



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Pamela Baptista Ferreira

Levantamento e seleção de cepas de *Clostridium* produtoras de ácidos graxos voláteis e hidrogênio pela ótica de biorrefinarias

Florianópolis
2024

Pamela Baptista Ferreira

Levantamento e seleção de cepas de *Clostridium* produtoras de ácidos graxos voláteis e hidrogênio pela ótica de biorrefinarias

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em engenharia de alimentos.

Orientadora: Prof^a Débora de Oliveira.
Coorientadores: Dr. Maikon Kelbert e Ma. Vanessa Schmidt.

Florianópolis

2024

Ferreira, Pamela Baptista

Levantamento e seleção de cepas de Clostridium produtoras de ácidos graxos voláteis e hidrogênio pela ótica de biorrefinarias. / Pamela Baptista Ferreira ; orientadora, Débora de Oliveira, coorientador, Maikon Kelbert, coorientadora, Vanessa Schmidt, 2024.

40 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Engenharia de alimentos. Clostridium. AGVs. I. Oliveira, Débora de. II. Kelbert, Maikon. III. Schmidt, Vanessa IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

Pamela Baptista Ferreira

Levantamento e seleção de cepas de *Clostridium* produtoras de ácidos graxos voláteis e hidrogênio pela ótica de biorrefinarias

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Alimentos e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 17 de dezembro de 2024.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof. Dr. Cristiano José de Andrade

Dra. Débora Trichez

Profª. Dra. Débora de Oliveira

Florianópolis, 2024

AGRADECIMENTOS

Expresso minha profunda gratidão aos professores, à SHV e Supergasbras envolvidos no projeto de pesquisa no qual pude adquirir conhecimento para a elaboração deste trabalho de conclusão.

Agradeço também à equipe do Laboratório de Engenharia Biológica (LiEB), onde realizei os experimentos, por todo o apoio recebido.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Professora Débora de Oliveira, ao coorientador, Dr. Maikon Kelbert, e à Mestra Vanessa Schmidt pelo conhecimento compartilhado e pela orientação durante este trabalho. Suas orientações, paciência e incentivo foram essenciais ao longo deste período.

Por fim, agradeço aos meus familiares, namorado e amigos, cujo apoio foram fundamentais para a concretização deste trabalho e conclusão do curso.

RESUMO

A produção de biomoléculas, como hidrogênio e ácidos graxos voláteis (AGVs), a partir de resíduos agro-industriais lignocelulósicos é crucial tanto para converter resíduos em produtos de valor agregado quanto para mitigar problemas de descarte de resíduos. O hidrogênio destaca-se como uma alternativa de energia eficiente e limpa, enquanto os AGVs são essenciais para a produção de produtos químicos, combustíveis e polímeros. Cepas de *Clostridium* são reconhecidas por sua capacidade de produzir esses compostos via fermentação ABE (acetona-butanol-etanol). No entanto, a implementação industrial desses bioprocessos ainda enfrenta desafios em escalabilidade e otimização, destacando a importância da prospecção e avaliação de novas cepas capazes de produzir esses compostos para aplicações futuras. A cultura mista de lodo granular anaeróbico foi pré-tratada, com a redução do pH para 3,0 antes do plaqueamento, a fim de garantir a presença das bactérias formadoras de esporos. Para promover o crescimento dos isolados, as colônias isoladas foram ressuspensas em solução de NaCl (0,9% p/v) e 1,0 mL dessas colônias foram inoculadas em frasco de soro contendo meio RCM. Este estudo identificou cepas de *Clostridium senegalense* com 99,11% de identidade genética, com um potencial de produzir até $6,15 \pm 1,15\%$ de hidrogênio em meio sintético. Além disso, foi observada a produção de ácido butírico e butanol pela identificação de compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massa. O sucesso desta proposta permitiu uma análise comparativa entre as diferentes cepas, bem como a identificação de suplementos nutricionais acessíveis que podem aumentar a produtividade e reduzir os custos operacionais. Os resultados obtidos têm potencial para guiar pesquisas futuras, com foco na otimização de processos produtivos, especialmente no contexto de biorrefinarias.

Palavras-chave: Materiais lignocelulósicos, Biorrefinaria, *Clostridium*.

