inóculo a 20 gL⁻¹/fermentação a 20 gL⁻¹); I-50/F-50 (inóculo a 50 gL⁻¹/fermentação a 50 gL⁻¹); I-20/F-50 (inóculo a 20 gL⁻¹/fermentação a 50 gL⁻¹) e I-50/F-20 (inóculo a 50 gL⁻¹/fermentação a 20 gL⁻¹).

A figura 13 mostra a curva de crescimento do isolado 9R nas diferentes condições. Como visto, independentemente da concentração do pré-inóculo, o crescimento microbiano foi determinado pela concentração de glicerol presente no ensaio de fermentação (F), de modo que os maiores valores de massa de células foram encontrados nas condições I-20/F-20 e I-50/F-20. A indiferença para o crescimento do isolado em relação à variação de concentração de substrato entre inóculo e ensaio reforça a inexistência de um efeito de choque osmótico devido a altas concentrações de glicerol, como proposto por Reungsang e colaboradores (2013).

Por outro lado, a produção de H₂ foi influenciada tanto pela concentração de glicerol do pré-inóculo quanto pela concentração de glicerol do ensaio de fermentação (Figura 13). Mais uma vez, os ensaios com maior concentração de glicerol I-20/F-50 e I-50/F-50 apresentaram a menor produção de H₂ (4,10 e 4,04, mmol H₂, respectivamente). O ensaio I-20/F-20 apresentou uma produção de 4,67 mmol H₂ (equivalente a 1,15 vezes o produzido nas condições I-20/F-50 e I-50/F-50). Por outro lado, na condição I-50/F-20 foram produzidos 5,73 mmol H₂ correspondentes a 1,14 vezes o encontrado nas condições I-20/F-50 e I-50/F-50 e 1,23 vezes a produção na condição I-20/F-20.

Figura 13. Crescimento (esquerda) e produção de hidrogênio (direita) pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R sob condições variadas de concentrações iniciais de glicerol para inóculos e ensaios de fermentação.

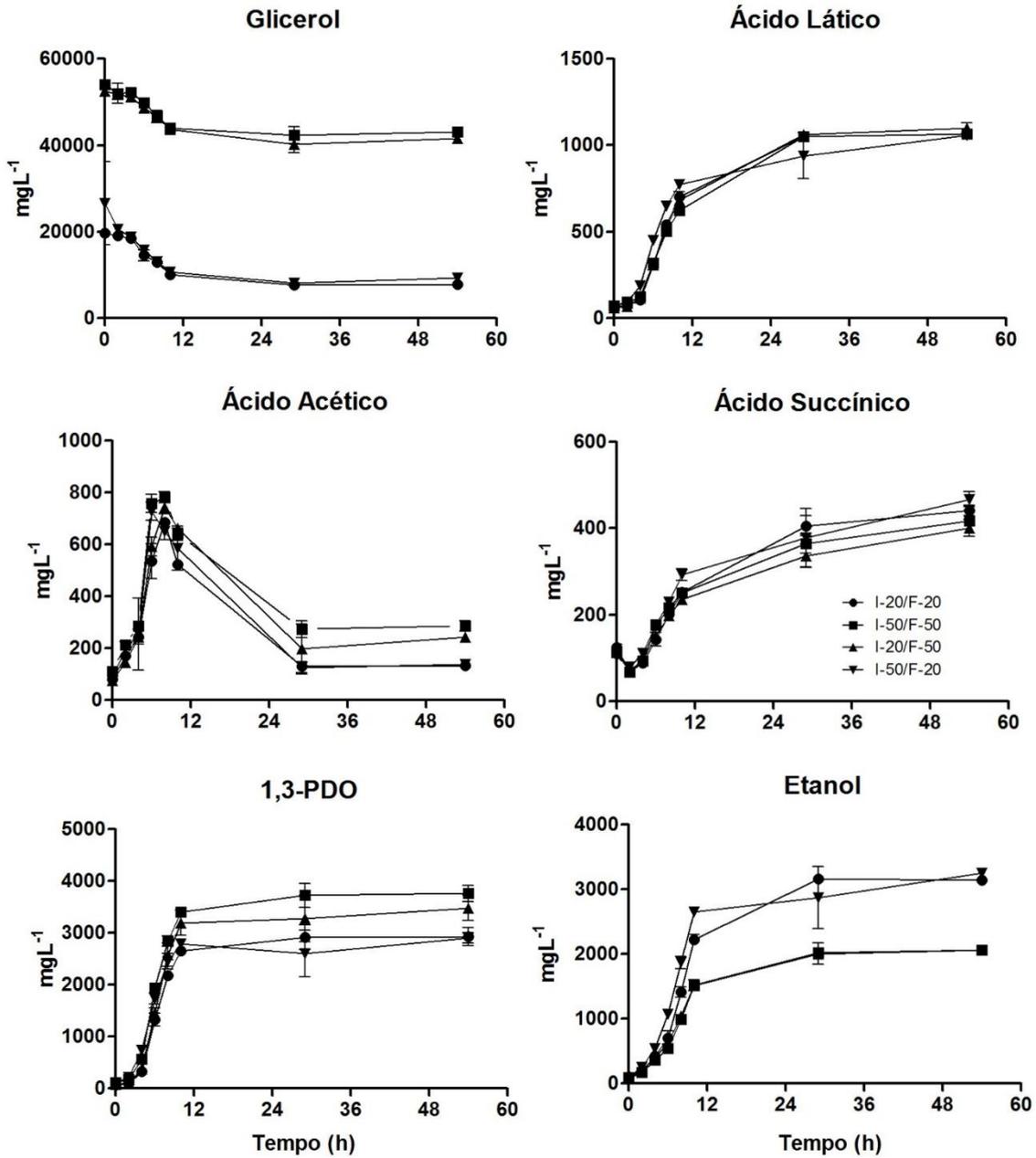


A maior produção de H₂ na condição I-50/F-20 poderia estar relacionada com uma pré-adaptação das rotas metabólicas do isolado para o consumo de glicerol em maiores quantidades, no entanto, como pode ser visto na figura 14, tanto o consumo total quanto a velocidade de consumo de substrato foram muito similares entre as condições I-50/F-20 e I-20/F-20. A análise dos metabólitos solúveis (Figura 14) foi empregada no intuito de buscar alterações metabólicas correlacionadas à maior produção de H₂ encontrada na condição I-50/F-20.

Entretanto, a análise dos dados mostrou que – da mesma forma que ocorreu para o crescimento microbiano e para o consumo de substrato – o perfil de produção de metabólitos foi dependente apenas da concentração de glicerol presente no ensaio de fermentação, sem influência sendo exercida pela quantidade de substrato presente no frasco de pré-inóculo. Com base nos resultados de crescimento, consumo de substrato e produção de metabólitos solúveis, pode-se supor que a diferença na produção de hidrogênio seja proveniente de alguma falha na retenção do gás durante os ensaios. A probabilidade da conversão de algum metabólito interno a H₂ nas células da condição I-50/F-20 pode ser descartada, visto que a quantidade de células empregada no inóculo não seria suficiente para explicar a magnitude da diferença na produção de H₂ apresentada.

Desse modo, esses resultados rejeitam a hipótese de pré-adaptação das vias metabólicas do isolado 9R devido à concentração de substrato no pré-inóculo.

Figura 14. Curvas de concentração dos metabólitos solúveis pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R sob condições variadas de concentrações iniciais de glicerol para inóculos e ensaios de fermentação.



4.3.2. Influência do pH inicial e da oxigenação durante a conversão do glicerol pelo isolado 9R

Como já demonstrado na literatura, o pH pode influenciar de maneira significativa a determinação das vias metabólicas ativas durante o consumo de qualquer substrato, definindo até se o consumo ocorrerá ou não. Isso ocorre porque o pH exerce influência direta sobre a atividade de várias enzimas, determinando, desse modo, as transformações a que o substrato seria submetido, influenciando de maneira direta nos produtos formados durante a fermentação (DHARMADI *et al.*, 2006; JAWED *et al.*, 2016; KHANNA *et al.*, 2011; PI *et al.*, 2016; ROSSMANN; *et al.*, 1991; SKONIECZNY e YARGEAU, 2009; TRAN *et al.*, 2014). Como mostrado por Jawed e colaboradores (2016), ao trabalharem com uma linhagem de *Klebsiella* sp. superexpressando os genes *fhlA* e *pncB*, mesmo com as intervenções genéticas, os melhores resultados de produção de H₂ foram obtidos apenas após a determinação do melhor pH para a cepa criada.

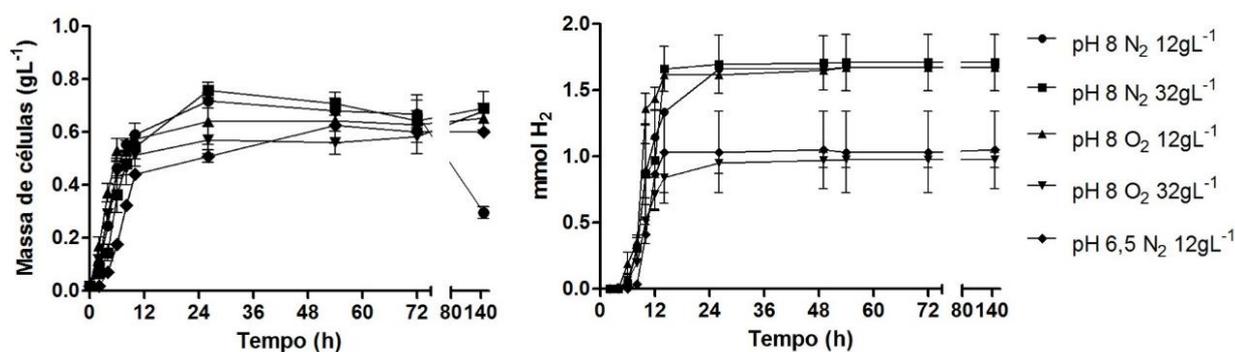
Além do pH, outro fator ambiental que pode determinar qual a rota de conservação de energia empregada pelos micro-organismos é a concentração de O₂. Segundo Wu e colabores (2001), ao comparar ensaios de consumo anaeróbio e aeróbio de glicose por uma linhagem de *Enterobacter* sp., a presença de oxigênio pode exercer influência sobre o pH do meio. Sob condições de aerobiose, o isolado causou reversão na queda do pH após 18 horas de ensaio, fato não observado para condições de ausência de O₂. Segundo os autores, essa elevação do pH poderia ser efeito da oxidação de ácidos orgânicos decorrente da respiração dos mesmos.

Considerando as informações supracitadas, com o intuito de averiguar a possibilidade de otimização da bioconversão do glicerol pelo isolado 9R, esse foi submetido a ensaios com diferentes valores de pH na presença ou ausência de oxigênio em diferentes concentrações iniciais de glicerol. Como mostrado na figura 15, a alteração do pH de 6,5 para 8,0 foi benéfica tanto para o crescimento quanto para a produção de H₂ pelo isolado em ambas as concentrações testadas (12,00 e 32,00 gL⁻¹). Esses dados contrariam o valor de pH ótimo de 6,5 encontrado por Khanna e colaboradores (2011) para a conversão de glicose a H₂ pela linhagem IIT-BT 08 de *Enterobacter cloacae*. Apesar das diferenças entre substrato e linhagem empregada, outros autores, ao estudar diferentes enterobactérias e diferentes substratos também reportaram valores ótimos de pH próximos de 6,5 (LIN e LAY, 2005; WEI *et al.*, 2010).

Para a fermentação do glicerol, vários trabalhos também mostram o uso de valores de pH levemente ácidos (entre 6,0 e 7,0) para a produção de variados compostos, sendo

que muitos deles empregam linhagens do gênero *Enterobacter* (HAN, J. *et al.*, 2012; JAWED *et al.*, 2016; LEE, S. J. *et al.*, 2017; NAKASHIMADA *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2018; SEIFERT *et al.*, 2009). Além disso, para outros substratos, o crescimento de linhagens de *Enterobacter cloacae* é reportado em uma faixa de pH entre 4,5 e 10 (BEVILACQUA *et al.*, 2010) e, segundo Tanisho e colaboradores (1998), podem ocorrer grandes diferenças entre o pH ótimo de crescimento e o pH ótimo para a produção de H₂ por linhagens de *Enterobacter aerogenes*.

Figura 15. Crescimento (esquerda) e produção de hidrogênio (direita) pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R sob condições variadas de pH, oxigenação e concentrações iniciais de glicerol.



Quanto ao crescimento do isolado, esse foi influenciado positivamente pela elevação do pH, enquanto que a presença de oxigênio não exerceu influência, exceto para o ensaio a pH 8 com 12,00 g L⁻¹ de glicerol inicial. Para essa condição, a quantidade de células foi similar a dos outros ensaios até o tempo de 72 h. No entanto, ao final do ensaio (140 h), a massa de células estimada caiu de 0,67 g L⁻¹ para 0,30 g L⁻¹. A análise dos meios após o término dos ensaios permitiu verificar a ocorrência de floculação no frasco correspondente ao ensaio com pH 8,0; 12,00 g L⁻¹ Glicerol e oxigenação (resultado não mostrado).

Esse fato justifica a queda na massa de células, visto que essa é estimada por densidade óptica e apresenta novas oportunidades de estudo sobre o isolado 9R. No caso de processos em reatores contínuos, a capacidade de floculação do isolado pode ser explorada para auxiliar na separação entre células e produtos solúveis. Além disso, visto que essa capacidade é proporcionada pela produção de substâncias poliméricas extracelulares (YU *et al.*, 2016), essas também podem facilitar abordagens de trabalho

com imobilização de células, sendo que, pelo que indicam os resultados apresentados na figura 15, a produção desses polímeros poderia ser regulada pela oxigenação dos reatores.

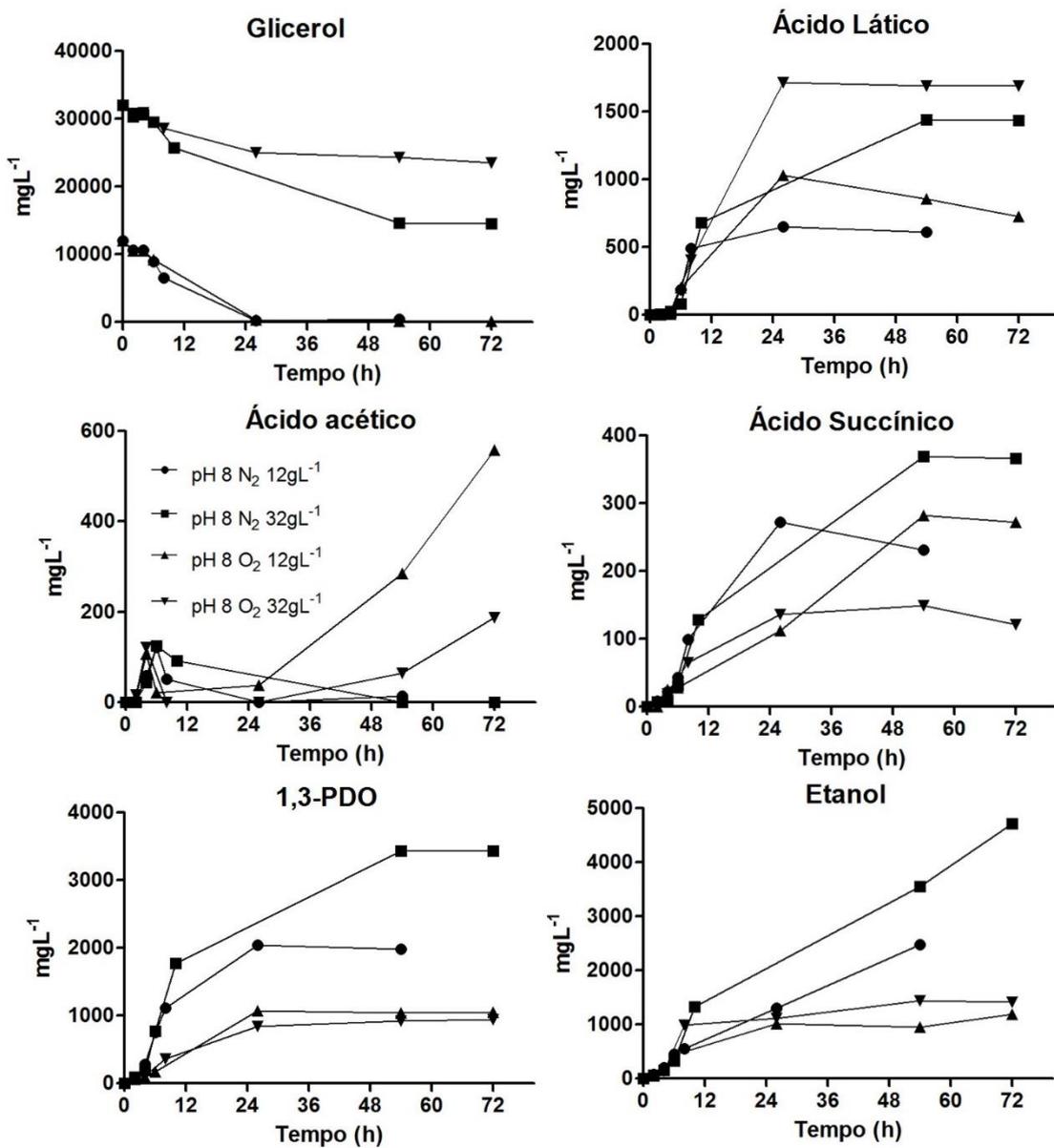
Ainda uma outra alternativa de investigação seria a produção de biofloculantes, compostos muito estudados nos últimos anos com o objetivo de substituir floculantes sintéticos usados em tratamentos de águas residuais (PRASERTSAN *et al.*, 2006; SHENG e YU, 2006a; SHENG *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2014; WANG, Z. *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2016).

Por outro lado, em pH 8, a presença de oxigênio não influenciou na produção de H₂ para a concentração de glicerol inicial de 12,00 gL⁻¹ e diminuiu em 76% a quantidade de H₂ produzido quando o glicerol inicial foi fixado a 32,00 gL⁻¹. Tais dados indicam que a presença de oxigênio na concentração testada causou alterações no metabolismo do isolado, as quais provavelmente direcionaram o fluxo de elétrons para a geração de compostos mais oxidados que o H₂.

A análise dos metabólitos solúveis (Figura 16) corrobora o que foi encontrado para a produção de hidrogênio, ou seja, nas condições de aeração o isolado produziu menores quantidades de compostos reduzidos (etanol e 1,3-PDO), sendo que o principal escape para o excesso de equivalentes redutores foi o ácido lático. Como visto, houve uma produção considerável desse ácido nas condições de aeração até as 26 horas, sendo que a condição pH 8,0; 32,00 gL⁻¹ Glicerol e oxigenação apresentou as maiores concentrações. Esses dados mostram que a regulação da enzima lactato desidrogenase de *Enterobacter* sp. 9R segue o padrão encontrado para outras enterobactérias, de modo que, mesmo na presença de oxigênio a enzima é ativada em situações que elevam a quantidade de piruvato e NADH, de acordo com o descrito por Clark (1989).

Além disso, as maiores concentrações de ácido acético foram encontradas para o ensaio com pH 8,0; 12,00 gL⁻¹ GI e oxigenação, seguido do ensaio com pH 8,0; 32,00 gL⁻¹ GI e oxigenação. Interessantemente, a produção de ácido acético teve sua taxa aumentada a partir das 26 horas de ensaio, fato que coincidiu com o decréscimo da concentração de ácido lático nas duas condições. Essa relação entre o consumo de ácido lático e a produção de ácido acético foi mais evidente na condição pH 8,0; 12,00 gL⁻¹ GI e oxigenação; para a qual a exaustão do substrato também ocorreu no ponto de 26 horas. O consumo de lactato, juntamente ou não com a produção de acetato, é reportado na literatura para diferentes gêneros de bactérias e é relacionado com a presença de oxigênio (BELENGUER *et al.*, 2011; CLARK, 1989; RAMEL *et al.*, 2015).

Figura 16. Curvas de concentração dos metabólitos presentes no meio de fermentação do isolado *Enterobacter* sp. 9R sob condições variadas de pH, oxigenação e concentrações iniciais de glicerol.



Apesar da maior capacidade de oxidação do substrato na presença de oxigênio, os dados de consumo de glicerol indicaram que o isolado deu preferência à obtenção de energia por meio da baixa produção de metabólitos reduzidos e da oxidação de ácido láctico a acético, visto que a presença de oxigênio não aumentou o consumo de glicerol. Pelo contrário, para o ensaio pH 8,0; 32,00 gL⁻¹ GI e oxigenação, a presença de oxigênio foi prejudicial ao consumo de substrato, o qual atingiu apenas 48 % do glicerol consumido na condição pH 8,0; 32,00 gL⁻¹ GI e sem oxigenação.

Isso se deve, provavelmente, à efeitos relacionados ao ácido láctico, o qual seria o principal metabólito responsável pela inibição por produtos na presença de altas concentrações de glicerol, pois na condição pH 8,0; 32,00 gL⁻¹ GI e oxigenação houve uma menor produção de 1,3-PDO em comparação à mesma condição sem oxigenação. Tendo em conta a toxicidade apresentada pelo ácido láctico para o isolado 9R, a alteração do metabolismo de lactato e acetato causada pela presença de O₂ pode ser uma alternativa para a retirada do ácido láctico do meio de cultura e pode ser estudada em trabalhos posteriores.