ABSTRACT

The production of biomolecules, such as hydrogen and volatile fatty acids (VFAs), from lignocellulosic agro-industrial residues is crucial for both converting waste into value-added products and mitigating waste disposal issues. Hydrogen stands out as an efficient and clean energy alternative, while VFAs are essential for producing chemicals, fuels, and polymers. *Clostridium* strains are well-known for their ability to produce these compounds through ABE (acetone-butanol-ethanol) fermentation. However, industrial implementation of these bioprocesses still faces challenges in scalability and optimization, emphasizing the importance of prospecting and evaluating new strains capable of producing these compounds for future applications.

The mixed culture of anaerobic granular sludge was pre-treated by lowering the pH to 3.0 before plating to ensure the presence of spore-forming bacteria. To promote the growth of isolates, the isolated colonies were resuspended in a NaCl solution (0.9% w/v), and 1.0 mL of this suspension was inoculated into serum bottles containing RCM medium. This study identified *Clostridium senegalense* strains with 99.11% genetic identity, showing potential to produce up to $6.15 \pm 1.15\%$ hydrogen in synthetic medium. Furthermore, the production of butyric acid and butanol was observed through the identification of volatile compounds using gas chromatography coupled with mass spectrometry.

The success of this proposal enabled a comparative analysis among different strains and the identification of accessible nutritional supplements that can enhance productivity and reduce operational costs. The results obtained have the potential to guide future research, focusing on the optimization of production processes, particularly in the context of biorefineries.

Keywords: Lignocellulosic materials, Biorefinery, *Clostridium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metodologia de isolamento	22
Figura 2 - Imagens das colônias de <i>Clostridium</i> na primeira etapa de isolamento....	29
Figura 3 - Cultivo anaeróbico de cepas de <i>Clostridium</i>	30
Figura 4 - Teste cinético dos isolados: (A)ISO02, (B)ISO07, (C)ISO10	31
Figura 5 - Imagens de microscopia com ampliação para os isolados	32
Figura 6 - Sequenciamento Pipeline Sentinel para 16S (gênero e espécie)	33
Figura 7 - Sequências de DNA encontradas em um microrganismo.....	34
Figura 8 - Principais compostos orgânicos voláteis produzidos pela ISO02, ISO07, ISO10	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio Reinforced Clostridial Medium (RCM)	23
Tabela 2 - Cepas de <i>Clostridium</i> selecionadas	28
Tabela 3 - Quantificação de hidrogênio e dióxido de carbono produzidos pelos isoladas por cromatografia gasosa.....	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	13
2.2	APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GENERO <i>CLOSTRIDIUM</i>	14
2.3	ÁCIDO BUTÍRICO.....	16
2.4	BIOHIDROGÊNIO.....	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	LEVANTAMENTO DA LITERATURA DE CEPAS DE <i>CLOSTRIDIUM</i> PRODUTORAS DE AGV E BIOHIDROGÊNIO.....	21
4.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO.....	21
4.2.1	Pré-tratamento	21
4.2.2	Plaqueamento e seleção de colônias	22
4.2.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA DA CEPA ISOLADA	23
4.3	IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS	24
4.3.1	Quantificação de H₂ e CO₂ por GC-TCD	24
4.3.2	Quantificação de ácidos graxos voláteis	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	LEVANTAMENTO DE CEPAS DE <i>CLOSTRIDIUM</i> PRODUTORAS DE AGV _s E BIOH ₂ 26	
5.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE <i>CLOSTRIDIUM</i> SP. PRODUTORAS DE ÁCIDO BUTÍRICO E BIOH ₂	29
5.2.1	Análise do sequenciamento dos isolados	32
5.3	POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOH ₂ PELOS ISOLADOS	34
5.4	ANALISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLATEIS (COV) PELOS ISOLADOS.....	35
6	CONCLUSÃO	38

1 INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGVs), como ácido acético e ácido butírico, constituem matérias-primas relevantes para diversos setores industriais, incluindo alimentício, farmacêutico, químico e de biocombustíveis (SUN; ZHANG; LOH, 2021). O hidrogênio, por sua vez, é amplamente reconhecido como uma fonte de energia alternativa promissora devido à sua natureza ecologicamente correta e alto rendimento energético (122 kJ/g) (RAMBABU et al., 2020). Embora diversas tecnologias tenham sido desenvolvidas para a produção desses compostos, o método biotecnológico tem despertado interesse, principalmente devido à utilização de materiais lignocelulósicos (MLC) proveniente de resíduos agroindustriais. Esse método é especialmente notável por sua abordagem de bioprocessos integrados que empregam microrganismos inovadores (RAMBABU et al., 2020).