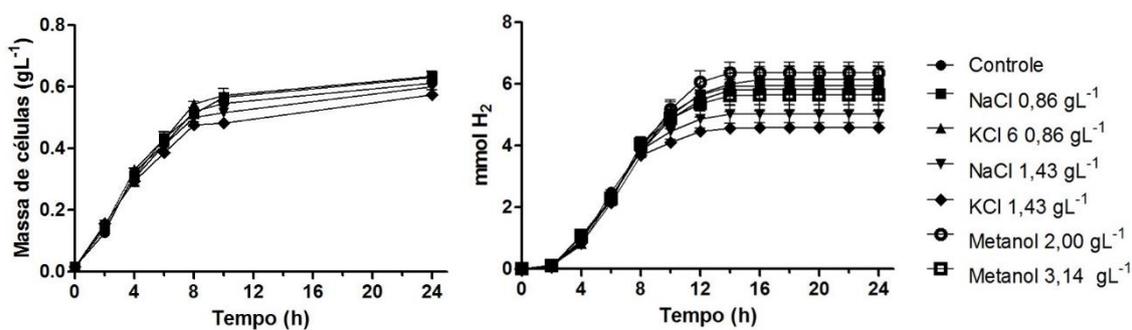
4.3.3. Influência de impurezas do glicerol bruto sobre a conversão do glicerol a H₂ e subprodutos

Outro fator que também pode interferir na conversão do glicerol bruto a H₂ são contaminantes tanto originados durante o processo de transesterificação quanto oriundos da matéria-prima empregada para a produção de biodiesel. Entre esses estão: metanol, sais, sabão, ésteres alquílicos de ácidos graxos, glicerídeos, ácidos graxos livres e cinzas. Vários trabalhos encontrados na literatura investigam os efeitos dessas impurezas sobre a produção de diferentes compostos por meio da fermentação do glicerol (CAVALHEIRO *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2010; MOTHEs *et al.*, 2007; RYWINSKA *et al.*, 2016; SARMA; *et al.*, 2013; VENKATARAMANAN *et al.*, 2012).

No entanto, apesar de alguns trabalhos com diferentes linhagens de *E. aerogenes* compararem a fermentação de glicerol bruto e glicerol puro (ITO *et al.*, 2005; NWACHUKWU, R. *et al.*, 2012), as análises são voltadas apenas para o produto de interesse e a capacidade de consumo do substrato e crescimento do micro-organismo, não sendo dada atenção às variações na produção de outros metabólitos. Porém, da mesma forma que para altas concentrações de glicerol, o entendimento de alterações no metabolismo decorrentes da adição de impurezas ao meio fermentativo pode auxiliar na otimização das condições do processo para a obtenção do produto alvo.

Desse modo, o isolado 9R foi avaliado durante a fermentação do glicerol puro a 10 gL^{-1} em diferentes ensaios contendo alguns dos principais contaminantes presentes no glicerol residual em diferentes concentrações. As concentrações escolhidas foram baseadas nos valores empregados para a confecção da tabela 1 (apresentada na revisão bibliográfica), e representam o valor médio e o valor mais alto encontrado para cada contaminante, considerando a concentração média de glicerol de 700 gL^{-1} e sua diluição para 10 gL^{-1} . A figura 17 apresenta os valores encontrados para o crescimento microbiano e a produção de H_2 .

Figura 17. Crescimento da biomassa (esquerda) e produção de H_2 (direita) pelo isolado 9R na presença de impurezas em diferentes concentrações.



Como visto, ao final das 24 horas de ensaio pôde-se perceber que a adição de impurezas interferiu de alguma forma nos resultados finais da fermentação do glicerol, sendo esses efeitos mais leves para a geração de biomassa e mais pronunciados para a produção máxima de H_2 , principalmente ao final da fase exponencial de produção. De maneira geral, a presença de sais não influenciou enquanto a adição de metanol diminuiu levemente o crescimento do 9R.

Segundo Sarma e colaboradores (2013b), a adição de cloreto de sódio ao meio pode melhorar os resultados da fermentação do glicerol auxiliando na manutenção do balanço osmótico celular e no tamponamento do sistema, devido à formação de sais de ácidos orgânicos. No entanto, tanto para o KCl quanto para o NaCl não foram observadas alterações consideráveis no crescimento e na produção de H_2 . Como exemplo, para o NaCl na concentração de $1,43 \text{ gL}^{-1}$, o aumento percentual no crescimento de apenas 6% enquanto a elevação na quantidade de H_2 não ultrapassou os 4%.

Ao contrário das diferenças mínimas ocasionadas pelos sais, a inclusão do metanol ao meio chegou a causar, na maior concentração adicionada, uma diminuição de aproximadamente 26% na produção de H_2 , muito superior do que a inibição causada ao

crescimento microbiano (de aproximadamente 6 %). O efeito negativo do metanol provavelmente está relacionado aos efeitos tóxicos causados por esse álcool. Tal toxicidade pode causar danos às células principalmente de duas formas: ação direta sobre a membrana celular – interferindo em sua permeabilidade ou na função de determinadas proteínas – ou devido à geração de formaldeído após a internalização e dissimilação do metanol (PATRA *et al.*, 2006; PLUSCHKELL e FLICKINGER, 2002). Como as análises cromatográficas mostraram que não houve o consumo de metanol nos dois ensaios em que foi adicionado (dados não mostrados), é provável que, para o nosso isolado, os efeitos deletérios do álcool foram causados por distúrbios na membrana celular. Segundo Patra e colaboradores (PATRA *et al.*, 2006), a interação entre álcoois de cadeia curta e a superfície da membrana celular pode alterar a estrutura dessa e modificar a conformação de proteínas de membrana, como canais responsáveis pelo transporte de água e íons, interferindo na homeostase celular.

Curiosamente, assim como verificado para os ensaios variando a concentração inicial de glicerol, tanto o crescimento dos micro-organismos quanto a produção de H₂ não apresentaram diferenças em relação ao controle no início da fermentação (entre 8 a 10 horas de ensaio). Ao que parece, as alterações causadas pelos contaminantes influenciaram o desempenho do isolado apenas próximo da fase estacionária.

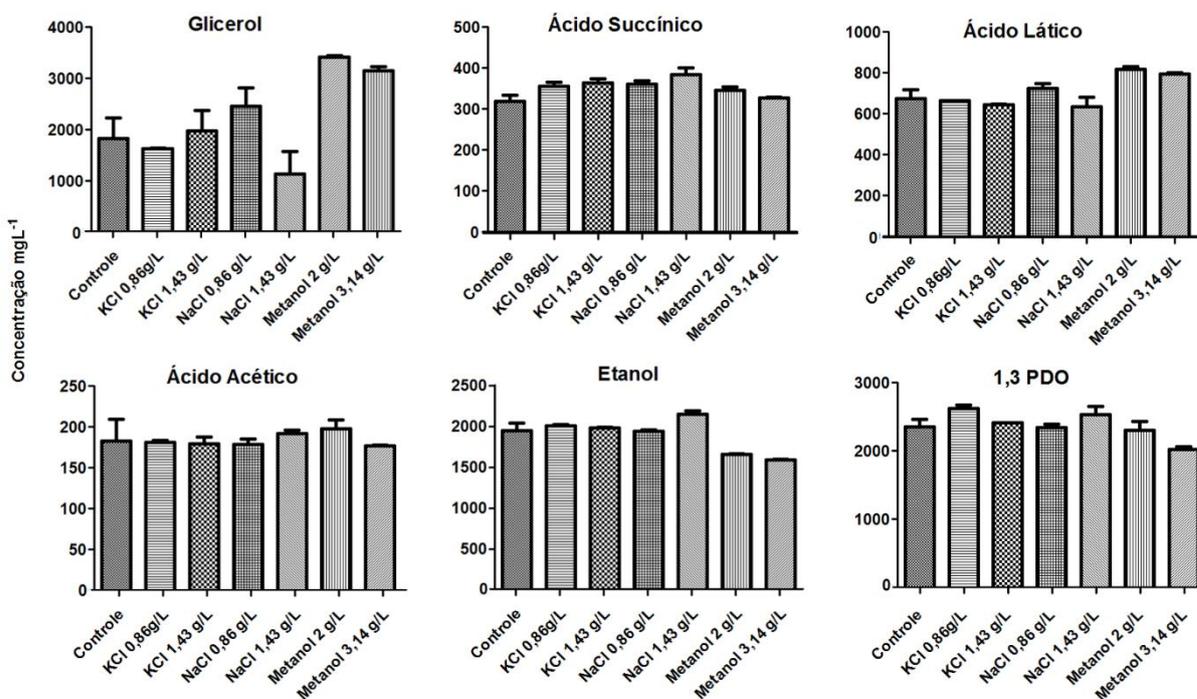
A análise dos produtos da fermentação pode dar indícios de quais vias estariam sendo afetadas pela adição das diferentes impurezas ao meio. Desse modo, o glicerol remanescente e os metabólitos produzidos foram verificados após o término do ensaio. Os resultados dessa quantificação podem ser visto na figura 18. A adição de NaCl na concentração 1,43 gL⁻¹ exerceu influência positiva tanto no consumo de glicerol quanto na produção de etanol, acarretando em 37% de aumento no consumo de substrato e 10% na concentração final de etanol. O maior consumo de glicerol pode estar relacionado com um aumento do tempo de atividade celular devido ao tamponamento do meio ou pela melhoria no transporte de nutrientes que pode ser causada pela presença de íons sódio (UNEMOTO *et al.*, 1990).

Também da mesma forma que para o H₂, o metanol prejudicou o consumo do glicerol. Como discutido acima, o metanol pode causar a desnaturação de proteínas de membrana (PATRA *et al.*, 2006). Apesar do glicerol ser um carboidrato difusível pela membrana, sua entrada na célula é auxiliada por uma proteína facilitadora de difusão (GlpF), a qual pode ter tido sua função comprometida pela adição do metanol. Esse menor

consumo de substrato justificaria o menor crescimento e a menor produção de H₂ e demais compostos, como etanol e 1,3-PDO.

Curiosamente, concentrações mais altas de lactato (de até aproximadamente 20%) foram verificadas ao final dos ensaios com metanol em relação ao controle. Considerando que o metanol pode aumentar a permeabilidade da membrana (PATRA *et al.*, 2006) e, dessa forma, intensificar a internalização do glicerol num primeiro momento, pode-se conjecturar que o aumento na produção de lactato tenha sido uma resposta à maior quantidade de glicerol internalizado, assim como suposto para a condição G40, na qual havia maior disponibilidade da fonte de carbono.

Figura 18. Concentração final dos produtos da fermentação do glicerol a 10 gL⁻¹ pelo isolado 9R na presença de impurezas em diferentes concentrações.



Os efeitos benéficos do cloreto de sódio para o metabolismo do isolado 9R podem ser considerados um outro ponto positivo para o uso desse micro-organismo no tratamento do glicerol bruto visto que as etapas de pós-tratamento desse resíduo dão preferência à remoção de metanol (o qual pode ser reutilizado na reação de transesterificação) e sabões, sendo que o processo de remoção dos últimos favorece a formação de sais (SARMA *et al.*, 2013).

4.3.4. Avaliação do metabolismo do isolado 9R sob diferentes concentrações de células inoculadas

Na literatura são encontrados vários trabalhos que mostram o efeito da quantidade de células inoculadas sobre vários aspectos microbianos, desde isolamento até morfologia, resistência à antibióticos e desempenho na produção de compostos (DAVIS *et al.*, 2005; MEYRATH, 1963; PEREGO *et al.*, 2003; QIANG *et al.*, 2013; SHARIFYAZD e KARIMI, 2017). No entanto, muitos trabalhos não consideram esse efeito ou mesmo apresentam números vagos sobre a quantidade de células usadas como inóculo, apresentando, muitas vezes, um valor arbitrário (e extremamente variável) de 10 % de inóculo (CAVALHEIRO *et al.*, 2009; LUO *et al.*, 2011; REUNGSANG *et al.*, 2013; SITTIJUNDA e REUNGSANG, 2017).

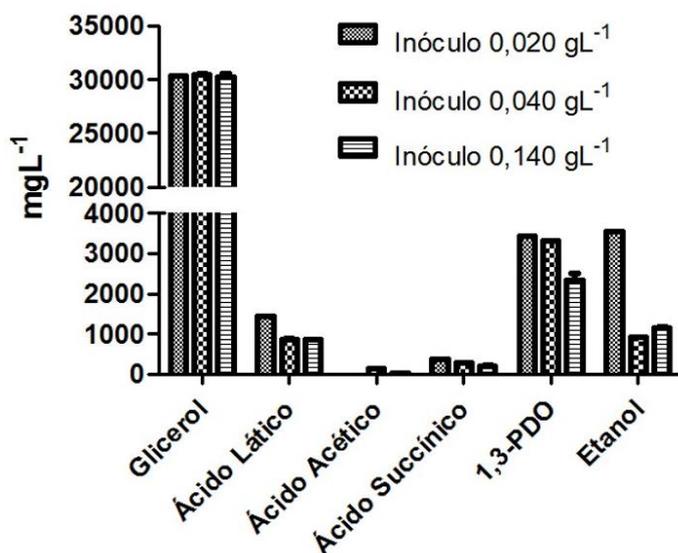
Considerando tais observações, o último teste sobre parâmetros a serem melhorados para a bioconversão de glicerol pelo isolado 9R foi a avaliação de possíveis mudanças no processo decorrentes da variação na quantidade inicial de células, até agora mantida em $0,020 \text{ gL}^{-1}$ em todos os ensaios realizados. Para isso, foram feitos três ensaios a pH 6,5 e 40 gL^{-1} glicerol inicial, sendo inoculados com 0,020; 0,040; ou $0,140 \text{ gL}^{-1}$ de células.

Infelizmente, devido à erros operacionais, os dados sobre a produção de H_2 não puderam ser coletados. Por outro lado, a análise dos metabólitos solúveis (Figura 19) revelou que a concentração do inóculo, apesar de não influenciar na quantidade de substrato consumida, pode alterar a concentração final de alguns dos produtos da fermentação, indicando que variações no número inicial de células podem também determinar as vias metabólicas preferenciais. Enquanto a concentração dos demais compostos permaneceu inalterada, a concentração de 1,3-PDO e etanol mostrou ser dependente da concentração inicial de células. O aumento na quantidade de células inoculadas diminuiu a quantidade obtida desses metabólitos, sendo esse fenômeno observado de forma mais pronunciada para o etanol, o qual chegou a apresentar redução de 3,9 vezes em sua concentração final no ensaio com $0,040 \text{ gL}^{-1}$ em relação ao ensaio com $0,020 \text{ gL}^{-1}$ de células inoculadas. Como não foram realizadas análises sobre o crescimento microbiano ou cinética da geração de produtos, conjectura-se que essas alterações estejam relacionadas a esses fatores.

Estudos mais aprofundados acerca da influência da quantidade de células inoculadas sobre o metabolismo microbiano muitas vezes exploram o chamado “efeito do inóculo”. Esse efeito, segundo Bidlas e colaboradores (2008), seria a relação entre

tamanho do inóculo e parâmetros como tempo de fase *lag*, número total de células ao final da fase de crescimento e alterações na concentração mínima inibitória de compostos antimicrobianos. Quanto a variações na produção de metabólitos, nossa busca na literatura não revelou trabalhos que tratassem diretamente do assunto para bactérias, mas como mostrado por Ding e colaboradores (2009) para *Saccharomyces cerevisiae* ao testar inóculos variando de 1 a 40 gL⁻¹, a variação na massa de células inoculada pode influenciar na produção de compostos como glicerol, ácido succínico, ácido palmitoleico, aminoácidos e etanol, entre outros.

Figura 19. Consumo de glicerol e metabólitos produzidos após 24 horas de fermentação de glicerol a 40,00 gL⁻¹ pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R com diferentes concentrações iniciais de inóculo.



4.3.5. Avaliação da atenuação do metabolismo do isolado 9R

Vale ressaltar que, em comparação à etapa inicial do trabalho (resultados apresentados no tópico 4.2), a produção de H₂ pela cepa *Enterobacter* sp. 9R apresentou mudanças notáveis (queda da produção máxima de 12,96 para aproximadamente 1,5 mmol em alguns ensaios). Também é válido citar que, durante a realização dos ensaios apresentados nessa etapa, alterações foram realizadas nos protocolos de medição de gases, o que pode explicar em partes as discrepâncias entre os valores obtidos anteriormente e nessa fase. No entanto, as análises revelaram que não apenas a produção e a taxa de produção de H₂ sofreram mudanças, mas também a taxa de consumo e o consumo total de glicerol (o qual não deixou de ser completo em 24 horas, como pode ser

visto na figura 18), quantidade final e tempo de obtenção de produtos solúveis e crescimento celular apresentaram mudanças.

Considerando que os protocolos de determinação dos demais fatores permaneceram inalterados, tais variações em conjunto permitem supor que, após seu isolamento e durante seu período de manutenção em nosso laboratório, o isolado 9R tenha mudado seu comportamento frente ao substrato alvo de nosso trabalho. A suposição aqui levantada é que, devido à sua conservação em glicerol (seja quando congelado ou em placas de Petri) e devido à falta de exposição aos estímulos ambientais existentes antes do isolamento, podem ter ocorrido alterações no metabolismo do isolado.

Barrick e colaboradores (2009), em um estudo com a linhagem *E. coli* B REL606, demonstraram, por meio de sequenciamento genético, que durante a manutenção da cepa em laboratório por um período de apenas 2.000 gerações, alterações ocorreram no genoma do micro-organismo, sendo que novas alterações foram verificadas até a geração de número 40.000. Interessantemente, a linhagem estudada por Barrick e colaboradores (2009) apresentou mutações no gene *dhaM*, o qual codifica para uma das subunidades da enzima di-hidroxiacetona quinase PEP-dependente (DhaK), uma enzima envolvida na conversão do fosfoenol-piruvato a piruvato quando *E. coli* usa o glicerol como fonte de carbono (Cintolesi *et al.*, 2012). Curiosamente, a linhagem estudada foi cultivada em meios com glicose e teve contato com o glicerol apenas durante os protocolos de congelamento e descongelamento prévios ao sequenciamento de seu genoma.

Além disso, em estudos similares, outros autores mostram que micro-organismos mantidos em cultivo laboratorial podem sofrer um tipo de pressão evolutiva, a qual depende das condições de manutenção, como ciclos de congelamento-descongelamento-crescimento, temperatura de armazenamento ou apenas a exposição contínua a alguma fonte de carbono sob condições padrão de cultivo (BARRICK e LENSKI, 2013; DEATHERAGE *et al.*, 2017; SLEIGHT *et al.*, 2008; SPROUFFSKE *et al.*, 2016; STRUCKO *et al.*, 2018). Lee e Palsson (2010) demonstraram que a linhagem *E. coli* K-12 MG1655, após apenas 700 gerações em contato com L-1,2-propanodiol, um substrato não consumível originalmente, a cepa adquiriu a capacidade de metabolizar o composto.

Esse fenômeno de adaptação evolutiva frente a algum substrato também já foi demonstrado para o glicerol por Fong e colaboradores (2005). Ao estudar 7 culturas paralelas de *E. coli* após apenas 44 dias de contato com o glicerol, os autores verificaram alterações significativas em parâmetros como taxa de crescimento (em glicerol e outros substratos), taxa de absorção do glicerol e taxa de absorção de oxigênio. O estudo também

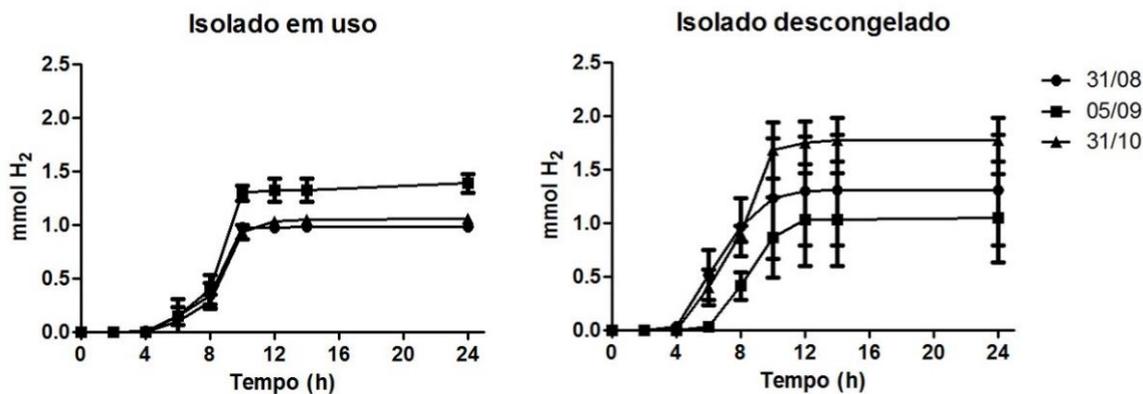
mostra a alteração na expressão de 70 genes ao final do experimento, entre eles genes relacionados à motilidade, vias biossintéticas e, interessante, o gene *cheB* (relacionado a receptores de membrana), citado no capítulo 4 como um possível alvo de manipulação para melhorias na bioconversão do glicerol. Strucko e colaboradores (2018) estendem as observações de alterações fenotípicas causadas pelo cultivo em meios contendo glicerol para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para a qual apenas 80 gerações foram suficientes para causar o fenômeno denominado adaptação evolutiva laboratorial.