Ao longo da última década, o interesse na produção fermentativa de biocombustíveis, sejam eles líquidos, gasosos ou sólidos, além de produtos químicos a partir de MLC, tem aumentado significativamente em todo o mundo (GALBE; ZACCHI, 2012). As principais razões para esse crescimento são a previsão de escassez dos combustíveis fósseis e a crescente preocupação com os efeitos das mudanças climáticas causadas pelo uso excessivo desses combustíveis.

Diversos microrganismos anaeróbios possuem a capacidade natural de sintetizar bioprodutos, sendo o gênero *Clostridium* amplamente estudado devido ao seu potencial industrial (JIANG et al., 2018a). Esse microrganismo tem sido empregado industrialmente para a produção de combustíveis, como o butanol, por meio do processo fermentativo conhecido como ABE (acetona-butanol-etanol) (MENON et al., 2015). Além disso, cepas de *Clostridium* destacam-se pela capacidade de produzir bioprodutos de alto valor agregado, como ácidos graxos voláteis (AGVs) e biohidrogênio (bioH₂), utilizando diferentes substratos, incluindo pentoses e hexoses, através da fermentação acidogênica (MILLAT; WINZER, 2017).

Embora alguns estudos tenham identificado cepas de *Clostridium* que produzem AGV e bioH₂ (JIANG et al., 2018a), faltam pesquisas comparativas entre essas cepas, especialmente no contexto de uma biorrefinaria que utiliza MLC. Esse processo envolve quatro etapas principais: i) pré-tratamento, ii) sacarificação, iii) possível remoção de compostos inibidores, e iv) fermentação (BIRGEN et al., 2019).

Dentre essas, o pré-tratamento é especialmente crítico, pois pode gerar compostos inibidores que comprometem as etapas subsequentes.

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (MLC) pode levar à formação de substâncias inibidoras, como compostos fenólicos provenientes da quebra da lignina, ou furfural e 5-hidroximetilfurfural, gerados a partir de açúcares monoméricos, os quais podem reduzir a atividade microbiana (RODIONOVA et al., 2022). Esses compostos fenólicos podem afetar a integridade das membranas biológicas, exibindo toxicidade dose-dependente em relação ao crescimento celular, consumo de açúcar e produção de AGVs e H₂ (MOORE, 2021)(RODIONOVA et al., 2022).

A composição dos MLC, que varia conforme safra, época e origem, influencia diretamente o perfil de açúcares disponíveis. Cepas de *Clostridium* têm a capacidade de metabolizar açúcares C5 e C6 gerados pela sacarificação (STOKLOSA et al., 2021). No entanto, estudos indicam que a glicose é metabolizada preferencialmente, enquanto a xilose atua como fonte secundária de carbono, regulada pela repressão catabólica do carbono (FU et al., 2017). Além disso, a proporção entre xilose e glicose, especialmente nas relações 4:1 e 3:2, está diretamente associada ao aumento da produção de ácido butírico (LUO et al., 2017).

É crucial ressaltar a estreita relação entre a suplementação nutricional e a eficácia do processo de fermentação. Conforme enfatizado por Fonseca e colaboradores (2020), a síntese de AGV ocorre durante a fase de crescimento exponencial, e seu rendimento pode ser otimizado mediante a introdução de uma fonte de nitrogênio. Um exemplo disso é a observação de que a adição de 0,4 g·L⁻¹ de ureia resultou em um aprimoramento do crescimento de *C. tyrobutyricum*, culminando em um aumento do rendimento e da seletividade para a produção de ácido butírico (STOKLOSA et al., 2021). Em suma, a suplementação nutricional desempenha um papel crucial na otimização do processo de fermentação, influenciando diretamente o rendimento e a seletividade na produção de biocompostos. A prospecção de novas cepas de *Clostridium* com potencial industrial surge como uma estratégia promissora, conforme evidenciado por estudos que demonstram o isolamento de culturas bacterianas altamente produtivas em condições específicas (REGINATTO, 2016). Este trabalho busca não apenas identificar cepas capazes de gerar AGVs e H₂ com eficiência, mas também promover a maximização da conversão de biomassa lignocelulósica em produtos de alto valor, atendendo à demanda por soluções sustentáveis e fontes de energia mais limpas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A biomassa lignocelulósica, conhecida como LCB, compreende substâncias de origem vegetal abundantes em polissacarídeos (LLAMAS et al., 2023). Além de ser uma fonte de matéria-prima renovável que não compete com a produção de alimentos, a LCB incorpora materiais residuais em sua composição, o que reduz significativamente os custos de produção associados à mesma. Isso, por sua vez, desempenha um papel essencial na sustentabilidade econômica de processos que se apoiam neste material.