Ademais, vários estudos mostram que o comportamento de inúmeras bactérias é altamente dependente do contato com outras espécies e é estabelecido que, em comunidades microbianas naturais, o metabolismo de cada linhagem é regulado por sua relação com as demais por meio de relações de sintrofia e simbiose (KAMAGATA e NARIHIRO, 2016; MIR *et al.*, 2016; MORRIS *et al.*, 2013; SIEBER *et al.*, 2014; SPEECE, 1983).

Desse modo, pode-se supor que a alteração das condições ambientais (transferência do lodo de um reator UASB para placas com ágar nutriente e glicerol) e a adaptação contínua às novas condições tenham sido a causa das alterações metabólicas observadas para o isolado 9R, tendo ocorrido uma adaptação evolutiva da linhagem. Mesmo amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ no início do projeto e reativadas após essas observações apresentaram o mesmo comportamento que a cepa em uso. Além disso, testes realizados com o isolado 3R também revelaram a queda na produção de H_2 em um perfil similar ao ocorrido para o isolado 9R (dados não mostrados). Portanto, a suposição que pode ser levantada é que as mudanças no metabolismo dos isolados estariam relacionadas com a ausência de estímulos por outras culturas e/ou a exposição contínua ao glicerol.

Visto que, dos dois fatores responsáveis pelas alterações metabólicas descritas, apenas o fator exposição ao glicerol poderia ser controlado, tanto a amostra em uso quanto uma amostra descongelada do isolado 9R foram repicadas por 4 meses em placas de Petri contendo apenas ágar nutriente. A produção de hidrogênio foi avaliada periodicamente para verificar uma possível reversibilidade dessas alterações. Os resultados de alguns desses ensaios são mostrados na figura 20.

Figura 20. Produção de H₂ por uma amostra em uso (esquerda) ou descongelada (direita) do isolado 9R em ensaios durante 4 meses sem contato do isolado com glicerol.



No entanto, como pode ser visto na figura 20, apesar da ocorrência de variações na quantidade de H₂ produzido, essas não tiveram uma relação direta com o tempo que o isolado permaneceu sem contato com glicerol e, além disso, essa produção não ultrapassou 17 % da produção apresentada na seção anterior (tópico 4.2). Apesar da queda na produção de H₂ e no consumo de glicerol nas condições testadas, após a ocorrência da adaptação evolutiva, a análise dos compostos solúveis revelou que o metabolismo do isolado 9R permaneceu estável (dados não mostrados). Essa diminuição da taxa de alterações fenotípicas em decorrência do tempo está de acordo com o que é mostrado na literatura (Barrick e Lenski, 2013; Strucko *et al.*, 2018).

Dessa forma, como todos os experimentos realizados nessa etapa foram comparados de maneira pontual e não com dados anteriores, pode-se considerar válidas as conclusões acerca da influência das variáveis testadas e de seus efeitos sobre o metabolismo do isolado 9R. Considerando os resultados obtidos, as variáveis pH, quantidade inicial de células e concentração inicial de glicerol foram as que se mostraram influentes sobre o processo. Assim sendo, as informações aqui expostas serviram como base para o desenvolvimento da próxima etapa do trabalho, a qual trata da determinação das condições ótimas para o consumo de glicerol e sua simultânea transformação em hidrogênio e etanol.

4.4. Melhorias na conversão de glicerol a hidrogênio e etanol pelo isolado *Enterobacter sp. 9R*

Após as etapas de caracterização inicial e verificação dos efeitos de diferentes fatores sobre o metabolismo de glicerol do isolado, esse tópico do trabalho apresenta os

resultados relativos às melhorias realizadas na fermentação do glicerol por *Enterobacter* sp. 9R. Para isso, levando em consideração os resultados obtidos na etapa anterior, os parâmetros pH, concentração inicial de substrato e concentração de inóculo foram escolhidos para tal fim. Como o foco dessa etapa do trabalho foi o aumento da produção de hidrogênio e etanol e o consumo de glicerol, as discussões sobre o metabolismo do isolado foram restringidas a esses compostos. Além disso, o experimento 1, apesar de ter sido incluído nas análises estatísticas realizadas, não foi considerado para a maioria das discussões, devido ao crescimento e metabolismo praticamente nulos da cepa nas condições estabelecidas para o mesmo.

4.4.1. Avaliação de alterações na produção de hidrogênio e etanol e consumo de glicerol com auxílio do planejamento experimental

Por meio do uso do planejamento experimental de Doehlert foi verificada a influência dos três fatores selecionados sobre o comportamento do isolado. Os pontos de mínimo e máximo para pH, concentração inicial de glicerol e concentração de inóculo foram definidos com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores e dados da literatura. Os valores obtidos para as variáveis, juntamente com os resultados encontrados para as variáveis resposta analisadas no tempo de 24 horas, são mostrados na tabela 12, expressos na forma de concentração (em mgL^{-1}) e rendimento $Y_{P/S}$ (mol produto/mol glicerol consumido). O monitoramento dos produtos foi realizado até as 72 horas de fermentação, no entanto, visto que não houveram variações nas concentrações dos metabólitos, os dados foram omitidos.

Nesse ponto, vale ressaltar que, apesar das variações na razão carbono/nitrogênio decorrerem unicamente em virtude das diferentes concentrações testadas para a fonte de carbono e sua influência não ter sido analisada diretamente, os valores obtidos para a razão C/N após o planejamento experimental (tabela 4, Capítulo 3) estão dentro da faixa apresentada na literatura para sistemas de digestão anaeróbia para a produção de hidrogênio (KOTHARI *et al.*, 2017). Além disso, apesar da possibilidade do nitrogênio ser um fator limitante para o consumo de glicerol em altas concentrações (como suposto no item 4.2.1.7), o uso de razões C/N no valor de até 200, muito superiores aos testados em nosso trabalho, são reportados como ótimos para sistemas de produção de etanol e/ou hidrogênio (ARGUN *et al.*, 2008; CAROSIA *et al.*, 2017; ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015; LIN e LAY, 2004; MOHAMMADI *et al.*, 2012; TAO *et al.*, 2007).

Com uma análise geral da tabela 12, é possível perceber que para todas as variáveis avaliadas existiram diferenças consideráveis entre os resultados dos experimentos, tanto no que diz respeito à concentração final quanto ao direcionamento do substrato consumido para a formação de produtos. Outra resposta importante que variou substancialmente entre os ensaios foi o consumo de glicerol. Mais uma vez, os produtos gerados em quantidades mais atrativas pelo isolado 9R foram H₂ e etanol, para os quais, juntamente com o consumo de glicerol, foram voltados os esforços de otimização apresentados posteriormente. Sobre os produtos encontrados durante essa primeira etapa de ensaios, vale ressaltar que após a alteração do metabolismo do isolado (discutida anteriormente) e para alguns dos ensaios, as concentrações encontradas para etanol aumentaram em até 1,8 vezes quando comparadas aos valores máximos apresentados no tópico 4.2.

Para auxiliar no entendimento acerca da influência dos parâmetros experimentais (pH; glicerol inicial; concentração do inóculo) sobre o metabolismo do isolado 9R, os dados foram averiguados com uso de análises de variância (ANOVA), diagramas de Pareto e superfícies de resposta. Essas ferramentas permitiram a verificação da ação de cada uma das variáveis escolhidas sobre cada uma das variáveis resposta de interesse. Para a construção dessas análises foram usados os dados relativos aos rendimentos $Y_{P/S}$ de cada um dos produtos (Tabela 12), visto que os rendimentos expressam o direcionamento de carbono e energia em cada uma das condições. Além disso, a análise baseada em rendimentos aumenta a relação produtos/sub-produtos, facilitando processos posteriores de separação e purificação.

Tabela 12. Condições experimentais fornecidas pelo planejamento experimental de Doehlert e variáveis resposta obtidas para cada ensaio (24h).

Ensaio	pH	Glicerol (gL ⁻¹)	Inóculo (gL ⁻¹)	Hidrogênio		Etanol		Ácido succínico		Ácido fórmico	
				mmol	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	Y _{P/S}
1	9,50	27,50	0,020	0,000	0,000	196,224	0,172	4,454	0,000	155,372	0,136
2	8,75	50,00	0,020	2,079	0,086	3.146,356	0,408	265,891	0,004	0	0
3	8,75	35,00	0,031	2,195	0,083	4.674,390	0,578	253,771	0,006	0	0
4	6,50	27,50	0,020	0,719	0,053	1.385,825	0,329	256,218	0,007	0	0
5	7,25	5,00	0,020	1,577	0,197	2.016,207	0,806	156,572	0,024	0	0
6	7,25	19,99	0,009	5,458	0,204	5.309,013	0,634	279,407	0,010	0	0
7	8,75	5,00	0,020	2,517	0,313	2.313,506	0,925	148,848	0,023	0	0
8	8,75	19,99	0,009	5,502	0,176	6.883,951	0,738	331,522	0,013	0	0
9	7,25	50,00	0,020	1,329	0,085	2.010,606	0,429	290,721	0,005	0	0
10	8,00	42,49	0,009	4,085	0,135	5.135,949	0,539	290,116	0,005	0	0
11	7,25	35,00	0,031	1,811	0,045	2.449,286	0,419	282,869	0,006	0	0
12	8,00	12,51	0,031	4,437	0,224	4.533,809	0,725	239,610	0,015	0	0
13	8,00	27,50	0,020	4,508	0,199	3.921,239	0,556	189,725	0,005	0	0
14	8,00	27,50	0,020	3,836	0,174	3.674,878	0,530	200,393	0,006	0	0
15	8,00	27,50	0,020	5,086	0,196	5.124,636	0,625	266,785	0,006	0	0
16	8,00	27,50	0,020	4,382	0,170	5.448,131	0,683	278,909	0,008	0	0
17	8,00	27,50	0,020	3,964	0,157	4.694,825	0,590	238,216	0,007	0	0
18	8,00	27,50	0,020	3,463	0,145	4.462,765	0,590	238,906	0,007	0	0
19	8,00	27,50	0,020	3,039	0,119	5.315,929	0,700	271,313	0,008	0	0

Tabela 12. Continuação.

Ensaio	1,3-PDO		Ácido láctico		Ácido acético		Glicerol consumido		
	mgL ⁻¹	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	molL ⁻¹	%
1	175,332	0,093	10,105	0,005	8,040	0,000	2.284,156	0,025	8,306
2	2.583,793	0,203	2.601,227	0,173	0,000	0,000	15.221,800	0,165	30,444
3	2.981,599	0,222	2.613,676	0,165	0,000	0,000	16.260,040	0,177	46,457
4	2.365,287	0,340	1.007,001	0,122	99,432	0,002	8.423,056	0,091	30,629
5	890,268	0,216	261,032	0,053	95,861	0,002	5.000,000	0,054	100,000
6	2.908,754	0,210	1.305,977	0,080	0,000	0,000	16.733,720	0,182	83,710
7	590,892	0,143	129,116	0,026	53,955	0,001	5.000,000	0,054	100,00
8	2.424,434	0,157	1.732,662	0,095	0,000	0,000	18.649,060	0,203	93,292
9	2.362,158	0,304	1.710,541	0,186	51,200	0,001	11.161,970	0,121	22,324
10	3.397,440	0,216	2.135,467	0,115	0,000	0,000	19.059,370	0,207	44,856
11	2.655,099	0,274	1.595,190	0,139	0,000	0,000	11.787,750	0,128	33,679
12	1.877,139	0,182	1.049,898	0,086	38,538	0,001	12.509,000	0,136	100,000
13	2.433,028	0,208	2.281,703	0,166	0,000	0,000	14.129,150	0,153	51,379
14	2.394,375	0,210	2.280,160	0,170	0,000	0,000	13.792,980	0,150	50,156
15	2.751,325	0,203	2.117,761	0,132	0,000	0,000	16.401,810	0,178	59,643
16	2.619,259	0,198	2.087,964	0,135	0,000	0,000	16.031,390	0,174	58,296
17	2.802,582	0,213	2.270,418	0,146	0,000	0,000	15.898,380	0,173	57,812
18	2.780,467	0,223	2.252,453	0,154	0,000	0,000	15.095,070	0,164	54,891
19	2.611,674	0,207	2.181,471	0,147	0,000	0,000	15.230,570	0,165	55,384

4.4.1.1. Produção de etanol

Levando em consideração os pontos de análise, o etanol e o hidrogênio (ambos produzidos após a quebra do piruvato em acetil-CoA e ácido fórmico) apresentaram resultados relevantes tanto para o estudo das alterações metabólicas quanto para a otimização de sua produção visando um futuro aumento de escala do processo.

Quanto ao etanol, analisando a tabela 12, pode ser notado que o experimento 7 (pH 8,75; 5,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹), o qual apresentou os menores rendimentos de 1,3-PDO e ácido lático, foi o que apresentou o maior direcionamento do glicerol para a produção de etanol (0,925 mol etanol/mol glicerol consumido). Na sequência, os maiores rendimentos foram obtidos nos experimentos 5 (pH 7,25; 5,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹), 8 (pH 8,75; 19,99 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,009 gL⁻¹) e 12 (pH 8,00; 12,51 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,009 gL⁻¹), variando de 0,806 a 0,725 mol etanol/mol glicerol consumido. Por outro lado, os dois menores $Y_{P/S}$ de etanol foram encontrados para os ensaios 4 (pH 6,5; 27,50 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹) e 2 (pH 8,75; 50,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹), sendo seguidos pelos ensaios 11 (pH 7,25; 35,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,031 gL⁻¹) e 9 (pH 7,25; 50,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹).

Pode-se notar que a concentração de glicerol foi o fator determinante para o direcionamento da fonte de carbono para a geração de etanol, de modo que os experimentos com a concentração mais baixa de substrato (7 e 5) apresentaram os maiores rendimentos de etanol. Entretanto, quando comparados os experimentos 7 e 5 (para os quais foram empregadas as mesmas concentrações iniciais de substrato e inóculo), é possível observar que o pH exerceu influência de magnitude semelhante à da concentração de glicerol sobre essa variável resposta, visto que o rendimento do ensaio 7, de pH mais elevado, foi 1,15 vezes maior que do ensaio 5.

A forte influência do pH fica ainda mais evidenciada quando analisado o rendimento do experimento 4 (de apenas 0,329 mol etanol/mol glicerol consumido). Esse valor foi 20 e 23 % menor que o encontrado para os ensaios 2 e 9, respectivamente, os quais foram realizados com as maiores concentrações de glicerol testadas, porém com valores de pH superiores aos usados no experimento 4. O rendimento de etanol para o ensaio 4 chegou a ser 2,2 vezes menor que o rendimento de ensaios do ponto central, realizados com a mesma concentração inicial de glicerol e pH 8,00. A capacidade de produção de etanol a partir de glicerol é reportada para várias linhagens de *Enterobacter aerogenes*, sendo que os valores ótimos variaram 6,40 a 8,14 para o pH e de 12,00 a 50,00 gL⁻¹ para a concentração de glicerol (ITO *et al.*, 2005; JITRWUNG e YARGEAU, 2011;

LEE *et al.*, 2017; MARU *et al.*, 2016; NWACHUKWU *et al.*, 2013; REUNGSANG *et al.*, 2013).

Essa influência praticamente equivalente entre concentração inicial de glicerol e pH no controle do rendimento de etanol é corroborada pela análise de variância e pelo diagrama de Pareto construídos para essa variável resposta (Tabela 13 e Figura 21, respectivamente). Como visto, a ANOVA confirmou a significância e o resultado da análise pelo diagrama de Pareto atribuiu valores similares para as duas variáveis.

Tabela 13. Resultados da análise de variância (ANOVA) para a variável resposta $Y_{P/S}$ de etanol.

Fator	SQ	GL	MQ	F	p-valor
pH (L)	0,000132	1	0,000132	0,03338	0,861052
pH (Q)	0,201602	1	0,201602	50,99348	0,000380
Glicerol (gL⁻¹) (L)	0,244995	1	0,244995	61,96924	0,000222
Glicerol (gL⁻¹) (Q)	0,040795	1	0,040795	10,31876	0,018314
Inóculo (gL⁻¹) (L)	0,006035	1	0,006035	1,52661	0,262802
Inóculo (gL⁻¹) (Q)	0,003133	1	0,003133	0,79255	0,407608
pH*Glicerol	0,004864	1	0,004864	1,23028	0,309821
pH*Inóculo	0,002322	1	0,002322	0,58734	0,472516
Glicerol*Inóculo	0,009872	1	0,009872	2,49695	0,165149
Erro	0,023721	6	0,003953		
Total	0,558746	18			

Onde: **L**: modelo linear; **Q**: modelo quadrático; **SQ**: soma quadrática dos erros; **GL**, graus de liberdade; **MQ**: média quadrática dos erros; **F**: valor do teste F calculado.

A superfície de resposta para o $Y_{P/S}$ de etanol (Figura 22) mostra a tendência de rendimentos maiores quanto menor a concentração inicial de glicerol e o favorecimento desse fator por valores de pH relativamente básicos. Assim como os valores de pH, os dados de concentração estão de acordo com o que é apresentado em parte dos trabalhos encontrados na literatura (JITRWUNG e YARGEAU, 2011; LEE *et al.*, 2017; MARU *et al.*, 2016), mas condições desse tipo não apresentariam aplicabilidade em sistemas de grande escala, devido aos gastos relacionados à diluição do glicerol bruto que se fariam necessários (SARMA *et al.*, 2013). Portanto, esses resultados foram analisados

juntamente com outros parâmetros de interesse, como a co-produção de H_2 e, principalmente, o consumo de glicerol, como discutido a seguir.

Figura 21. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável resposta $Y_{P/S}$ de etanol.

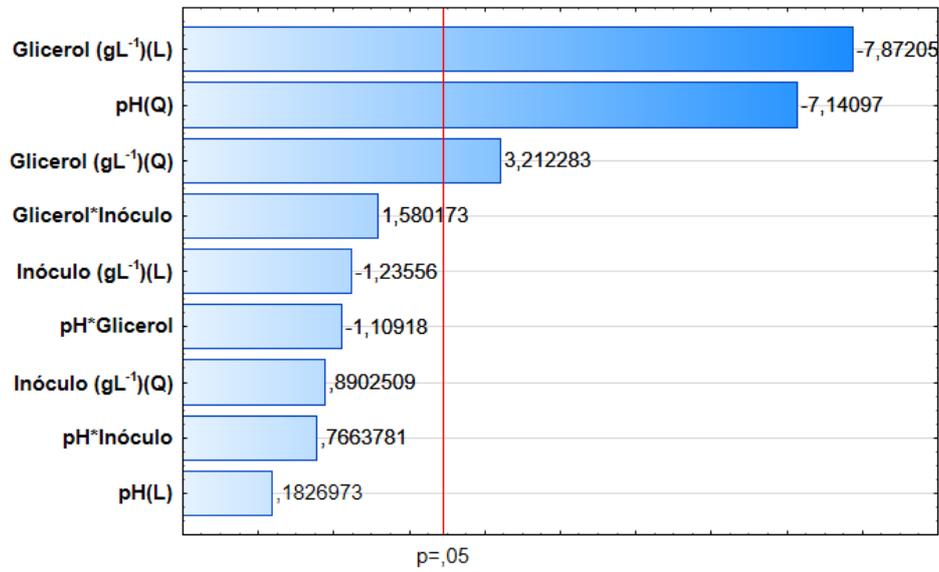
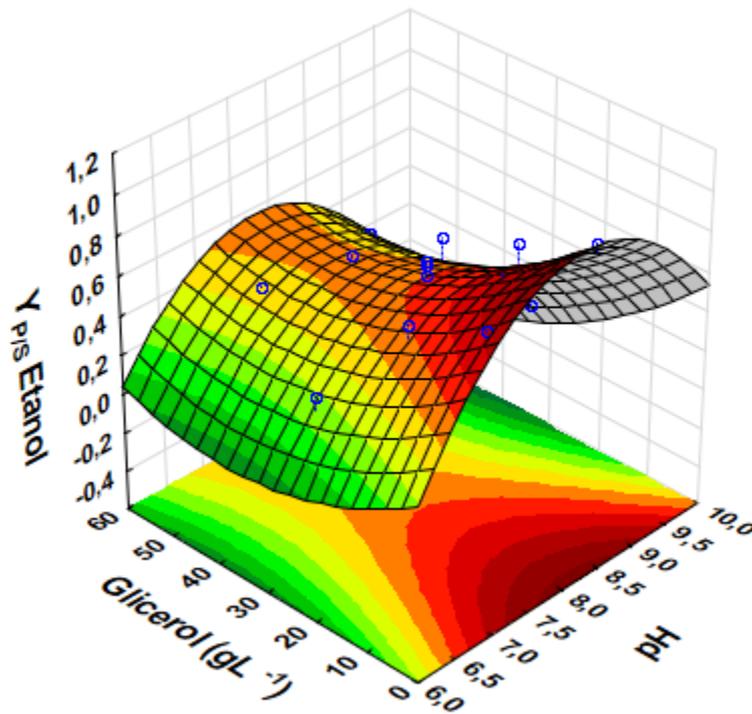


Figura 22. Superfície de resposta para a variável resposta $Y_{P/S}$ de etanol. A variável Inóculo foi fixada em $0,02 \text{ gL}^{-1}$.



4.4.1.2. Produção de hidrogênio

Para o hidrogênio (Tabela 12), as variáveis pH inicial e concentração de substrato também exerceram graus similares de influência sobre sua produção e rendimento, a exemplo do que foi observado para o etanol. O maior rendimento de hidrogênio (0,313 mol H₂/mol glicerol consumido) foi observado para o experimento 7 (pH 8,75; 5,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹), o único com diferença positiva considerável em relação aos experimentos do ponto central. O valor de Y_{P/S} para o H₂ apresentado pelo experimento 7 foi 1,58 vezes superior ao obtido no experimento 5 (pH 7,25; 5,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹), realizado nas mesmas condições de inóculo e concentração inicial de glicerol, mas em valor de pH inferior.

Somado aos resultados obtidos para o etanol, esses dados demonstram que as condições de pH e concentração inicial de substrato utilizadas nesse ensaio foram as melhores para garantir a conversão de glicerol em produtos gerados após a geração de acetil-CoA, em oposição à produção de ácido lático e 1,3-PDO (produtos para os quais o experimento 7 apresentou os menores rendimentos). Em contrapartida, experimentos com meios mais ácidos, como o ensaio 4 (pH 6,50; 27,50 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹), ou com concentrações relativamente altas de glicerol, como o ensaio 11 (pH 7,25; 35,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,031 gL⁻¹), apresentaram rendimentos extremamente baixos para o hidrogênio (0,053 e 0,045 mol H₂/mol glicerol consumido, respectivamente).

Como já citado anteriormente, o etanol é o co-produto preferencial para a produção de H₂ por enterobactérias e, portanto, grande parte dos trabalhos disponíveis apresenta estratégias de otimização conjunta dos resultados para esses dois compostos. Assim, as condições ótimas reportadas na literatura ficam próximas às relatadas para o etanol, sendo que os valores ótimos de pH e concentração inicial de glicerol para a produção de H₂ (de maneira individual ou combinada com etanol) variam, respectivamente, de 6,00 a 8,14 e de 12,00 a 50,00 gL⁻¹ (HAN *et al.*, 2012; ITO *et al.*, 2005; JITRWUNG e YARGEAU, 2011; LEE *et al.*, 2017; MARU *et al.*, 2016; NWACHUKWU *et al.*, 2013; REUNGSANG *et al.*, 2013; SEIFERT *et al.*, 2009).

Do mesmo modo que observado em nosso trabalho, Seifert e colaboradores (2009) mostraram que o aumento da concentração inicial de glicerol de 5,00 para 10,00 gL⁻¹ pode exercer efeitos positivos sobre a quantidade de H₂ produzido por uma cultura anaeróbia termicamente tratada, porém, elevações da concentração para valores superiores a 30 gL⁻¹ não apresentaram qualquer melhoria para a produção do gás. Por outro lado, os autores relatam que, a despeito da estagnação na produção de H₂, concentrações mais

elevadas de glicerol não exerceram efeito inibitório sobre a cultura estudada. Também quanto à otimização da concentração de substrato, Reungsang e colaboradores (2013), em estudos com *Enterobacter aerogenes* KKU-S1, mostraram que as condições ótimas para a produção de hidrogênio não necessariamente coincidem com as determinadas para o etanol, podendo apresentar relações consideravelmente antagônicas. A falta de correlação entre os rendimentos de H₂ e etanol também foi observada por Seifert e colaboradores (2009).

Em relação ao pH, os efeitos positivos de meios relativamente básicos sobre a obtenção de H₂, como quando comparados os resultados dos ensaios 7 e 5, podem estar relacionados ao estresse causado por ácidos orgânicos, o qual é aumentado em valores de pH mais ácidos. Segundo Piper e colaboradores (2001), em meios com pH mais baixo prevalecem ácidos carboxílicos em sua forma não-dissociada, facilitando a difusão desses pela membrana, o que pode aumentar sua toxicidade no citoplasma. Para o ensaio 7, além da menor produção de ácidos succínico, lático e acético em relação ao ensaio 5, o pH final da fermentação para o primeiro ficou em 7,35 contra 6,70 para o segundo (dados não mostrados).

A consequência deletéria da internalização dos ácidos acético e butírico sobre a produção de H₂ foi reportada por van Ginkel e Logan (2005) em estudos com uma cultura mista enriquecida para o gênero *Clostridium* alimentada com glicose. Interessantemente, ao comparar a ação de ácidos adicionados ao reator ou produzidos pela cultura, os autores verificaram que os ácidos oriundos da fermentação, mesmo em menor concentração, apresentaram maior toxicidade do que os ácidos adicionados. Os autores não justificam o fato, mas, provavelmente, essa maior inibição seja produto do efeito sinérgico exercido pela maior carga de glicose aplicada para a produção de ácidos pelos micro-organismos. Além do estresse causado por ácidos carboxílicos não-dissociados, a própria presença de maiores concentrações de íon H⁺ em solução faz com que as células direcionem grande parte de seus esforços para a extrusão desses íons em detrimento ao crescimento e geração de produtos (ZENG *et al.*, 1990).

Apesar de alguns autores terem observado a influência da quantidade de células inoculadas sobre a produção de H₂ (SARMA *et al.*, 2016; SEIFERT *et al.*, 2009), esse efeito não foi observado em nossos testes. Desse modo, mais uma vez os fatores concentração inicial de substrato e pH inicial foram as únicas variáveis que apresentaram efeito significativo sobre o rendimento do produto avaliado, como pode ser visto na tabela

14 e na figura 23, as quais apresentam, respectivamente, a ANOVA e o diagrama de Pareto para a variável resposta $Y_{P/S}$ de H_2 .

Tabela 14. Resultados da análise de variância (ANOVA) para a variável resposta $Y_{P/S}$ de hidrogênio.

Fator	SQ	GL	MQ	F	p-valor
pH (L)	0,000027	1	0,000027	0,03387	0,860040
pH (Q)	0,030072	1	0,030072	37,87150	0,000844
Glicerol (gL ⁻¹) (L)	0,043683	1	0,043683	55,01272	0,000309
Glicerol (gL ⁻¹) (Q)	0,004240	1	0,004240	5,33906	0,060216
Inóculo (gL ⁻¹) (L)	0,004429	1	0,004429	5,57826	0,056143
Inóculo (gL ⁻¹) (Q)	0,000165	1	0,000165	0,20791	0,664447
pH*Glicerol	0,003259	1	0,003259	4,10435	0,089166
pH*Inóculo	0,002425	1	0,002425	3,05403	0,131129
Glicerol Inóculo	0,000024	1	0,000024	0,03027	0,867597
Erro	0,004764	6	0,000794		
Total	0,099703	18			

Onde: L: modelo linear; Q: modelo quadrático; SQ: soma quadrática dos erros; GL, graus de liberdade; MQ: média quadrática dos erros; F: valor do teste F calculado.

Corroborando as semelhanças entre as condições ótimas para a produção de etanol e hidrogênio, a superfície de resposta obtida para o H_2 (Figura 24) foi muito similar à do álcool. Essa observação corrobora os dados apresentados na literatura que afirmam que o etanol é o melhor co-produto para a produção de hidrogênio (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013; ITO *et al.*, 2005; MARU *et al.*, 2016; NWACHUKWU, R. *et al.*, 2012), além de indicarem a indissociabilidade da regulação dessas vias para nosso isolado. Dessa forma, os métodos empregados na busca pela otimização da produção de H_2 e etanol (apresentados a seguir) consideraram melhorias conjuntas para os dois compostos.

Da mesma forma que a produção e o rendimento, a velocidade de geração de um composto é de extrema importância para a avaliação de um processo fermentativo. O tempo para atingir a produção máxima variou entre 12 e 24 horas (dados não mostrados), sendo o ensaio de maior rendimento (experimento 7) responsável pelo menor tempo e os ensaios de maior produção (6 e 8) os mais prolongados. Além do ensaio 1, para o qual a

produção de H_2 foi praticamente nula, apenas o ensaio 11 encerrou a produção antes desse intervalo.

Figura 23. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável resposta $Y_{P/S}$ de hidrogênio.

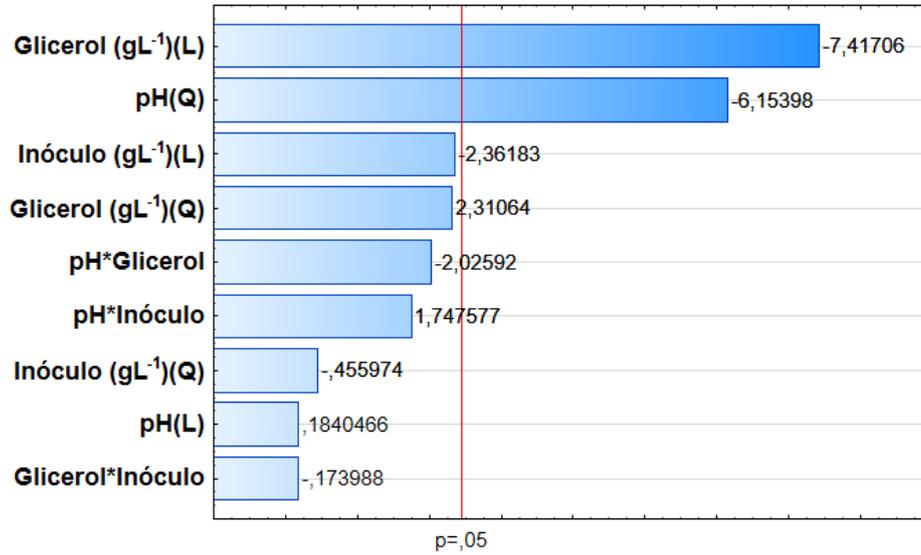
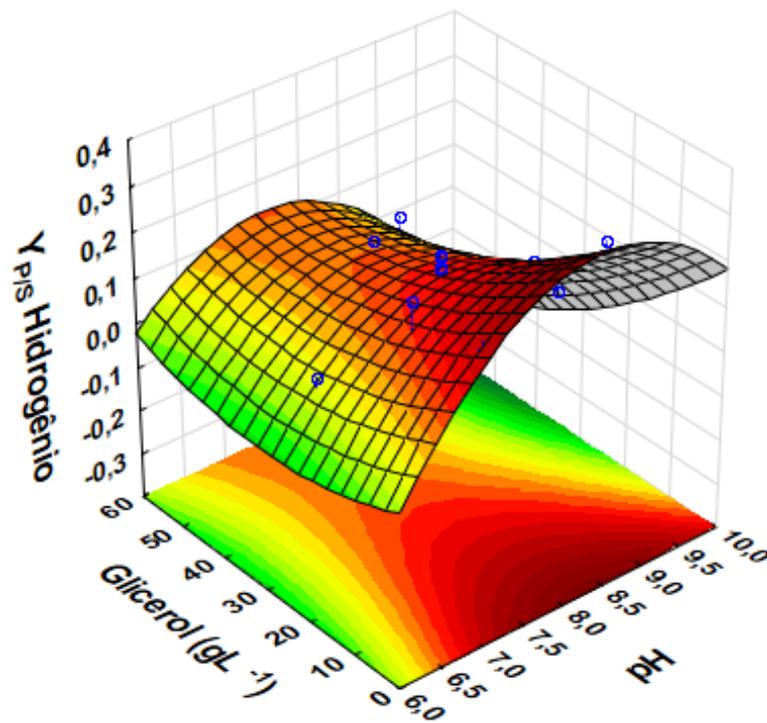


Figura 24. Superfície de resposta para a variável resposta $Y_{P/S}$ de hidrogênio. A variável Inóculo foi fixada em $0,02 gL^{-1}$.



Para trabalhos que estudaram concentrações de glicerol dentro do intervalo avaliado em nosso trabalho, os tempos para se alcançar a produção máxima de hidrogênio variaram entre 12 e 30 horas para culturas de *Enterobacter aerogenes* e entre 96 e 120 horas para linhagens de *E. coli*, mostrando que nossos resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura (ITO *et al.*, 2005; MARKOV *et al.*, 2011; PI *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2018; SEIFERT *et al.*, 2009; TRAN *et al.*, 2015; TRAN *et al.*, 2014). Para auxiliar as análises, os dados foram submetidos ao modelo modificado de Gompertz e os resultados são apresentados na tabela 15.

Tabela 15. Dados obtidos com o modelo modificado de Gompertz e produção máxima de hidrogênio pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R para os diferentes ensaios determinados pelo planejamento experimental.

Ensaio	Produção acumulada (experimental) de H₂ (mmol)	P₀ Produção máxima de H₂ (mmol)	R_m Taxa de produção de H₂ (mmol h⁻¹)	λ Fase lag (horas)	R²
1	0,00	ND	ND	ND	ND
2	2,08	2,14	0,37	6,21	0,9986
3	2,19	1,80	0,23	4,46	0,9793
4	0,72	0,72	0,24	2,86	0,9819
5	1,58	1,61	0,66	6,22	0,9997
6	5,46	5,69	0,62	5,71	0,9924
7	2,52	2,53	0,87	7,29	0,9995
8	5,50	5,69	0,47	8,47	0,9962
9	1,33	1,52	0,36	5,14	0,9991
10	4,09	4,85	0,51	7,89	0,9908
11	1,81	0,86	0,18	4,67	0,9913
12	4,44	4,99	0,52	6,31	0,9937
13	4,51	4,63	0,53	6,10	0,9967
14	3,84	3,91	0,56	6,30	0,9985
15	5,09	5,28	0,63	5,90	0,9987
16	4,38	4,69	0,54	5,93	0,9856
17	3,96	4,09	0,43	5,23	0,9965
18	3,46	3,66	0,36	6,64	0,9944
19	3,04	3,51	0,41	8,91	0,9947

Onde: ND – não determinado.

Como visto na tabela 15, os ensaios 3 (pH 8,75; 35,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,031 gL⁻¹), 4 (pH 6,50; 27,5 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹) e 11 (pH 7,25; 35,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,031 gL⁻¹), com os menores rendimentos de H₂, também apresentaram as taxas mais baixas de produção (0,23; 0,24; e 0,18 mmol h⁻¹, respectivamente). De maneira contrária, o experimento 7 (pH 8,75; 5,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹), além de apresentar o maior rendimento, também foi o experimento com a maior taxa de produção de hidrogênio (0,87 mmol h⁻¹), corroborando as suposições de que as condições usadas nesse ensaio priorizam a geração desse composto.

A melhoria simultânea de taxas de produção e rendimentos demonstrada pela análise desses dados é um resultado importante, visto que a diminuição na geração de subprodutos e a redução do tempo de obtenção dos produtos de interesse são melhorias técnicas almejadas por vários estudos sobre a produção de H₂ (SILVA-ILLANES *et al.*, 2017). Além disso, apesar desse aumento conjunto de rendimentos e taxas ser obtido em alguns trabalhos, muitas das vezes esses fatores apresentam comportamentos inversos em resposta a alterações ambientais ou modificações genéticas (ADNAN *et al.*, 2014; LOVATO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2017; SOO *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2015).

4.4.1.3. Consumo de glicerol

Além da recuperação de produtos de interesse comercial, a remoção do glicerol do efluente de indústrias de biodiesel figura como um requisito determinante da aplicabilidade do processo de tratamento proposto, visto que é o fator que provê o caráter ambiental para o mesmo. Desse modo, esse trabalho também visou à otimização do consumo de glicerol pelo isolado 9R.

Entre os ensaios com menor consumo de glicerol estão o experimento 7 (pH 8,75; 5,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹) e 5 (pH 7,25; 5,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹), fato que pode ser facilmente compreendido ao se considerar a baixa quantidade de substrato inicial. Entretanto, na sequência de menores consumos, são encontrados os ensaios 4 (pH 6,5; 27,5 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹) e 9 (pH 7,25; 50,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹), os quais, ainda que sendo realizados com concentrações maiores de glicerol, apresentaram consumos relativamente pequenos, apenas 8.423 e 11.161 mgL⁻¹, respectivamente. Como já discutido nesse trabalho, esse menor consumo de glicerol é resultado de um efeito inibitório causado por altas concentrações iniciais desse substrato.

Por outro lado, ao se comparar o consumo do experimento 2 (pH 8,75; 50,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,020 gL⁻¹) com o do experimento 9 (pH 7,25; 50,00 gL⁻¹ GI; e Inóculo

0,020 gL⁻¹), fica evidenciado que o pH pode diminuir o efeito inibitório causado por altas concentrações de glicerol sobre o isolado 9R. O ensaio 2, de pH mais básico, apresentou um consumo 36 % (cerca de 4.000 mgL⁻¹) maior que o ensaio 9. Além disso, o consumo do ensaio 4 foi inferior em 24 % (cerca de 2.700 mgL⁻¹) ao consumo do ensaio 9, mesmo este apresentando uma maior concentração inicial de glicerol e, portanto, um maior efeito inibitório decorrente dessa. Lee e colaboradores (2012) observaram efeitos inibitórios sobre o consumo de glicerol por *E. aerogenes* ATCC 29007 em valores de pH abaixo de 5,00 e acima de 7,00. Para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8724, a inibição do consumo de glicerol ocorre para valores de pH abaixo de 6,50 e acima de 8,00 (YANG *et al.*, 2017).

Além disso, como já demonstrado por Barbirato e colaboradores (1996) o consumo de glicerol por *E. agglomerans* é extremamente dependente do pH inicial, fato relacionado pelos autores à regulação exercida pelo pH sobre enzimas envolvidas tanto na via oxidativa quanto na via redutiva do glicerol. Entre as razões para o baixo consumo de glicerol apresentado pelo experimento 4, somados à regulação enzimática, os efeitos causados pelo estresse ácido (PIPER *et al.*, 2001) e pelo gasto energético com a extrusão de prótons (ZENG *et al.*, 1990) não podem ser descartados.

O consumo incompleto de substrato em concentrações relativamente elevadas de glicerol também é reportado para outros sistemas e, algumas vezes, de maneira mais pronunciada que para o nosso isolado. Como exemplo, para a linhagem *E. aerogenes* ATCC 29007, concentrações iniciais de glicerol a partir dos 15,00 gL⁻¹ impediram o consumo total do substrato, sendo que em ensaios com 20,00 gL⁻¹ de glicerol, aproximadamente 50 % da fonte de carbono não foi consumida com 24 horas de fermentação (LEE *et al.*, 2012). Por outro lado, para os experimentos 6 e 8, iniciados com uma concentração de glicerol próxima à citada acima, o isolado 9R consumiu aproximadamente 84 % (16.733 mgL⁻¹) e 94 % (18.649 mgL⁻¹) do glicerol adicionado. Seifert e colaboradores (2009), mostraram que a quantidade de glicerol consumida por uma cultura mista termicamente tratada não ultrapassou os 17,00 gL⁻¹, independentemente da concentração inicial desse substrato. Em contrapartida, em nossos ensaios, um consumo superior a 19,00 gL⁻¹ foi obtido no experimento 10, mostrando que esse valor é passível de ser otimizado.

Além do grande consumo apresentado pelo ensaio 10 (pH 8,00; 42,49 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,009 gL⁻¹) esse foi seguido, em ordem decrescente, pelos ensaios 8 (pH 8,75; 19,99 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,009 gL⁻¹) e 6 (pH 7,25; 19,99 gL⁻¹ GI; e Inóculo 0,009 gL⁻¹). Interessantemente, os ensaios 6 e 8 foram os que apresentaram as maiores produções

totais de H₂. Os três experimentos, não obstante as diferenças de pH ou glicerol inicial, partilham a baixa quantidade de inóculo utilizada. O ensaio 10 exibiu um consumo pelo menos 2.600 mgL⁻¹ maior que o consumo de experimentos do ponto central, os quais foram iniciados com o mesmo valor de pH e com menor quantidade inicial de glicerol (e conseqüente menor efeito inibitório), porém com uma maior quantidade de inóculo. Assim, diferentemente do que ocorreu para hidrogênio e etanol, as análises estatísticas atestaram a significância das três variáveis avaliadas sobre a variável resposta consumo de glicerol, como pode ser visto nos resultados da análise de variância e do diagrama de Pareto construídos para esse fator (Tabela 16 e Figura 25, respectivamente). Provavelmente, a obtenção de melhores resultados com valores baixos de inóculo pode estar relacionada com as baixas quantidades de nitrogênio presente no meio.

Sarma e colaboradores (2016), ao estudarem a linhagem de *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 supuseram que a inoculação de altas concentrações de células pode causar um supercrescimento das culturas devido a um maior consumo de glicerol e conseqüentes prejuízos para a produção de hidrogênio. Contrariamente aos achados de Sarma e colaboradores (2016), os ensaios nos quais o isolado 9R apresentou os maiores valores de massa seca (dados não mostrados) foram aqueles inoculados com a menor quantidade de células (*i.e.* ensaios 6, 8 e 10). Provavelmente, o menor número de células inoculadas alterou parâmetros de crescimento como tempo de fase *lag* e taxa máxima de crescimento bem como perfil temporal de produção de metabólitos pelo isolado 9R. No entanto, a confirmação de tais hipóteses dependeria de análises cinéticas comparativas, as quais não foram realizadas nessa etapa do trabalho.

Para melhor visualização do efeito do inóculo sobre o consumo de glicerol, as superfícies de resposta para esse fator (Figura 26) foram elaboradas confrontando-se as variáveis duas a duas, sempre mantendo a terceira variável fixada no valor estabelecido para o ponto central. A análise geral dessas superfícies de resposta mostra que concentrações intermediárias de glicerol, valores de pH levemente básicos e pequenas quantidades iniciais de células seriam as melhores opções para a melhoria do consumo de glicerol pelo isolado 9R. Os trabalhos encontrados em nossa busca na literatura, apesar de discutirem a quantidade de glicerol consumida em diferentes situações, não focam suas estratégias de otimização para essa variável resposta, o que dificulta comparações com os dados obtidos em nosso trabalho e mostra a importância de se considerar esse fator para a melhoria de processos de bioconversão do glicerol.