Atualmente, a produção anual de LCB em escala global é calculada em torno de 1,3 bilhão de toneladas, tornando-a uma alternativa viável e atraente às fontes de energia fóssil (LLAMAS et al., 2023). Esse abundante suprimento de biomassa pode ser aproveitado de forma eficaz por meio das biorrefinarias, que seguem um modelo análogo ao das refinarias petroquímicas tradicionais. Essas biorrefinarias demonstram a habilidade de extrair e valorizar os componentes-chave da biomassa, como a celulose, hemicelulose e lignina, permitindo sua conversão em biocombustíveis e produtos bioquímicos de elevado valor agregado.

Dentre os materiais de LCB, é possível identificar uma ampla variedade de fontes, incluindo resíduos provenientes de diferentes origens. Essas fontes incluem, resíduos de madeira provenientes de florestas (como capim-switch, abeto, eucalipto e bétula), resíduos de atividades agrícolas (como palha de cereais, bagaço de cana-de-açúcar e restos de milho), além de resíduos industriais (como resíduos de grãos usados na produção de cerveja e resíduos de moinhos de papel e madeira), e resíduos sólidos municipais (LLAMAS et al., 2023).

Em média, a LCB é composta por três elementos principais: celulose (40-50% em peso), hemicelulose (25-30% em peso) e lignina (15-20% em peso). Outros componentes menores, como extrativos e cinzas inorgânicas, também podem ser encontrados (LLAMAS et al., 2023). Entretanto, a relação entre celulose, hemicelulose e lignina na estrutura varia de acordo com o tipo de material lignocelulósico. (JIANG et al., 2019).

Como componente principal de LCB, a celulose é um polissacarídeo composto por unidades de D-glicose com ligações glicosídicas β -1,4 e se decompõe a temperaturas acima de 180 °C. Ela possui alta resistência à hidrólise enzimática

devido à sua cristalinidade, contribuindo para intensas ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (JIANG et al., 2019). Por outro lado, a hemicelulose, outra forma de polissacarídeo é um heteroglicano com composição variável de açúcares ramificados C5-C6 (D-xilose, L-arabinose, D-manose, D-glicose e D-galactose) ligados por ligações β -1-4, que apresenta maior acessibilidade e é mais fácil de hidrolisar do que a celulose. Por fim, a lignina é um biopolímero aromático amorfo feito de álcoois (coniferila, sinapila e *p*-cumarila), que cria uma estrutura tridimensional muito resistente à quebra, o que confere a robustez desse tipo de matéria-prima (LLAMAS et al., 2023).

Portanto, ao direcionar a biomassa lignocelulósica (LCB) para um processo de conversão biológica, é fundamental que a matéria orgânica esteja prontamente disponível para permitir uma geração eficiente de produtos químicos. Nesse contexto, a implementação de uma etapa de pré-tratamento é crucial, pois aumenta a acessibilidade às frações de celulose, hemicelulose e lignina, tornando-se essencial para otimizar a bioconversão da LCB em instalações de biorrefinaria. Essa abordagem também destaca o papel estratégico de bactérias do gênero *Clostridium* na valorização de resíduos lignocelulósicos em produtos de alto valor agregado (LLAMAS et al., 2023).

2.2 APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Clostridium*

Bactérias do gênero *Clostridium*, pertencentes à classe dos Firmicutes, são microrganismos anaeróbios estritos, Gram-positivos, e esporulantes. Esses microrganismos são conhecidos por produzir uma ampla variedade de solventes, que incluem butanol, etanol, acetona, isopropanol, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol e hexanol. Dentre esses solventes, os mais notáveis são a acetona, o butanol e o etanol, frequentemente referidos como ABE (CHENG; BAO; YANG, 2019). A fermentação natural de Acetona-Butanol-Etanol (ABE) é exclusivamente conduzida por cepas solventogênicas. Estes microrganismos possuem um metabolismo fermentativo altamente especializado, capacitando-os a utilizar uma ampla gama de substratos, incluindo açúcares, oligossacarídeos e polissacarídeos (MILLAT, 2017).