Tabela 16. Resultados da análise de variância (ANOVA) para a variável resposta consumo de glicerol.

Fator	SQ	GL	MQ	F	p-valor
pH (L)	0,2094	1	0,2094	0,04118	0,843701
pH (Q)	151,5993	1	151,5993	29,81750	0,000400
Glicerol (gL ⁻¹) (L)	62,8310	1	62,8310	12,35799	0,006563
Glicerol (gL ⁻¹) (Q)	37,0785	1	37,0785	7,29283	0,024373
Inóculo (gL ⁻¹) (L)	32,1705	1	32,1705	6,32750	0,033014
Inóculo (gL ⁻¹) (Q)	37,8031	1	37,8031	7,43535	0,023347
pH*Glicerol	4,1206	1	4,1206	0,81046	0,391437
pH*Inóculo	0,3251	1	0,3251	0,06394	0,806061
Glicerol*Inóculo	2,1032	1	2,1032	0,41367	0,536156
Erro	45,7581	9	5,0842		
Total	407,2836	18			

Onde: L: modelo linear; Q: modelo quadrático; SQ: soma quadrática dos erros; GL, graus de liberdade; MQ: média quadrática dos erros; F: valor do teste F calculado.

Figura 25. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável resposta consumo de glicerol.

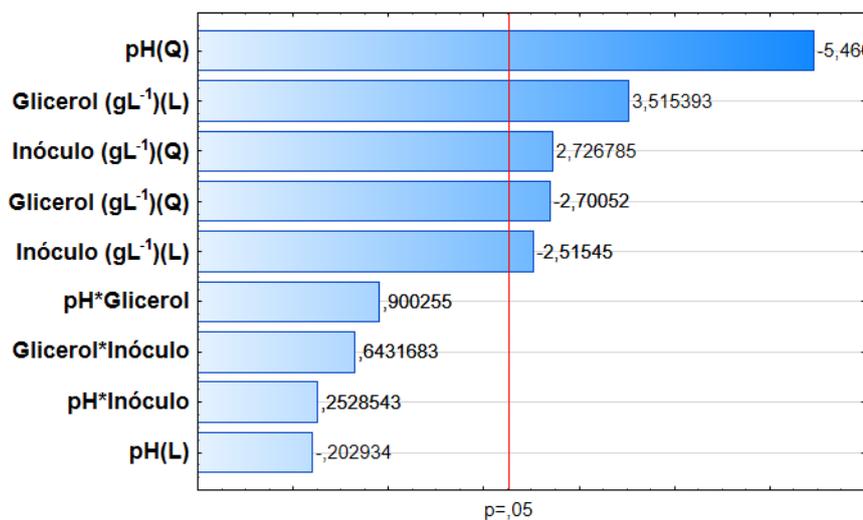
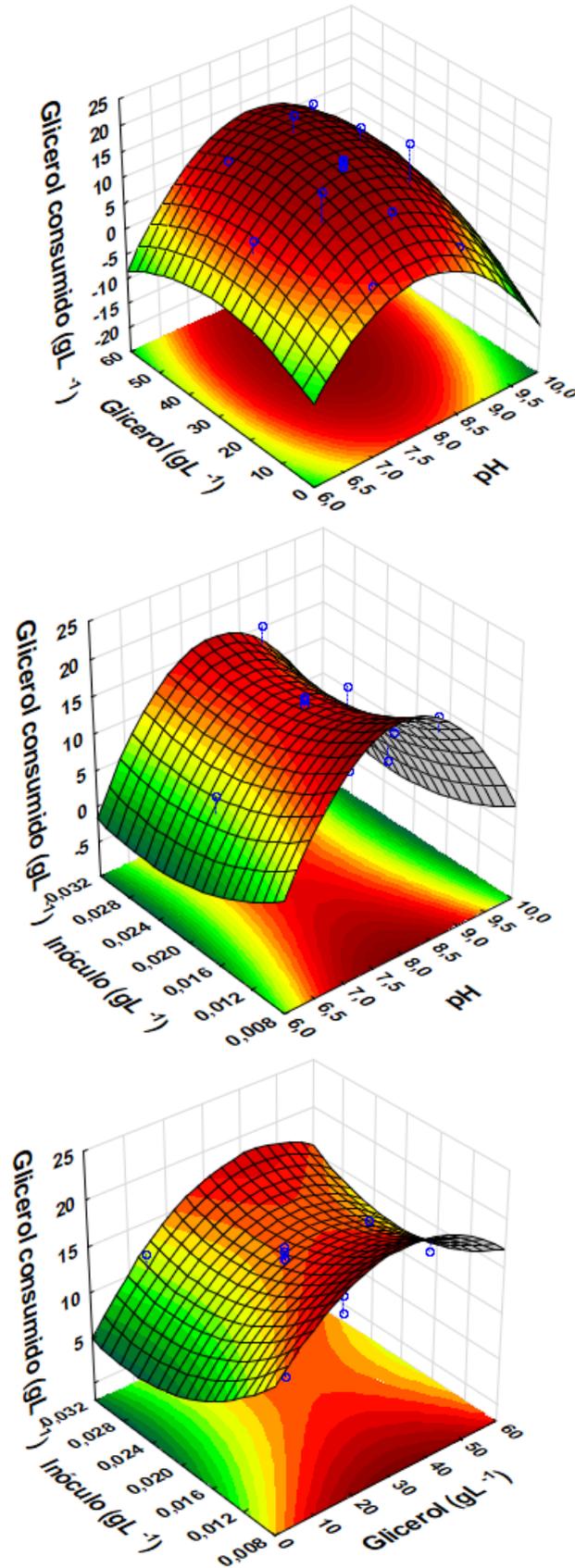


Figura 26. Superfícies de resposta para a variável resposta consumo de glicerol. (Acima) A variável Inóculo foi fixada em $0,02 \text{ gL}^{-1}$. (Ao centro) A variável Glicerol foi fixada em $27,50 \text{ gL}^{-1}$. (Abaixo) A variável pH foi fixada em 8,0.



4.4.2. Aumento do consumo de glicerol e da produção de hidrogênio e etanol pelo isolado 9R com uso da função de desejabilidade

Para finalizar a etapa de busca pela otimização da bioconversão do glicerol pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R, os dados obtidos dos experimentos determinados pelo planejamento experimental foram submetidos à ferramenta estatística de desejabilidade. Essa ferramenta determina os valores para cada variável que garantam o melhor resultado para diferentes variáveis respostas ou um conjunto das mesmas.

Dessa forma, considerando os produtos em potencial para o isolado 9R, foram estipuladas três configurações distintas de sistemas para a bioconversão do glicerol: (I) Aumento do consumo de glicerol e produção equilibrada dos produtos derivados de acetil-CoA ou não (hidrogênio, etanol e 1,3-PDO), configuração denominada HEPG; (II) Aumento do consumo de glicerol e favorecimento da produção de 1,3-PDO frente aos demais produtos, condição denominada PG; e (III) Aumento do consumo de glicerol e favorecimento da produção de hidrogênio e etanol em detrimento à produção de 1,3-PDO, condição denominada HEG. A inclusão do 1,3-PDO entre os quesitos da desejabilidade ocorreu devido a sua produção ser incentivada por concentrações mais altas de glicerol em relação aos outros metabólitos, de modo que uma configuração que privilegiasse sua produção também visasse o consumo de glicerol em concentrações mais elevadas.

A determinação das configurações citadas foi realizada empregando os dados relativos ao rendimento dos produtos de interesse. A escolha do rendimento ao invés da produção total dos metabólitos teve o intuito de aumentar a razão produtos/subprodutos de cada sistema, visando facilitar processos de separação que venham a ser estudados futuramente. No entanto, os resultados gerados pela ferramenta de desejabilidade empregando apenas rendimentos determinaram o uso de concentrações iniciais de glicerol extremamente baixas para a geração de etanol e H₂ (dados não mostrados), o que reduziria consideravelmente a aplicabilidade dos dados gerados.

Como forma de contornar esse problema e também para aumentar a funcionalidade dos sistemas de fermentação propostos, o fator consumo de glicerol foi incorporado às configurações desejadas, de modo que se objetivou alcançar não só os maiores rendimentos, mas também as maiores produções de cada composto de interesse. As análises de desejabilidade para cada configuração podem ser vistas nas figuras 27, 28 e 29 e os resultados compilados para os ensaios são mostrados na tabela 17.

Figura 27. Análise de desejabilidade para a configuração HEPG (maior consumo de glicerol e produção equilibrada de etanol, H₂ e 1,3-PDO).

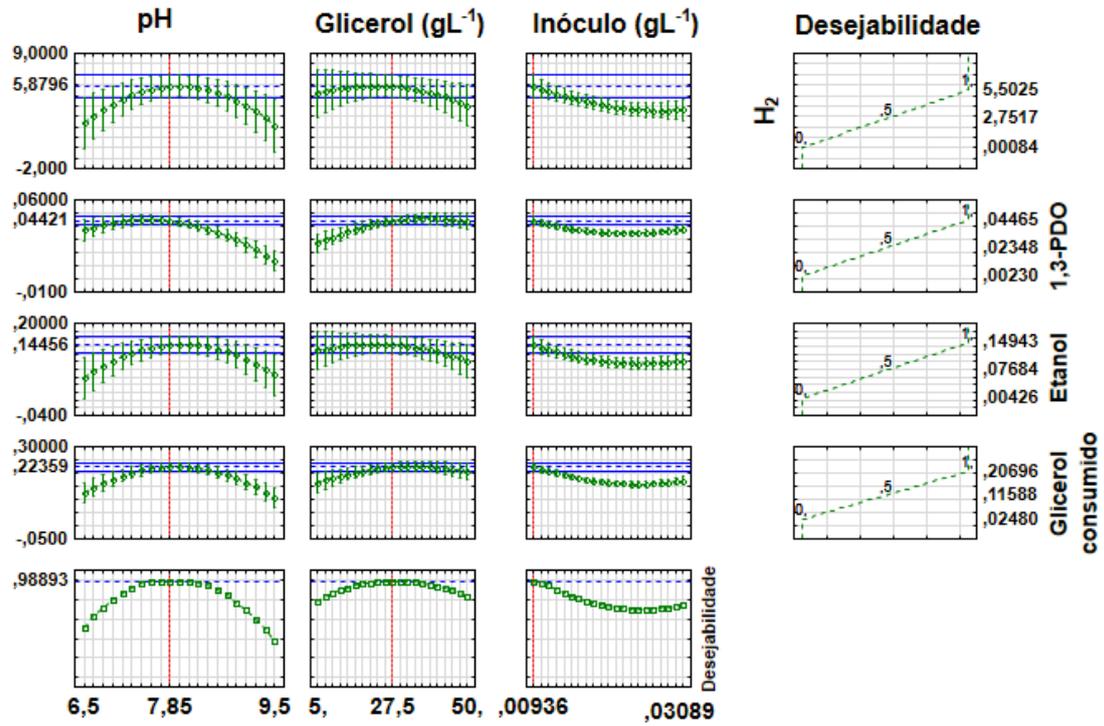


Figura 28. Análise de desejabilidade para a configuração PG (maior consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO).

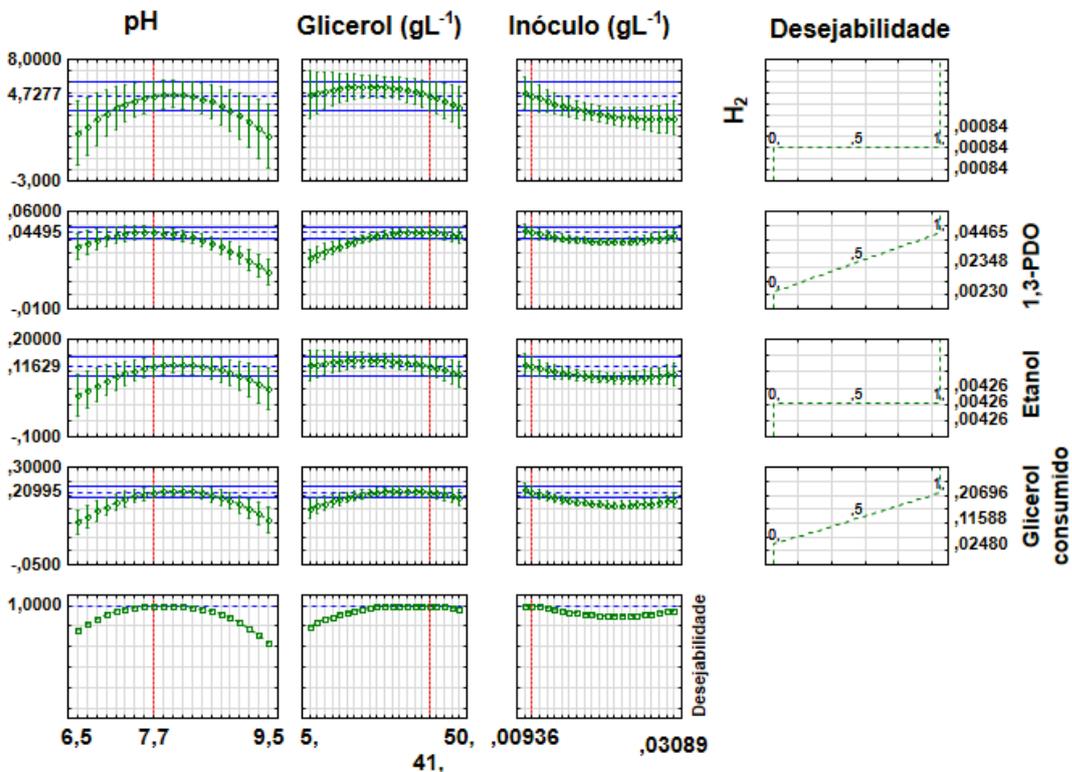
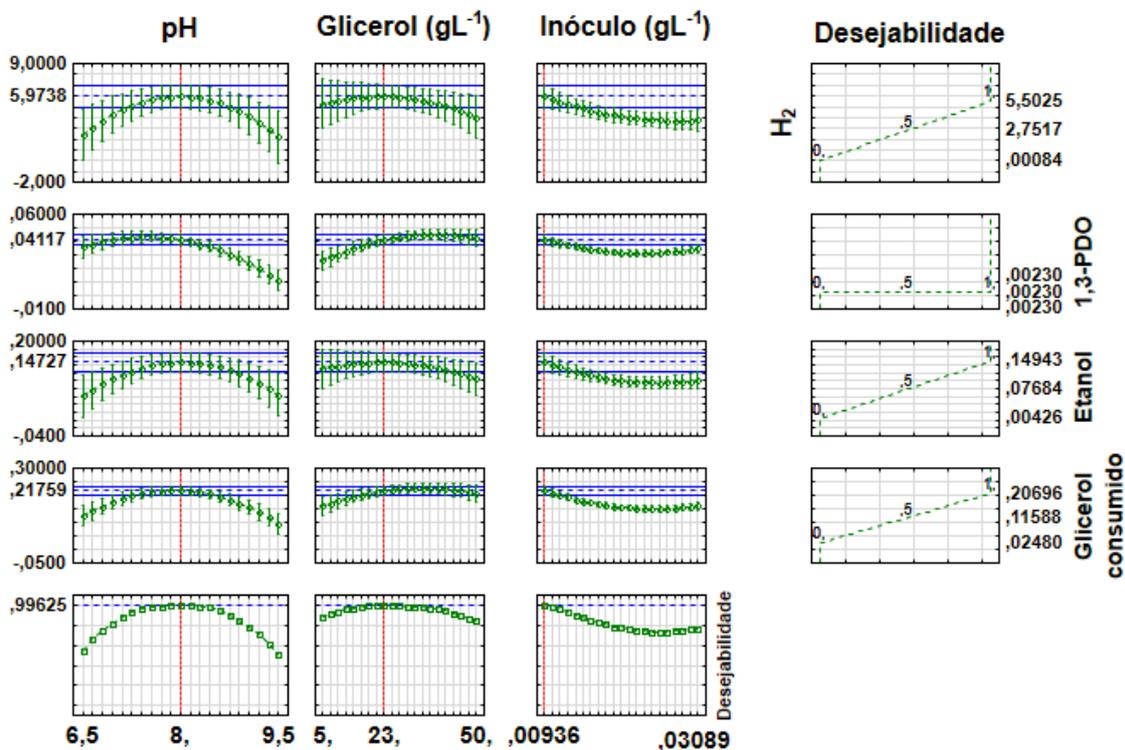


Figura 29. Análise de desejabilidade para a configuração HEG (maior consumo de glicerol e produção de etanol e H₂).



Como pode ser visto nas figuras 27 a 29, a ferramenta de desejabilidade confronta as superfícies de resposta obtidas para cada variável resposta e encontra o melhor valor de interseção para as variáveis, de modo a fornecer os valores otimizados para cada configuração desejada. A análise da tabela 17 mostra que as três condições apresentaram resultados correspondentes ao que foi estipulado pela desejabilidade, ou seja, a configuração HEPG exibiu rendimentos intermediários para todos os produtos de interesse, a configuração PG apresentou o maior rendimento para 1,3-PDO e a configuração HEG exibiu os maiores rendimentos de hidrogênio e etanol. Interessantemente, a inclusão do parâmetro consumo de glicerol entre os fatores da análise de desejabilidade permitiu que as concentrações finais de cada composto em cada uma das configurações avaliadas fossem correspondentes ao seu rendimento.

Em outras palavras, o uso dessa estratégia permitiu um maior aproveitamento do glicerol consumido para a produção dos compostos de interesse. Em relação aos melhores resultados obtidos nos ensaios do planejamento experimental, a concentração final de etanol (na configuração HEG) e 1,3-PDO (na configuração PG) foi aumentada em 10 e 30 %, respectivamente. Além disso, a produção de H₂ (na configuração HEG) aumentou em 62 % (de 5,50 mmol para 8,90 mmol). Nossa busca na literatura revelou que, apesar

do seu uso em processos físico-químicos para a obtenção de diferentes produtos, essa é a primeira vez que a função de desejabilidade é empregada em um processo biológico de conversão do glicerol.

Mais uma vez, para auxiliar no entendimento das razões metabólicas que levaram aos resultados encontrados, uma análise cinética dos demais compostos foi realizada e as concentrações de cada metabólito em diferentes intervalos da fermentação são mostradas na figura 30. Como pode ser visto, o consumo de glicerol apresentou um perfil similar para as três configurações e ocorreu principalmente até as 24 primeiras horas de fermentação. Entre 24 e 48 horas, alterações mínimas na concentração de glicerol foram notadas, assim como ocorreu para alguns dos demais compostos. O consumo médio de substrato pelas três configurações ficou por volta de 21.700 mgL^{-1} , uma quantidade considerável de glicerol que foi retirada do meio quando comparada a outros trabalhos. O monitoramento da fermentação foi realizado até as 48 horas visto que, em condições otimizadas, alguns autores relatam a produção do composto de interesse mesmo após a interrupção do crescimento microbiano (COFRÉ *et al.*, 2012).

Chantoom e colaboradores (2014), estudando a conversão de glicerol a etanol por uma linhagem de *E. aerogenes* com uma concentração inicial de substrato de $20,00 \text{ gL}^{-1}$, observaram um consumo de $18,40 \text{ gL}^{-1}$ após 40 horas de fermentação. Esse também foi o tempo necessário para o consumo completo de $10,00 \text{ gL}^{-1}$ de glicerol por uma cultura mista obtida de reator UASB estudada por Vikromvarasiri e colaboradores (VIKROMVARASIRI *et al.*, 2016). Os mesmos autores observaram que o tempo necessário para o consumo completo de $25,00 \text{ gL}^{-1}$ de glicerol, uma quantidade ligeiramente superior a alcançada em nosso trabalho, necessitou de um intervalo de 56 horas de fermentação. A velocidade de consumo de glicerol apresentada pelo isolado 9R apresenta uma grande diferença positiva quando comparada às velocidades exibidas por linhagens de *E. coli*. Cofré e colaboradores (2016), ao trabalharem com uma concentração máxima de $10,00 \text{ gL}^{-1}$ de glicerol em reatores em batelada, observaram que apenas 65 % do substrato foi consumido após 118 horas de fermentação por *E. coli* MG1655. Como apresentado anteriormente, Tran e colaboradores (2014), ao trabalharem com a mesma concentração inicial de glicerol, observaram um consumo de apenas 40 % do substrato após 120 horas de fermentação por *E. coli* BW25113 geneticamente modificada. Além desses trabalhos, Soo e colaboradores (2017), também ao estudar a fermentação do glicerol a $10,00 \text{ gL}^{-1}$ observaram que a linhagem de *E. coli* SS1 consumiu aproximadamente 80% do substrato após 72 horas.

Tabela 17. Condições determinadas pela ferramenta de desejabilidade e quantidades médias dos produtos obtidos e glicerol consumido para cada configuração com 24 horas de fermentação. **HEPG:** maior consumo de glicerol e produção equilibrada de H₂, etanol e 1,3-PDO; **PG:** maior consumo de glicerol e favorecimento da produção de 1,3-PDO; e **HEG:** maior consumo de glicerol e favorecimento da produção de H₂ e etanol.

Ensaio	pH	Glicerol		Glicerol		Hidrogênio		Etanol		1,3-PDO			
		inicial (gL ⁻¹)	Inóculo (gL ⁻¹)	consumido mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	mmol	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	Y _{P/S}
HEPG	7,85	27,50	0,009	21.943,64	238,28	8,02	0,22	6589,63	143,04	0,60	3.963,32	52,09	0,22
PG	7,70	41,00	0,009	20.546,98	223,11	4,19	0,13	3559,54	77,26	0,35	4.434,99	58,29	0,26
HEG	8,00	23,00	0,009	22.543,32	244,79	8,91	0,24	7568,57	164,28	0,67	3.509,30	46,12	0,19

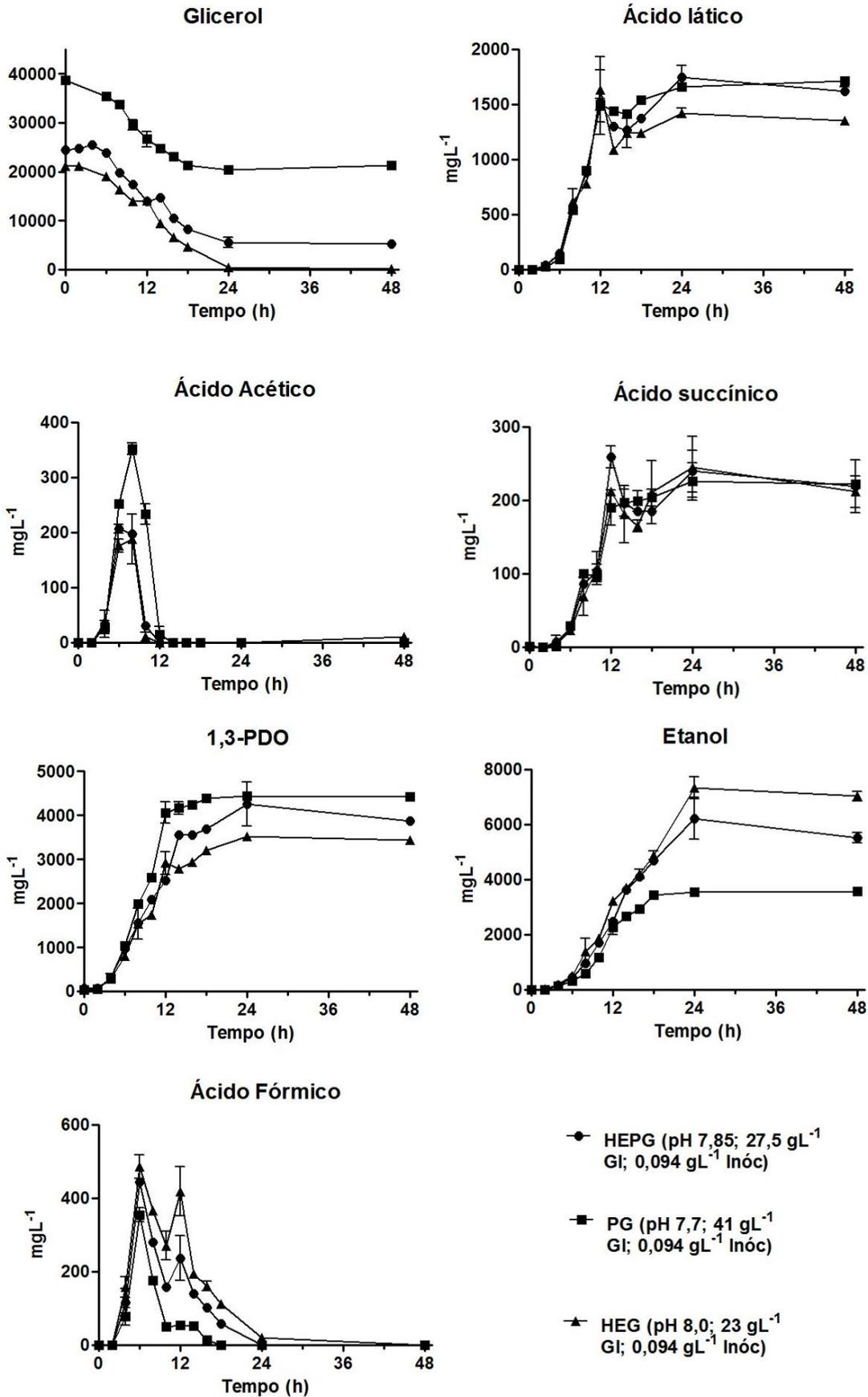
Ensaio	Ácido succínico			Ácido láctico			Ácido acético			Ácido fórmico		
	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	Y _{P/S}	mgL ⁻¹	mmolL ⁻¹	Y _{P/S}
HEPG	239,53	2,03	0,01	1.744,34	19,36	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PG	225,67	1,91	0,01	1.658,21	18,41	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HEG	245,41	2,08	0,01	1.423,18	15,80	0,06	0,00	0,00	0,00	19,60	0,43	0,00

Logicamente, existem outros trabalhos que observaram consumos muito superiores ao do isolado 9R. Como exemplo, Adnan e colaboradores (ADNAN *et al.*, 2014), sob condições otimizadas, reportaram a capacidade de consumo praticamente completo de 45,00 gL⁻¹ de glicerol pela linhagem de *E.coli* SS1 em 120 horas de fermentação. Além disso, a linhagem *K. pneumoniae* GLC29 mostrou um consumo de 40,00 gL⁻¹ de glicerol em menos de 12 horas de fermentação em batelada para a produção de 1,3-PDO (SILVA *et al.*, 2015). Apesar da grande variação de consumo encontrada, a comparação dos dados citados mostra que o desempenho do isolado 9R é compatível com os estudos sobre bioconversão do glicerol que figuram na literatura atual.

Interessantemente, a configuração PG removeu aproximadamente 20.500 mgL⁻¹ de glicerol em 24 horas, restando no meio aproximadamente a mesma quantidade. Considerando a concentração inicial de glicerol empregada na configuração HEG (23.000,00 mgL⁻¹) e o consumo praticamente completo do substrato (98 %) desse ensaio em 24 horas, esses resultados levantam a possibilidade do emprego dessas duas configurações em sequência (em reatores contínuos; fermentação em batelada em duplo estágio; através da reciclagem do meio; ou por controle do pH), possibilitando o tratamento de mais de 40,00 gL⁻¹ de glicerol em 48 horas. Algumas tentativas foram efetuadas a fim de avaliar experimentalmente essa suposição, porém, devido à problemas de ordem técnica, a realização desses ensaios foi impossibilitada.

Entre os ácidos orgânicos, o ácido succínico não apresentou diferenças significativas de concentração ou de comportamento de produção/consumo entre as três configurações testadas, da mesma forma já observada durante os ensaios do planejamento experimental. O ácido acético apresentou um comportamento de produção/consumo muito similar entre as três configurações. No entanto, o maior valor de concentração para esse ácido, mesmo sendo um derivado de acetyl-CoA, foi encontrada para a condição PG, a qual favoreceu a produção de 1,3-PDO (composto derivado de outro precursor), mostrando a possibilidade de manipulação dissociada de cada via por meio da modificação das três variáveis testadas. Outro composto que apresentou um perfil parecido para as três configurações foi o ácido láctico, o qual exibiu concentrações levemente inferiores para a condição HEG em comparação às outras duas, provavelmente pelo desfavorecimento da ação da enzima lactato desidrogenase nessas condições.

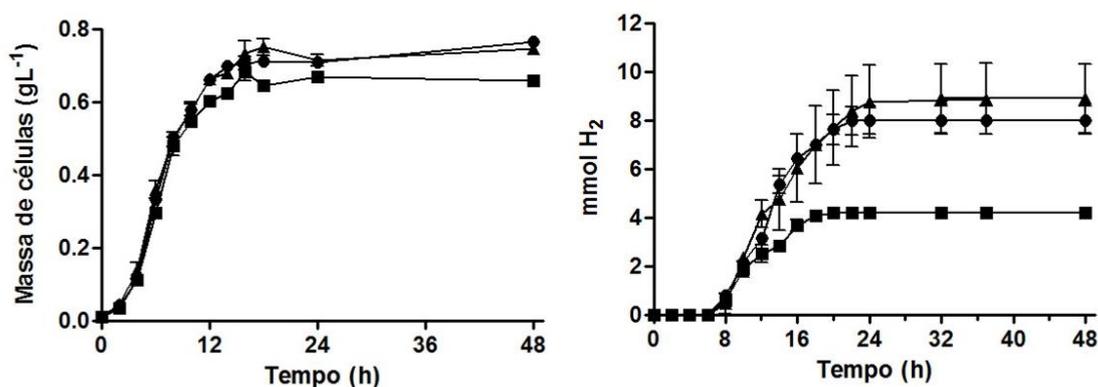
Figura 30. Curvas de concentração dos metabólitos solúveis nas configurações HEPG (●), PG (■) e HEG (▲) durante as 48 horas de fermentação.



Assim como ocorreu para o consumo de glicerol, as maiores variações na concentração de 1,3-PDO e etanol ocorreram até as 24 horas de fermentação para as três configurações. Via de regra, o perfil de produção desses compostos seguiu o que foi previsto pela função de desejabilidade. Interessantemente, entre 24 e 48 horas houve uma queda na concentração de etanol (para as condições HEPG e HEG) e 1,3-PDO (para a condição HEPG), indicando que o tempo ótimo para a produção desses compostos é de aproximadamente 24 horas. Segundo Cintolesi e colaboradores (2012), a diminuição na concentração de etanol pode estar relacionada ao consumo desse produto pelo próprio micro-organismo produtor ou à evaporação em concentrações acima de 88 mM (aproximadamente 4,00 gL⁻¹). A hipótese de evaporação pode ser considerada, visto que para a condição PG, com concentração de etanol inferior a 4,00 gL⁻¹, a quantidade desse álcool se manteve inalterada entre 24 e 48 horas. Por outro lado, a possibilidade de consumo dos compostos não deve ser descartada, considerando que a concentração de 1,3-PDO, um composto muito menos volátil que o etanol, também diminuiu nesse intervalo para a condição HEPG.

As configurações HEPG e HEG apresentaram perfis de produção/consumo muito similares para o ácido fórmico, o qual foi encontrado no meio até as 18 horas de fermentação para a primeira e até as 24 horas para a segunda. Já para a configuração PG, além das menores concentrações de ácido fórmico apresentadas, esse composto desapareceu do meio entre 2 a 4 horas antes do que para a condição HEPG. Tais variações no tempo de esgotamento do ácido fórmico explicam o maior intervalo de produção exponencial de H₂ para as condições HEPG e HEG em relação à configuração PG, como pode ser visto, juntamente às curvas de crescimento, na figura 31.

Figura 31. Crescimento e produção de hidrogênio pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R nas configurações HEPG (●), PG (■) e HEG (▲) durante as 48 horas de fermentação.



Quanto ao crescimento do isolado 9R (Figura 31), esse foi levemente superior nas condições HEPG e HEG, sendo as duas também as maiores produtoras de H₂. Como visto, as configurações HEPG e HEG cessaram a produção de H₂ entre 22 e 24 horas, enquanto a condição PG encerrou a produção de hidrogênio entre 18 e 20 horas. Uma análise mais aprofundada dos motivos que levaram a essa maior “permanência” do ácido fórmico poderia auxiliar no aumento do tempo de produção de H₂ pelo isolado 9R.

A análise dos dados de produção de H₂ pelo modelo modificado de Gompertz (Tabela 18) em comparação aos resultados de rendimento (Tabela 17) mostrou uma correlação entre rendimento e velocidade de produção de H₂, além do que, nessa etapa, esses fatores foram aliados à uma maior produção do composto.

Tabela 18. Dados obtidos com o modelo modificado de Gompertz e produção máxima de hidrogênio pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R para as diferentes configurações determinadas pela função de desejabilidade.

Ensaio	Produção acumulada (experimental) de H₂ (mmol)	P_o Produção máxima de H₂ (mmol)	R_m Taxa de produção de H₂ (mmol h⁻¹)	λ Fase lag (horas)	R²
HEPG	8,02	8,15	0,87	7,80	0,9975
PG	4,19	4,25	0,48	6,69	0,9940
HEG	8,91	9,04	0,76	7,28	0,9957

Por fim, com base nos dados apresentados nessa seção, foram calculados outros parâmetros, mostrados na tabela 19, que podem ser usados para a aplicação dos resultados obtidos em nosso estudo em trabalhos posteriores de otimização ou desenvolvimento de reatores em maior escala para a produção de etanol e hidrogênio. Quando analisada a configuração HEG, a melhor condição para a produção de etanol, pode ser observado o potencial de produção de até 0,334 kg (ou 0,423 L) de etanol por kg de glicerol consumido. Yazdani e Gonzalez (2008), ao trabalharem com as linhagens geneticamente modificadas de *E. coli* SY03 e SY04 encontraram rendimentos mássicos entre 0,450 e 0,510 kg (ou 570 e 0,646 L) de etanol/kg glicerol. No entanto, o tempo de obtenção desses resultados foi muito superior ao apresentado em nosso trabalho, chegando às 120 horas de fermentação e a concentração inicial de substrato foi de apenas 10,00 gL⁻¹. Trinh e Srienc (2009), também ao trabalharem com diferentes linhagens de *E. coli* modificadas,

observaram resultados variando de 0,310 a 0,490 kg (ou 0,393 a 0,621 L) de etanol/kg glicerol. Nesse caso, o tempo de fermentação ficou entre 48 e 72 horas e a concentração inicial de glicerol foi de 40,00 gL⁻¹, sendo o substrato consumido praticamente em sua totalidade nesse intervalo.

Quanto às taxas de produção de hidrogênio, Varrone e colaboradores (2012), ao trabalharem com uma cultura mista tratando 15,00 gL⁻¹ de glicerol bruto, observaram uma taxa máxima de produção de 2.191 mL H₂ L⁻¹ dia⁻¹ (aproximadamente 0,091 L H₂ L⁻¹ h⁻¹), valor inferior às taxas obtidas nas configurações HEPG e HEG, de 0,130 e 0,114 L H₂ L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Os valores de taxa máxima de produção de hidrogênio encontrados para o isolado 9R nessas duas configurações também foram superiores ao valor de 0,89 L H₂ L⁻¹ dia⁻¹ (aproximadamente 0,037 L H₂ L⁻¹ h⁻¹) encontrado para uma co-cultura de *E. aerogenes* NRRL B-407 e *C. butyricum* NRRL B-41122 por Pachapur e colaboradores (2017) em um reator semi-contínuo alimentado com 20,00 gL⁻¹ de glicerol residual. Por outro lado, Maru e colaboradores (2016), em um estudo com uma co-cultura de *E. coli* CECT 432 e *Enterobacter* sp. H1, observaram os valores de taxa máxima de produção de 8,5 e 15,8 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹ (aproximadamente 0,190 e 0,354 L H₂ L⁻¹ h⁻¹) no tratamento de 20,3 e 26,7 gL⁻¹ de glicerol puro e bruto, respectivamente, os quais se mostraram muito superiores aos encontrados em nosso trabalho.

No que diz respeito ao etanol, a produção específica obtida pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R na configuração HEG (13,426 L kg células⁻¹) foi superior ao encontrado por Valle e colaboradores (2017) para uma linhagem de *E. coli* BW25113 geneticamente modificada, a qual apresentou rendimento específico máximo de aproximadamente 160 mmol de etanol por grama de células (aproximadamente 9,342 L kg células⁻¹). Por outro lado, o rendimento específico de hidrogênio encontrado no mesmo trabalho foi similar ao do etanol, de 160 mmol de H₂ por grama de células, o equivalente a cerca de 3590 L H₂ kg células⁻¹, valor quase 2 vezes superior ao encontrado para a melhor condição apresentada em nosso trabalho. Vale ressaltar que os dados apresentados por Valle e colaboradores (2017) foram obtidos após 48 horas de fermentação e que a concentração inicial de glicerol utilizada foi de 10,00 gL⁻¹. Em um trabalho com uma cultura mista tratando 50,00 gL⁻¹ de glicerol, Sittijunda e Reungsang (2017) relataram a produção de 134,2 mmol de H₂ por 2,8 g de sólidos suspensos voláteis (aproximadamente 1075 L H₂ kg células⁻¹). Cofré e colaboradores (2016), empregando a linhagem de *E. coli* MG1655 para o consumo de 10,00 gL⁻¹ de glicerol, observaram uma produção de

aproximadamente 4,00 g L⁻¹ de etanol por 0,25 gL⁻¹ de células (o equivalente a cerca de 20,00 L de etanol por kg de células) em 120 horas.

Tabela 19. Rendimentos de etanol e hidrogênio e taxa volumétrica de produção de hidrogênio após 24 horas de fermentação do glicerol por *Enterobacter* sp. 9R.

Ensaio	Etanol			L.L ⁻¹ h ⁻¹	H ₂	
	kg.kg glicerol ⁻¹	L.kg glicerol ⁻¹	L.kg células ⁻¹		L.kg glicerol ⁻¹	L.kg células ⁻¹
HEPG	0,261	0,331	11,793	0,130	54,602	1.693,577
PG	0,173	0,220	6,740	0,072	30,484	935,820
HEG	0,334	0,423	13,426	0,114	59,039	1.866,209

A fim de contextualizar nossos dados com o que é exposto na literatura para a produção de H₂ e etanol, encontram-se reunidos na tabela 20 dados de diferentes trabalhos que também analisaram esses fatores. Como pode ser visto, a variabilidade entre os resultados apresentados na literatura ainda é muito grande, fato que ressalta a necessidade de trabalhos na área. Além disso, a comparação dos dados da tabela 20 mostra que o isolado *Enterobacter* sp. 9R apresenta potencial similar ao apresentado por outras culturas estudadas para os mesmos propósitos.

Tabela 20. Resultados obtidos para a produção de hidrogênio e/ou etanol por diferentes sistemas e culturas para a fermentação em batelada do glicerol.

Cultura	Glicerol / (gL ⁻¹)	Consumo gL ⁻¹ (%)	Produtos						Tempo (h)	Referência
			Hidrogênio		Etanol					
			mL L ⁻¹	mmol L ⁻¹	Y _{P/S}	gL ⁻¹	mmol L ⁻¹	Y _{P/S}		
<i>E. aerogenes</i> HU-101	Puro / 25,0	25,0 / (100 %)	4.992,2*	225,6*	0,82	10,0*	217,2*	0,56	12,0	(ITO <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. aerogenes</i> HU-101	Res. / 25,0	25,0 / (100 %)	4.322,5*	192,7*	0,71	7,0*	152,0*	0,80	> 48,0	(ITO <i>et al.</i> , 2005)
<i>Klebsiella sp.</i> HE1	Puro / 50,0	50,0 / (100 %)	4.593,3*	204,8*	0,35	12,2	264,8*	0,49	> 35,0	(WU, K. J. <i>et al.</i> , 2011)
<i>E. aerogenes</i> KKU-S1	Res. / 31,2	13,3* / (42,6 %)*	389,1*	17,3	0,12	5,5	120,0	0,83	**	(REUNGSANG <i>et al.</i> , 2013)
<i>E. coli</i> SS1	Puro / 34,5	31,55 * (91,4%)	NA	NA	NA	15,7	340,3*	0,99	96,0	(ADNAN <i>et al.</i> , 2014)
Cultura mista	Res. / 15,0	14,7* (97,7 %)	3.365,0*	150,0*	0,94	7,9	171,5*	1,00	**	(VARRONE <i>et al.</i> , 2012)
K. pneumoniae	Puro ou Res. / 20,0	**	NA	NA	NA	< 2,0	***	***	**	(MU <i>et al.</i> , 2006)

<i>E. coli</i> K-12 MG1655	Puro / ≈12,0	≈10,5* / (87,5)*	NA	NA	NA	≈9,0	195,3*	1,71*	≈100,0	(COFRÉ <i>et al.</i> , 2012)
<i>E. aerogenes</i>	Puro / 20,0	18,4 (92%)	NA	NA	NA	6,3	136,7	0,7	40,0	CHANTOOM <i>et al.</i> , 2014
<i>E. aerogenes</i>	Res. / 15,0	**	***	***	0,96	***	***	0,90	**	(JITRWUNG e YARGEAU, 2015)
<i>E. aerogenes</i> ATCC 29007	Res. / 12,0	**	NA	NA	NA	4,96	107,7*	0,83	**	(LEE <i>et al.</i> , 2017)
Cultura mista	Res. / 1,0	**	***	***	1,42	NA	NA	NA	**	(MANGAYIL <i>et al.</i> , 2015)
<i>E. coli</i> e <i>E. aerogenes</i>	Puro / 20,3*	17,7* (87,3 %)*	3.774,4*	168,3	1,26	7,83*	170,0	0,88	120,0	(MARU <i>et al.</i> , 2016)
<i>E. coli</i> e <i>E. aerogenes</i>	Res. / 26,7*	16,8* (62,9 %)*	6.250,4*	278,7	1,53	10,22*	222,0	1,21	120,0	(MARU <i>et al.</i> , 2016)
Cultura mista	Res. / 3,0	1,7* (56,2 %)	339,5*	15,1	0,80	NA	NA	0,96*	54,8	(RODRIGUES <i>et al.</i> , 2018)

<i>Enterobacter</i> sp.	Res. / 3,7	3,2* / (88,0 %)	101,6*	4,5	0,13	0,8	17,6	0,18*	90,0	(RODRIGUES <i>et al.</i> , 2018)
<i>E. coli</i> SS1	Puro / 10,0	7,3 / (73,0 %)	1.066,7*	43,7*	0,57	3,2	69,5*	0,88	48,0	(SOO <i>et al.</i> , 2017)
<i>E. coli</i> SS1 superexpres. <i>hybC</i>	Puro / 10,0	7,6 / (76,0 %)	146,7*	6,0*	0,14	2,4	52,1	0,64	48,0	(SOO <i>et al.</i> , 2017)
<i>E. coli</i> BW25113	Puro / 10,0	**	53,7	2,2	**	NA	NA	NA	**	(TRCHOUNIAN <i>et al.</i> , 2016)
<i>Enterobacter</i> sp. 9R	Puro / 27,5	21,9 / (79,8 %)	1.199,8	53,5	0,22	6,6	143,04	0,60	24,0	Este trabalho
<i>Enterobacter</i> sp. 9R	Puro / 41,0	20,5 / (50,1 %)	625,7	27,9	0,13	3,6	77,26	0,35	24,0	Este trabalho
<i>Enterobacter</i> sp. 9R	Puro / 23,0	22,5 / (98,0 %)	1.332,2	59,4	0,24	7,6	164,28	0,67	24,0	Este trabalho

Onde: NA: não analisado no trabalho de referência; *: calculado pelo autor a partir dos dados fornecidos no trabalho de referência; **: não informado no trabalho de referência; e ***: impossível de ser calculado apenas com os dados fornecidos no trabalho de referência. Para os cálculos de volume de hidrogênio foram utilizados os parâmetros de condições normais de temperatura e pressão (CNTP).