O processo metabólico desses microrganismos é tipicamente caracterizado por duas fases distintas, evidenciando uma notável transição no perfil de produtos resultantes. Na fase de acidogênese, produzem principalmente ácido acético e ácido butírico. Na fase solventogênica, esses ácidos são convertidos em solventes neutros,

como butanol, acetona e etanol (ABE). Em ambas as fases, são gerados subprodutos como hidrogênio e dióxido de carbono (CHENG; BAO; YANG, 2019; MILLAT, 2017) .

Durante a fermentação, a transição de acidogênese para solventogênese está relacionada à fase de crescimento das células. Nas fases iniciais e médias do crescimento exponencial, as células produzem ácidos para gerar ATP, diminuindo o pH do meio. Na fase estacionária, com o aumento da densidade celular, ocorre a formação de solventes e a reabsorção dos ácidos excretados, elevando o pH. Simultaneamente, inicia-se a formação de endósporos. A solventogênese está associada à fase estacionária e ao início da esporulação, sugerindo mecanismos regulatórios compartilhados. Em algumas espécies, a formação de solventes pode ocorrer antes da fase estacionária em culturas em lote (MILLAT, 2017).

A produção de solventes por *Clostridium* é influenciada por diversos fatores, como temperatura, pH, potencial redox e os componentes do meio, incluindo íons metálicos. Temperaturas mais baixas, entre 20-30 °C, podem aumentar a tolerância ao butanol, resultando em uma maior concentração final desse solvente. Segundo (BAER; BLASCHEK; SMITH, 1987) o crescimento de *C. acetobutylicum* a 42 °C apresentou maior inibição em comparação a 22 e 37 °C. Além disso, cepas cultivadas a 42 °C sintetizaram ácidos graxos com cadeias acil mais longas. Esses resultados destacam que o controle da temperatura é essencial para otimizar a produção de solventes, pois influencia tanto a taxa de crescimento celular quanto o perfil dos produtos de fermentação (CHENG; BAO; YANG, 2019)

Ao longo dos anos, diversas espécies solventogênicas foram isoladas e caracterizadas, apresentando diferenças nas suas preferências por substratos, perfis de produtos de fermentação e outras propriedades relevantes (MILLAT, 2017). Uma característica comum a todas essas espécies é a capacidade de produzir butanol e etanol. Segundo (MILLAT, 2017), quatro espécies de *Clostridium* já foram utilizadas na fermentação industrial ABE. Observa-se que *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharobutylicum* e *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* são capazes de formar acetona, enquanto as cepas de *Clostridium beijerinckii* podem produzir acetona ou reduzi-la ainda mais para isopropanol.

Durante a acidogênese, clostrídios como *Clostridium butyricum*, *C. populeti*, *C. tyrobutyricum* e *C. thermobutyricum* produzem predominantemente acetato e butirato, sendo amplamente estudados para a produção de ácido butírico em processos industriais nos últimos 20 anos (MILLAT, 2017; ZHANG et al., 2009). O pH

de cultivo, geralmente entre 5,0 e 7,5, influencia diretamente a proporção desses ácidos. Além disso, fatores como concentrações de glicose, pressão parcial de H₂, e presença de acetato e butirato afetam a taxa de crescimento e a produtividade durante a fermentação. Em culturas limitadas em glicose sem purga de nitrogênio, segundo (ZHANG et al., 2009), observou-se um aumento significativo na razão butirato/acetato em um processo de fermentação com produção de butirato utilizando *C. butyricum* como microrganismo de trabalho, destacando a importância do controle ambiental na otimização de processos fermentativos.