CAPÍTULO 5

5.1. Conclusões

Após o isolamento e os testes com diferentes concentrações iniciais de substrato, com 14,00 gL⁻¹ de glicerol inicial, o isolado 9R apresentou taxa máxima de produção de H₂ de 1,64 mmol/hora, produção máxima de H₂ de 12,60 mmol e consumo total do glicerol em menos de 24 horas. Juntos à concentração máxima de etanol (4,18 gL⁻¹) apresentada pelo 9R, esses valores superaram os apresentados pelo isolado 3R, justificando, dessa forma, a seleção do isolado 9R para os demais estudos realizados. Dentro das condições testadas, concentrações iniciais de glicerol superiores a 27,50 gL⁻¹ causaram a inibição do consumo completo de substrato. Os resultados sobre os efeitos de diferentes concentrações de glicerol sobre o metabolismo do isolado 9R revelaram que a inibição da fermentação imposta por altas concentrações de glicerol é provavelmente resultado de ação conjunta de substrato e produtos (ou intermediários) e, ao que parece, sua causa não está diretamente relacionada à quantidade de glicerol consumido, mas à quantidade de glicerol presente no meio. De maneira geral, quanto mais alta a concentração inicial de glicerol maior o direcionamento do carbono consumido para a geração de 1,3-PDO e ácido láctico e menor a produção de H₂ e etanol.

Dentre os parâmetros da fermentação que foram analisados, as variáveis pH, concentração inicial de glicerol e volume de inóculo apresentaram influência sobre a conversão do glicerol pelo isolado *Enterobacter* sp. 9R, sendo que os melhores valores encontrados para a conversão de glicerol a H₂ e etanol foram: pH 8,00; glicerol inicial 23,00 gL⁻¹; e inóculo 0,009 gL⁻¹. Nessas condições, os valores para a produção de H₂ e concentração de etanol foram de 8,91 mmol e 7,6 gL⁻¹, respectivamente.

Por fim, a combinação do planejamento experimental pela matriz de Doehlert com a função de desejabilidade possibilitaram melhorias do consumo de glicerol e da obtenção de H₂ e etanol pela linhagem *Enterobacter* sp. 9R. Em comparação a outras culturas reportadas na literatura, nosso isolado apresentou-se como um micro-organismo apto a estudos sobre metabolismo e obtenção de produtos a partir da fermentação do glicerol. Dessa forma, os resultados apresentados em nosso trabalho se mostram úteis ao desenvolvimento de novas estratégias para o aproveitamento do glicerol por biorrefinarias de biodiesel.

5.2. Sugestões para Pesquisas Futuras

- Visando a otimização da conversão de glicerol a H_2 , a hipótese de que mecanismos não relacionados diretamente com o consumo de glicerol podem determinar as vias de transformação desse substrato levanta a possibilidade de estudos de deleção/supereexpressão/modificação de genes relacionados à “percepção” desse carboidrato por micro-organismos.
- Com o uso do planejamento experimental de Doehlert e a função de desejabilidade, outros parâmetros da fermentação (como: temperatura, agitação, concentração e fonte de nitrogênio e razão carbono/nitrogênio) podem ser otimizados para se obter melhores resultados de produção de H_2 .
- Visto a capacidade de consumo de ácido lático e formação de ácido acético pelo isolado 9R em condições de aerobiose, o consumo aeróbio do meio pós fermentação poderia reduzir a toxicidade do mesmo e aumentar a produção de H_2 e etanol.
- Em condições de aerobiose também existe a possibilidade de exploração da produção de biofloculantes pelo isolado 9R.
- Os resultados também servem como base para o desenvolvimento de reatores contínuos ou processos em duplo-estágio para a fermentação do glicerol a H_2 e etanol.

Referências Bibliográficas

- ABO-HASHESH, M.; HALLENBECK, P. C. Fermentative Hydrogen Production. In: HALLENBECK, P. C. (Org.). *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*. 1. ed. New York, NY: Springer New York, 2012. p. 77–92.
- ADNAN, N. A. A. *et al.* Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. *Renewable Energy*, v. 66, p. 625–633, 2014.
- AIVASIDIS, A.; DIAMANTIS, V. I. Biochemical Reaction Engineering and Process Development in Anaerobic Wastewater Treatment. p. 49–76, 2005.
- ALSAMAD, T. *et al.* Modeling of Thermochemical Conversion of Glycerol: Pyrolysis and H₂O and CO₂ Gasification. *Waste and Biomass Valorization*, v. 9, n. 12, p. 2361–2371, 2018.
- ARGUN, H. *et al.* Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 7, p. 1813–1819, 2008.
- AZAPAGIC, A. Sustainability considerations for integrated biorefineries. *Trends in biotechnology*, v. 32, n. 1, p. 1–4, jan. 2014.
- BAËTA, B. E. L. *et al.* Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates by two-stage anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*, v. 218, p. 436–446, 2016.
- BARBIRATO, F. *et al.* 3-Hydroxypropionaldehyde, an Inhibitory Metabolite of Glycerol Fermentation to 1,3-Propanediol by Enterobacterial Species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 4, p. 3–7, 1996.
- BARBIRATO, F. *et al.* Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitations and regulations. *Microbiology (Reading, England)*, v. 143 (Pt 7, n. 1 1997, p. 2423–32, jul. 1997.
- BARBIRATO, F.; SOUCAILLE, P.; BORIES, A. Physiologic mechanisms involved in accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 4405–4409, 1996.
- BARRICK, J. E. *et al.* Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature*, v. 461, n. 7268, p. 1243–1247, 2009.
- BARRICK, J. E.; LENSKI, R. E. Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics*, v. 14, n. 12, p. 827–839, 2013.

- BELENGUER, A. *et al.* Rates of production and utilization of lactate by microbial communities from the human colon. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 77, n. 1, p. 107–119, 2011.
- BEVILACQUA, A. *et al.* Characterization and implications of *Enterobacter cloacae* strains, Isolated from Italian table olives “bella di cerignola”. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 1, p. 53–60, 2010.
- BERIKTEN, D; KIVANC, M. Optimization of solid-state fermentation for phytase production by *Thermomyces lanuginosus* using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 44, n. 8, p. 834–848, 2014.
- BIDLAS, E.; DU, T.; LAMBERT, R. J. W. An explanation for the effect of inoculum size on MIC and the growth/no growth interface. *International Journal of Food Microbiology*, v. 126, n. 1–2, p. 140–152, 2008.
- BIELLEN, A. *et al.* Biohydrogen Production by the Thermophilic Bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*: Current Status and Perspectives. *Life*, v. 3, n. 1, p. 52–85, 17 jan. 2013.
- BUŁKOWSKA, K. *et al.* Kinetic parameters of volatile fatty acids uptake in the ADM1 as key factors for modeling co-digestion of silages with pig manure, thin stillage and glycerine phase. *Renewable Energy*, v. 126, p. 163–176, 2018.
- CAI, G. *et al.* Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, n. 13, p. 6681–6690, jul. 2010.
- CAI, G. *et al.* Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology advances*, v. 29, n. 4, p. 375–87, 2011.
- CAROSIA, M. F. *et al.* Influence of C/P and C/N ratios and microbial characterization in hydrogen and ethanol production in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, n. 15, p. 9600–9610, 2017.
- CAVALHEIRO, J. M. B. T. *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 509–515, 2009.
- CHA, M. *et al.* Metabolic engineering of *Caldicellulosiruptor bescii* yields increased hydrogen production from lignocellulosic biomass. *Biotechnology for biofuels*, v. 6, n. 1, p. 85, jan. 2013.
- CHANTOOM, K.; VIKROMVARASIRI, N.; PISUTPAISAL, N. Kinetics of bioethanol production from glycerol by *enterobacter aerogenes*. *Energy Procedia*, v. 61, p. 2244–2248, 2014.

- CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 95, n. 1, p. 13–27, jul. 2012.
- CHAUDHARY, N. Biosynthesis of Ethanol and Hydrogen by Glycerol Fermentation using *Escherichia coli*. *Advances in Chemical Engineering and Science*, v. 01, n. 03, p. 83–89, 2011.
- CHEN, X. *et al.* Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, n. 4, p. 386–394, set. 2003.
- CHEN, X. *et al.* Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, n. 4, p. 539–549, mar. 2006.
- CHEN, Y. H.; WALKER, T. H. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnology Letters*, v. 33, p. 1973–1983, 2011.
- CHENG, H.-R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology letters*, v. 28, n. 1, p. 55–9, jan. 2006.
- CHONG, M. *et al.* Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 8, p. 3277–3287, 2009.
- CHOOKAEW, T.; PRASERTSAN, P.; REN, Z. J. Two-stage conversion of crude glycerol to energy using dark fermentation linked with microbial fuel cell or microbial electrolysis cell. *New biotechnology*, v. 31, n. 2, p. 179–84, 25 mar. 2014.
- CINTOLESI, A. *et al.* Quantitative analysis of the fermentative metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, v. 109, n. 1, p. 187–98, jan. 2012.
- CLARK, D. P. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*, v. 5, p. 223–34, 1989.
- CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in biotechnology*, v. 31, n. 1, p. 20–8, jan. 2013.
- COFRÉ, O. *et al.* Optimization of culture media for ethanol production from glycerol by *Escherichia coli*. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p. 275–281, 2012.
- COFRÉ, O. *et al.* Pilot scale fed-batch fermentation in a closed loop mixed reactor for the biotransformation of crude glycerol into ethanol and hydrogen by *Escherichia coli* MG1655. *Biomass and Bioenergy*, v. 91, p. 37–47, 2016.

- CONVERTI, A.; PEREGO, P. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 303–309, 2002.
- COZZONE, A J. Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria. *Annu Rev Microbiol*, v. 52, p. 127–164, 1998.
- DA SILVA, G. P.; DE LIMA, C. J. B.; CONTIERO, J. Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. *Catalysis Today*, v. 257, n. P2, p. 259–266, 2015.
- DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology advances*, v. 27, n. 1, p. 30–9, 2009.
- DAMS, R. I. *et al.* Production of medium-chain carboxylic acids by anaerobic fermentation of glycerol using a bioaugmented open culture. *Biomass and Bioenergy*, v. 118, n. August 2016, p. 1–7, 2018.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 21, p. 6046–6057, nov. 2008.
- DEATHERAGE, D. E. *et al.* Specificity of genome evolution in experimental populations of *Escherichia coli* evolved at different temperatures. n. 4, 2017.
- DEL PILAR ANZOLA-ROJAS, M. *et al.* The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnology Reports*, v. 5, n. 1, p. 46–54, 2015.
- DELLOMONACO, C.; FAVA, F.; GONZALEZ, R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microbial cell factories*, v. 9, p. 3, jan. 2010.
- DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic Fermentation of Glycerol by *Escherichia coli* : A New Platform for Metabolic Engineering. 2006.
- DIKSHIT, P. K.; KHARMAWLONG, G. J.; MOHOLKAR, V. S. Investigations in sonication-induced intensification of crude glycerol fermentation to dihydroxyacetone by free and immobilized *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*, v. 256, p. 302–311, 2018.
- DILLS, S. S. *et al.* Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiological reviews*, v. 44, n. 3, p. 385–418, set. 1980.
- DING, M. Z. *et al.* Inoculum size-dependent interactive regulation of metabolism and stress response of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by comparative metabolomics.

Journal of Biotechnology, v. 144, n. 4, p. 279–286, 2009.

DOUNAVIS, A. S.; NTAIKOU, I.; LYBERATOS, G. Production of biohydrogen from crude glycerol in an upflow column bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 198, p. 701–708, 2015.

DURNIN, G. *et al.* Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, v. 103, n. 1, p. 148–61, 1 maio 2009.

DUTTA, K. Substrate Inhibition Growth Kinetics for Cutinase Producing *Pseudomonas cepacia* Using Tomato-peel Extracted Cutin. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 29, n. 3, p. 437–445, 2015.

DUTTA, T.; DAS, A. K.; DAS, D. Purification and characterization of [Fe] - hydrogenase from high yielding hydrogen-producing strain , *Enterobacter cloacae* IIT-BT08 (MTCC 5373). *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 17, p. 7530–7537, 2009.

FERREIRA, L. C. *et al.* Influence of thermal pretreatment on the biochemical methane potential of wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 143, p. 251–257, 2013.

FONG, S. S.; JOYCE, A. R.; PALSSON, B. Ø. Parallel adaptive evolution cultures of *Escherichia coli* lead to convergent growth *Genome Research*, n. 858, p. 1365–1372, 2005.

FOUNTOULAKIS, M. S.; MANIOS, T. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Bioresource technology*, v. 100, n. 12, p. 3043–7, jun. 2009.

GHOSE, T. K.; BHARGAVA, R.; BAJPAI, R. K. Purification of Sugars through Microbial Rejection. *Biotechnology and Bioengineering*, v. XIX, p. 605–610, 1977.

GHOSH, D.; BISAILLON, A.; HALLENBECK, P. C. Increasing the metabolic capacity of *Escherichia coli* for hydrogen production through heterologous expression of the *Ralstonia eutropha* SH operon. *Biotechnology for biofuels*, v. 6, n. 1, p. 122, jan. 2013.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for biofuels*, v. 1, n. 1, p. 6, jan. 2008.

GONG, Z. *et al.* Co-fermentation of acetate and sugars facilitating microbial lipid production on acetate-rich biomass hydrolysates. *Bioresource Technology*, v. 207, p. 102–108, 2016.

GOUESBET, G. *et al.* Osmotic repression of anaerobic metabolic systems in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 175, n. 1, p. 214–21, jan. 1993.

- GOYAL, Y.; KUMAR, M.; GAYEN, K. Metabolic engineering for enhanced hydrogen production: a review. *Canadian journal of microbiology*, v. 59, n. 2, p. 59–78, fev. 2013.
- GUWY, A. J. *et al.* Fermentative biohydrogen production systems integration. *Bioresource technology*, v. 102, n. 18, p. 8534–42, set. 2011.
- HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 17, p. 7379–7389, set. 2009.
- HALLENBECK, P. C. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, v. 52, n. 1–2, p. 21–9, jan. 2005.
- HALLENBECK, P. C.; ABO-HASHESH, M.; GHOSH, D. Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource technology*, v. 110, p. 1–9, abr. 2012.
- HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in biotechnology*, v. 27, n. 5, p. 287–97, maio 2009.
- HAN, J. *et al.* Hydrogen production from biodiesel byproduct by immobilized *Enterobacter aerogenes*. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 35, n. 1–2, p. 151–7, jan. 2012.
- HAN, W. *et al.* Biological fermentative hydrogen and ethanol production using continuous stirred tank reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 1, p. 843–847, jan. 2012.
- HANSEN, C. F. A *et al.* A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. p. 154–161, 2009.
- HOMANN, T. *et al.* Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 33, n. 2, p. 121–126, 1990.
- HU, H.; WOOD, T. K. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 391, n. 1, p. 1033–8, 1 jan. 2010.
- HU, S. *et al.* Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, n. 23, p. 5915–21, 13 jun. 2012.
- HUANG, J. *et al.* Cofactor recycling for co-production of 1,3-propanediol and glutamate by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Scientific Reports*, v. 7, n.

January, p. 1–10, 2017.

IMANDI, S.B. *et al.* Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p 1367-1372, 2007.

ITO, T. *et al.* Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 100, n. 3, p. 260–5, set. 2005.

JAWED, M. *et al.* Enhanced H₂ Production and Redirected Metabolic Flux via Overexpression of *fhlA* and *pncB* in *Klebsiella* HQ-3 Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 178, p. 1113–1128, 2016.

JITRWUNG, R.; YARGEAU, V. Biohydrogen and bioethanol production from biodiesel-based glycerol by *Enterobacter aerogenes* in a continuous stir tank reactor. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 5, p. 10650–10664, 2015.

JITRWUNG, R.; YARGEAU, V. Optimization of media composition for the production of biohydrogen from waste glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 16, p. 9602–9611, ago. 2011.

JUNG, K.-W. *et al.* Two-stage UASB reactor converting coffee drink manufacturing wastewater to hydrogen and methane. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 9, p. 7473–7481, maio 2012.

KAMAGATA, Y.; NARIHIRO, T. Symbiosis Studies in Microbial Ecology. *Microbes and environments*, v. 31, n. 3, p. 201–203, 2016.

KERR, B. J. *et al.* Digestible and metabolizable energy content of crude glycerin originating from different sources in nursery pigs. *Journal of Animal Science*, v. 87, n. 2002, p. 4042–4049, 2009.

KERR, B. J. *et al.* Utilization of Crude Glycerin in Nonruminants. 2009.

KHANAL, S. K. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production Principles and Applications*. [S.l: s.n.], 2008.

KHANNA, N. *et al.* Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. *Journal of Biotechnology*, v. 152, n. 1–2, p. 9–15, 2011.

KHETKORN, W. *et al.* Microalgal hydrogen production – A review. *Bioresource Technology*, v. 243, p. 1194–1206, 2017.

KOTHARI, R. *et al.* A critical review on factors influencing fermentative hydrogen production. *Frontiers in Bioscience*, v. 22, n. 8, p. 4542, 2017.

KUMAR, N.; GHOSH, A.; DAS, D. Redirection of biochemical pathways for the

- enhancement of H₂ production by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 537–541, 2001.
- KUROKAWA, T.; TANISHO, S. Effects of Formate on Fermentative Hydrogen Production by *Enterobacter aerogenes*. v. 118, n. October 2003, p. 112–118, 2005.
- LEE, D. H.; PALSSON, B. O. Adaptive evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 during growth on a nonnative carbon source, L-1,2-propanediol. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 13, p. 4158–4168, 2010.
- LEE, D.H.; JEONG I.J.; KIM, K.J. A desirability function method for optimizing mean and variability of multiple responses using a posterior preference articulation approach. *Quality and Reliability Engineering International*, v. 34, p. 360-376, 2018.
- LEE, S. J. *et al.* Effect of crude glycerol-derived inhibitors on ethanol production by *Enterobacter aerogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, p. 85–92, 2012.
- LEE, S. J. *et al.* Re-utilization of waste glycerol for continuous production of bioethanol by immobilized *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Cleaner Production*, v. 161, p. 757–764, 2017.
- LENG, L. *et al.* *Shaping microbial consortia in coupling glycerol fermentation and carboxylate chain elongation for Co-production of 1,3-propanediol and caproate: Pathways and mechanisms*. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2019. v. 148.
- LEONETI, A. B. *et al.* Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, v. 45, p. 138–145, 2012.
- LEONHARTSBERGER, S.; KORSA, I.; BO, A. The Molecular Biology of Formate Metabolism in Enterobacteria Further Reading. v. 4, p. 269–276, 2002.
- LI, C.; ADLER, J. *Escherichia coli* shows two types of behavioral responses to osmotic upshift. *Journal of Bacteriology*, v. 175, n. 9, p. 2564–2567, 1993.
- LI, C.; LESNIK, K.; LIU, H. Microbial Conversion of Waste Glycerol from Biodiesel Production into Value-Added Products. *Energies*, v. 6, n. 9, p. 4739–4768, 10 set. 2013.
- LIANG, Y. *et al.* Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 17, p. 6745–6750, 2010.
- LIN, C. Y.; LAY, C. H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30, n. 3, p. 285–292, 2005.
- LIN, C. Y.; LAY, C. H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen

- production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, n. 1, p. 41–45, 2004.
- LIU, B. *et al.* Optimizing the production of hydrogen and 1,3-propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 8, p. 3196–3205, 2013.
- LIU, D. *et al.* Perturbation of formate pathway and NADH pathway acting on the biohydrogen production. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- LO, Y.-C. *et al.* Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 35, p. 15815–15822, nov. 2013.
- LOVATO, G. *et al.* Hydrogen production by co-digesting cheese whey and glycerin in an AnSBBR: Temperature effect. *Biochemical Engineering Journal*, v. 138, p. 81–90, 2018.
- LU, Y. *et al.* Alteration of hydrogen metabolism of *ldh*- deleted *Enterobacter aerogenes* by overexpression of NAD (+) -dependent formate dehydrogenase. p. 255–262, 2010.
- LU, Y.; WANG, L.; *et al.* Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP). *Biochemical Engineering Journal*, v. 55, n. 1, p. 17–22, 2011.
- LU, Y.; ZHANG, C.; *et al.* Improved hydrogen production under microaerophilic conditions by overexpression of polyphosphate kinase in *Enterobacter aerogenes*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 48, n. 2, p. 187–192, 2011.
- LU, Y. *et al.* Perturbation of formate pathway for hydrogen production by expressions of formate hydrogen lyase and its transcriptional activator in wild *Enterobacter aerogenes* and its mutants. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 12, p. 5072–5079, 2009.
- LUO, G. *et al.* Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 18, p. 8700–8706, 2011.
- MA, C. W. *et al.* Characterization and cofactor binding mechanism of a novel NAD(P)H-dependent aldehyde reductase from *klebsiella pneumoniae* DSM2026. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 12, p. 1699–1707, 2013.
- MAIDAK, B. L. *et al.* The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Research*, v. 24, n. 1, p. 82–85, 1996.
- MANGAYIL, R. *et al.* Improved bioconversion of crude glycerol to hydrogen by

- statistical optimization of media components. *Renewable Energy*, v. 75, p. 583–589, 2015.
- MARKOV, S. A. Hydrogen Production in Bioreactors: Current Trends. *Energy Procedia*, v. 29, p. 394–400, jan. 2012.
- MARKOV, S. A.; AVERITT, J.; WALDRON, B. Bioreactor for glycerol conversion into H₂ by bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 1, p. 262–266, jan. 2011.
- MARTÍNEZ-MERINO, V.; GIL, M. J.; CORNEJO, A. Biological Hydrogen Production. In: GANDÍA, L. M.; ARZAMENDI, G.; DIÉGUEZ, P. M. (Org.). *Renewable Hydrogen Technologies: Production, Purification, Storage, Application and Safety*. 1. ed. New York, NY: Elsevier, 2013. p. 171–199.
- MARU, B. T. *et al.* Dark fermentative hydrogen and ethanol production from biodiesel waste glycerol using a co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter sp.* *Fuel*, v. 186, p. 375–384, 2016.
- MARU, B. T. *et al.* Glycerol fermentation to hydrogen by *Thermotoga maritima*: Proposed pathway and bioenergetic considerations. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 14, p. 5563–5572, maio 2013.
- MAZUMDAR, S. *et al.* Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.
- MEDEIROS, M. A.; LEITE, C. M. M. Chemical Conversion of Glycerol from Biodiesel into Products for Environmental and Technological Applications. In: KRESHOVA, D. (Org.). *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*. [S.l.: s.n.], 2011. p. 285–300.
- MENESES-REYES, J. C. *et al.* Oil-extracted *Chlorella vulgaris* biomass and glycerol bioconversion to methane via continuous anaerobic co-digestion with chicken litter. *Renewable Energy*, v. 128, p. 223–229, 2018.
- MERCER, J. H. West Antarctic Ice Sheet and CO₂ greenhouse effect: a threat of disaster. *Nature*, v. 271, p. 321–325, 1978.
- METSOVITI, M. *et al.* Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 12, p. 1872–1882, dez. 2012.
- MIR, M. A.; HUSSAIN, A.; VERMA, C. Design considerations and operational performance of anaerobic digester: A review. *Cogent Engineering*, v. 3, n. 1, p. 1–20,

2016.

MÖGLICH, A.; AYERS, R. A.; MOFFAT, K. Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure*, v. 17, p. 1282–1294, 2009.

MOHAMMADI, P. *et al.* Influences of Environmental and Operational Factors on Dark Fermentative Hydrogen Production: A Review. *Clean - Soil, Air, Water*, v. 40, n. 11, p. 1297–1305, 2012.

MONTEIRO, M. R. *et al.* Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 88, n. November 2017, p. 109–122, 2018.

MORAES, M. Lessons from Brazil. *Nature*, v. 474, p. S25, 2011.

MORRIS, B. E. L. *et al.* Microbial syntrophy: Interaction for the common good. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 3, p. 384–406, 2013.

MOSCOVIZ, R.; TRABLY, E.; BERNET, N. Consistent 1,3-propanediol production from glycerol in mixed culture fermentation over a wide range of pH. *Biotechnology for biofuels*, v. 9, p. 32, 2016.

MOTHES, G.; SCHNORPFEIL, C.; ACKERMANN, J. U. Production of PHB from crude glycerol. *Engineering in Life Sciences*, v. 7, n. 5, p. 475–479, 2007.

MU, Y. *et al.* Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 21, p. 1755–1759, 2006.

MURARKA, A. *et al.* Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 4, p. 1124–35, fev. 2008.

NAKASHIMADA, Y. *et al.* Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. v. 27, p. 1399–1405, 2002.

NAYLOR, R. L.; HIGGINS, M. M. The political economy of biodiesel in an era of low oil prices. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 77, n. April, p. 695–705, 2017.

NGUYEN, T. *et al.* Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 5, p. 1483–1488, mar. 2008.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. *Bioreaction Engineering Principles*. 2. ed. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

NIMJE, V. R. *et al.* Glycerol degradation in single-chamber microbial fuel cells. *Bioresource technology*, v. 102, n. 3, p. 2629–34, fev. 2011.

- NORDHAUS, W. D. To Slow or not to Slow: The Economics of the Greenhouse Effect. *The Economic Journal*, v. 101, p. 920–937, 1991.
- NUNES, R. P. *Avaliação da degradação anaeróbia do glicerol e prospecção de bactérias fermentativas*. 2014. 45 f. Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.
- NWACHUKWU, R. *et al.* Bioconversion of glycerol to ethanol by a mutant *Enterobacter aerogenes*. *AMB Express*, v. 2, n. 1, p. 20, jan. 2012.
- NWACHUKWU, R. E. S. *et al.* Optimization of cultural conditions for conversion of glycerol to ethanol by *Enterobacter aerogenes* S012. *AMB Express*, v. 3, n. 1, p. 12, jan. 2013.
- OOSAWA, K.; IMAE, Y. Demethylation of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Escherichia coli* induced by the repellents glycerol and ethylene glycol. *Journal of Bacteriology*, v. 157, n. 2, p. 576–581, 1984.
- OOSAWA, K.; IMAE, Y. Glycerol and ethylene glycol: Members of a new class of repellents of *Escherichia coli* chemotaxis. *Journal of Bacteriology*, v. 154, n. 1, p. 104–112, 1983.
- PACHAPUR, V. L. *et al.* Valorization of crude glycerol and eggshell biowaste as media components for hydrogen production: A scale-up study using co-culture system. *Bioresource Technology*, v. 225, p. 386–394, 2017.
- PADULA, A. D. *et al.* The emergence of the biodiesel industry in Brazil: Current figures and future prospects. *Energy Policy*, v. 44, p. 395–405, maio 2012.
- PARATE, R. *et al.* Mixed bacterial culture mediated direct conversion of bio-glycerol to diols. *Bioresource Technology*, v. 250, n. October 2017, p. 86–93, 2018.
- PATRA, M. *et al.* Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. *Biophysical journal*, v. 90, n. February, p. 1121–35, 2006.
- PEREGO, P.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, v. 89, n. 2, p. 125–131, 2003.
- PHILP, J. C.; GUY, K.; RITCHIE, R. J. Biofuels development and the policy regime. *Trends in biotechnology*, v. 31, n. 1, p. 4–6, jan. 2013.
- PI, J. *et al.* Mutational analysis of the hyc-operon determining the relationship between hydrogenase-3 and NADH pathway in *Enterobacter aerogenes*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 82, p. 1–7, 2016.
- PIN, C. *et al.* Network analysis of the transcriptional pattern of young and old cells of *Escherichia coli* during lag phase. *BMC systems biology*, v. 3, p. 108, 2009.

- PINSKE, C.; SARGENT, F. Exploring the directionality of *Escherichia coli* formate hydrogenlyase: a membrane-bound enzyme capable of fixing carbon dioxide to organic acid. *MicrobiologyOpen*, 2016.
- PIPER, P.; CALDERON, C. O.; HATZIXANTHIS, K. Weak acid adaptation : the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, p. 2635–2642, 2001.
- PLUSCHKELL, S. B.; FLICKINGER, M. C. Dissimilation of [^{13}C] methanol by continuous cultures of *Bacillus methanolicus* MGA3 at 50 S C studied by ^{13}C NMR and isotope-ratio mass spectrometry. *Microbiology*, v. 148, n. 2002, p. 3223–3233, 2002.
- PONTRELLI, S. *et al.* *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, v. 50, n. February, p. 16–46, 2018.
- QIANG, L. *et al.* Optimization of Fermentation Conditions and Properties of an Exopolysaccharide from *Klebsiella* sp. H-207 and Application in Adsorption of Hexavalent Chromium. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, 2013.
- RAMEL, F. *et al.* Growth of the obligate anaerobe *desulfovibrio vulgaris* hildenborough under continuous low oxygen concentration sparging: Impact of the membrane-bound oxygen reductases. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, p. 1–17, 2015.
- REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S.; ANGELIDAKI, I. Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KKU-S1. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 4, p. 1813–1825, fev. 2013.
- RODRIGUES, C. V. *et al.* Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, p. 1–11, 2018.
- ROSSMANN, R.; SAWERS, G.; BÖCK, A. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Molecular microbiology*, v. 5, n. 11, p. 2807–14, nov. 1991.
- RYWINSKA, A. *et al.* Biosynthesis of Citric Acid from Glycerol by Acetate Mutants of *Yarrowia lipolytica* in Fed-Batch Fermentation Biosynthesis of Citric Acid from Glycerol by Acetate Mutants of *Yarrowia lipolytica* in Fed-Batch Fermentation. n. April, 2016.
- SABOURIN-PROVOST, G.; HALLENBECK, P. C. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresource technology*, v. 100, n. 14, p. 3513–7, jul. 2009.
- SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. *Annals of Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 891–898, 2014.

- SARMA, S.; DUBEY, V. K.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic and thermodynamic analysis (with statistical optimization) of hydrogen production from crude glycerol using *Clostridium pasteurianum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, n. 44, p. 19972–19989, 2016.
- SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; *et al.* Bio-hydrogen production by biodiesel-derived crude glycerol bioconversion: a techno-economic evaluation. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 36, n. 1, p. 1–10, jan. 2013.
- SARMA, S. J.; DHILLON, G. S.; *et al.* Investigation of the effect of different crude glycerol components on hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407. *Renewable Energy*, v. 60, p. 566–571, dez. 2013.
- SARMA, S. J. *et al.* Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 8, p. 6473–6490, abr. 2012.
- SAWERS, R. G. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. v. 33, p. 42–46, 2005.
- SEIFERT, K. *et al.* Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 9, p. 3671–3678, maio 2009.
- SELEMBO, P. A *et al.* Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnology and bioengineering*, v. 104, n. 6, p. 1098–106, 15 dez. 2009.
- SHAMS YAZDANI, S.; GONZALEZ, R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic engineering*, v. 10, n. 6, p. 340–51, nov. 2008.
- SHARIFYAZD, S.; KARIMI, K. Effects of fermentation conditions on valuable products of ethanolic fungus *Mucor indicus*. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 30, p. 77–82, 2017.
- SHENG, G.-P.; YU, H.-Q. Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water research*, v. 40, n. 6, p. 1233–9, mar. 2006.
- SHENG, G.; YU, H.; LI, X. Stability of Sludge Flocs Under Shear Conditions : Roles of Extracellular Polymeric Substances (EPS). *Biotechnology and Bioengineering*, v. 93, n. 6, p. 2–9, 2006.
- SIEBER, J. R.; LE, H. M.; MCINERNEY, M. J. The importance of hydrogen and formate transfer for syntrophic fatty, aromatic and alicyclic metabolism. *Environmental microbiology*, v. 16, n. 1, p. 177–88, jan. 2014.

- SILVA-ILLANES, F. *et al.* Impact of hydraulic retention time (HRT) and pH on dark fermentative hydrogen production from glycerol. *Energy*, v. 141, p. 358–367, 2017.
- SILVA, F. M. S. *et al.* Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol. *Waste Management*, v. 76, p. 339–349, 2018.
- SILVA, F. M. S. *et al.* Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, n. 36, p. 22720–22729, 2017.
- SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Fermentation of hydrogen, 1,3-propanediol and ethanol from glycerol as affected by organic loading rate using up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, n. 45, p. 27558–27569, 2017.
- SKONIECZNY, M. T.; YARGEAU, V. Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 8, p. 3288–3294, maio 2009.
- SLEIGHT, S. C. *et al.* Genetic Basis of Evolutionary Adaptation by *Escherichia coli* to Stressful Cycles of Freezing, Thawing and Growth. v. 443, n. September, p. 431–443, 2008.
- SONG, J. Z. Æ. W.; CHENG, Æ. J.; ZHANG, C. Heterologous expression of a hydrogenase gene in *Enterobacter aerogenes* to enhance hydrogen gas production. p. 177–181, 2010.
- SOO, C. S. *et al.* Co-production of hydrogen and ethanol by *Escherichia coli* SS1 and its recombinant. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 30, p. 64–70, 2017.
- SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environmental science & technology*, v. 17, n. 9, p. 416A–27A, 1 set. 1983.
- SPROUFFSKE, K.; AGUILAR-RODRÍGUEZ, J.; WAGNER, A. How Archiving by Freezing Affects the Genome-Scale. *Genome biology and evolution*, v. 8, n. 5, p. 1290–1298, 2016.
- STRUCKO, T. *et al.* Laboratory evolution reveals regulatory and metabolic trade-offs of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, v. 47, p. 73–82, 2018.
- SUN, J. *et al.* Comparative genomic analysis of dha regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 263–272, 2003.

- SUN, Y. Q. *et al.* Advances in bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol: Prospects and challenges. *Process Biochemistry*, v. 71, p. 134–146, 2018.
- TANG, W. *et al.* Production, characterization, and flocculation mechanism of cation independent, pH tolerant, and thermally stable bioflocculant from *Enterobacter* sp. ETH-2. *PLoS ONE*, v. 9, n. 12, p. 1–19, 2014.
- TANISHO, S.; ISHIWATA, Y. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 19, n. 10, p. 807–812, 1994.
- TANISHO, S.; KADOKURAT, N. EFFECT OF CO₂ REMOVAL ON HYDROGEN FERMENTATION PRODUCTION. v. 23, n. I, p. 559–563, 1998.
- TANISHO, S.; KAMIYA, N.; WAKAO, N. Hydrogen evolution of *Enterobacter aerogenes* depending on culture pH: mechanism of hydrogen evolution from NADH by means of membrane-bound hydrogenase. *BBA - Bioenergetics*, v. 973, p. 1–6, 1989.
- TAO, Y. *et al.* High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, n. 2, p. 200–206, 2007.
- TAYLOR, B.; ZHULIN, I. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, n. 2, p. 479–506, 1999.
- TOYA, Y. *et al.* Metabolic flux analysis and visualization. *Journal of proteome research*, v. 10, n. 8, p. 3313–23, 5 ago. 2011.
- TRAN, K. T. *et al.* Beneficial knockouts in *Escherichia coli* for producing hydrogen from glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, p. 2573–2581, 2015.
- TRAN, K. T.; MAEDA, T.; WOOD, T. K. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance hydrogen production from glycerol. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 98, n. 10, p. 4757–70, maio 2014.
- TRCHOUNIAN, K. *et al.* *Escherichia coli* growth and hydrogen production in batch culture upon formate alone and with glycerol co-fermentation at different pHs. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, n. 32, p. 9935–9941, 2015.
- TRCHOUNIAN, K.; POLADYAN, A.; TRCHOUNIAN, A. Optimizing strategy for *Escherichia coli* growth and hydrogen production during glycerol fermentation in batch culture: Effects of some heavy metal ions and their mixtures. *Applied Energy*, v. 177, p. 335–340, 2016.
- TRINH, C. T.; SRIENC, F. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient conversion of glycerol to ethanol. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, n. 21,

p. 6696–705, nov. 2009.

UNEMOTO, T.; TOKUDA, H.; HAYASHI, M. The Bacteria. In: SOKATCH, J. R.; ORNSTON, L. N. (Org.). . *The Bacteria*. San Diego and London: Academic Press, Inc., 1990. v. XII Bacter. p. 227.

VALLE, A. *et al.* Heterologous expression of the human Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase (hPEPCK-M) improves hydrogen and ethanol synthesis in the *Escherichia coli* *dcuD* mutant when grown in a glycerol-based medium. *New Biotechnology*, v. 35, p. 1–12, 2017.

VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environmental Science and Technology*, v. 39, n. 23, p. 9351–9356, 2005.

VARRONE, C. *et al.* Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 21, p. 16479–16488, 2012.

VENKATA MOHAN, S.; PANDEY, A. Biohydrogen Production. *Elsevier*. [S.l: s.n.], 2013. p. 537–567.

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

VIKROMVARASIRI, N. *et al.* Microbial dynamics in ethanol fermentation from glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, n. 35, p. 15667–15673, 2016.

VLYSIDIS, A. *et al.* Glycerol utilisation for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. *Biochemical Engineering Journal*, v. 58–59, p. 1–11, 2011.

WANG, J. *et al.* Effects of increasing the NAD(H) pool on hydrogen production and metabolic flux distribution in *Enterobacter aerogenes* mutants. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 0, p. 13204–13215, 2013.

WANG, Q. *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WANG, Z. *et al.* Flocculation characterization of a bioflocculant from *Bacillus licheniformis*. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 54, n. 11, p. 2894–2901, 2015.

WEI, J.; LIU, Z. T.; ZHANG, X. Biohydrogen production from starch wastewater and

- application in fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, n. 7, p. 2949–2952, 2010.
- WESTBROOK, A. W. *et al.* Strain engineering for microbial production of value-added chemicals and fuels from glycerol. *Biotechnology Advances*, p. #pagerange#, 2018.
- WISCHRAL, D. *et al.* Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. *Bioresource Technology*, v. 212, p. 100–110, 2016.
- WOLFE, A. J. The Acetate Switch The Acetate Switch. v. 69, n. 1, p. 12–50, 2005.
- WU, C. *et al.* Renewable hydrogen and carbon nanotubes from biodiesel waste glycerol. *Scientific reports*, v. 3, p. 2742, jan. 2013.
- WU, K. J. *et al.* Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 42, n. 1, p. 20–25, 2011.
- WU, S. G. *et al.* An ancient Chinese wisdom for metabolic engineering: Yin-Yang. *Microbial cell factories*, v. 14, p. 39, 2015.
- YANG, F.; HANNA, M. A; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, n. 1, p. 13, 2012.
- YANG, G.; WANG, J. Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 95, n. April, p. 130–146, 2018.
- YANG, X. *et al.* Repeated batch production of 1,3-propanediol from biodiesel derived waste glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Chemical Engineering Journal*, v. 314, p. 660–669, 2017.
- YAZDANI, S.; GONZALEZ, R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic engineering*, v. 10, n. 6, p. 340–51, nov. 2008.
- YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current opinion in biotechnology*, v. 18, n. 3, p. 213–9, jun. 2007.
- YAZDANI, S. S.; MATTAM, A. J.; GONZALEZ, R. Fuel and Chemical Production from Glycerol, a Biodiesel Waste Product. *Biofuels from Agricultural Wastes and Byproducts*. [S.l: s.n.], 2010. .
- YU, L. *et al.* A novel Fe(III) dependent bioflocculant from *Klebsiella oxytoca* GS-4-08: Culture conditions optimization and flocculation mechanism. *Scientific Reports*, v. 6, n.

September, p. 1–11, 2016.

ZELCIBUCH, L. *et al.* Pyruvate formate-lyase enables efficient growth of *Escherichia coli* on acetate and formate. *Biochemistry*, v. 55, p. 2423–2426, 2016.

ZENG, A. P.; BIEBL, H.; DECKWER, W. D. Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 5, p. 485–489, 1990.

ZHANG, C.; LV, F.; XING, X. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 18, p. 8344–8349, 2011.

ZHANG, C.; MA, K.; XING, X. Regulation of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* by external NADH and NAD⁺. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 3, p. 1226–1232, 2009.

ZHANG, D. *et al.* Bioprocess modelling of biohydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris*: Model development and effects of operating conditions on hydrogen yield and glycerol conversion efficiency. *Chemical Engineering Science*, v. 130, p. 68–78, 2015.

ZHAO, H. *et al.* Cloning and knockout of formate hydrogen lyase and H₂-uptake hydrogenase genes in *Enterobacter aerogenes* for enhanced hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 1, p. 186–194, 2009.

ZHAO, H. *et al.* Disruption of lactate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase for increased hydrogen production and its effect on metabolic flux in *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource technology*, v. 194, p. 99–107, 2015.

ZHENG, P. *et al.* Overexpression of genes of the *dha* regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2160–2169, 2006.

ZOREL, J. A. Identificação de Proteínas Microbianas Produzidas Durante a Digestão Anaeróbia de Matéria Orgânica. 2013. 79 f. Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.

ZWIETERING, M. H. *et al.* Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.