2.3 ÁCIDO BUTÍRICO

O ácido butírico (CH₃CH₂CH₂COOH) é um ácido graxo volátil de cadeia curta naturalmente produzido por bactérias anaeróbias, com diversas aplicações nas indústrias química, alimentícia, farmacêutica, de perfumes e de alimentos para animais (JIANG et al., 2018a). A produção industrial atual de ácido butírico, predominantemente sintetizado a partir do petróleo pela oxidação do butiraldeído, atinge globalmente cerca de 80.000 toneladas métricas anuais, com um preço médio de aproximadamente US\$1,8 por quilograma (CHI et al., 2018; JIANG et al., 2018b). Contudo, à medida que a demanda por ácido butírico cresce, especialmente por parte de fabricantes de alimentos e empresas farmacêuticas, emerge uma tendência incontestável em direção à bioprodução desse ácido a partir de fontes renováveis (JIANG et al., 2018a).

Apesar do odor desagradável, o ácido butírico é amplamente utilizado na indústria de alimentos para realçar notas de manteiga em aromas, enquanto seus ésteres, como metil, etil e butirato de amila, são usados para intensificar aromas de frutas e em perfumes. Na indústria química, ele serve como precursor na produção de butirato de acetato de celulose termoplástico (CAB), apreciado por sua solubilidade em solventes orgânicos, hidrofobicidade, resistência à luz e ao frio, e flexibilidade (Jiang et al., 2018). O ácido butírico também é adicionado a plásticos e fibras têxteis para melhorar a resistência ao calor e à luz solar, e misturas com polímeros como o poli(3-hidroxibutirato) (PHB) podem aprimorar propriedades do produto e reduzir custos de produção. Além disso, o ácido butírico é crucial na produção de butanol como biocombustível, atuando como um precursor essencial na fermentação acetona-butanol-etanol (ABE) por clostrídios solventogênicos (JIANG et al., 2018a).

Atualmente, estudos sobre os substratos utilizados na fermentação microbiana do ácido butírico estão principalmente direcionados para a exploração da biomassa lignocelulósica (SUO et al., 2018). Diversos microrganismos têm a capacidade de sintetizar o ácido butírico como o principal produto de seus processos fermentativos, destaca-se, entre esses, o gênero *Clostridium*. Este gênero se sobressai devido à sua habilidade em produzir ácido butírico com elevados teores, rendimentos e produtividade, utilizando diversos substratos, como glicose, xilose, lactose e glicerol. Levando em consideração aplicações contextos industriais, a preferência recai sobre cepas não patogênicas, em virtude de considerações relacionadas à saúde e segurança ambiental (JIANG et al., 2018).

A maioria das bactérias naturalmente isoladas produtoras de ácido butírico, são heterofermentativas. Elas convertem glicose em uma mistura de butirato, acetato, CO₂ e H₂. Durante a fermentação com glicose como fonte de carbono, a glicólise, principalmente via Embden–Meyerhof–Parnas (EMP), gera ácido pirúvico e acetyl-CoA. O acetyl-CoA é então convertido em acetato pela via fosfotransacetilase (PTA)-acetato quinase (ACK) ou em butiril-CoA por meio de reações catalisadas por tiolesterase, β-hidroxi-butilil-CoA desidrogenase, crotonase e butiril-CoA desidrogenase, com a participação da flavoproteína transferidora de elétrons. O butiril-CoA é posteriormente convertido em butirato pela via fosfotransbutirilase (PTB)-butirato quinase (BUK) ou através de uma CoA transferase (CTF) (JIANG et al., 2018).

Entre as bactérias produtoras de ácido butírico, *Clostridium tyrobutyricum* possui o menor genoma (3,07 Mbp), destacando-se a cepa ATCC 25755, que alcança uma concentração de até de 86,9 g/L de ácido butírico (dependendo do processo fermentativo empregado), apesar da limitada utilização de substratos. Em contraste, *Clostridium butyricum* apresenta um genoma maior (4,54 Mbp), metaboliza diversos substratos - incluindo amido e dissacarídeos, mas frequentemente produz 1,3-propanodiol como principal produto e inclui cepas patogênicas, o que representa preocupações de saúde (Jiang et al., 2018). Já *C. thermobutyricum*, uma bactéria termofílica, converte lignocelulose diretamente em butirato a 55 °C, facilitando a recuperação de produtos finais e no controle da fermentação. Muitas dessas bactérias possuem genomas sequenciados e são amplamente estudadas para aplicações industriais (JIANG et al., 2018).

2.4 BIOHIDROGÊNIO

O biohidrogênio é amplamente reconhecido como um promissor combustível limpo e eficiente para impulsionar a economia futura. Isto se deve ao fato de que o hidrogênio é o elemento mais abundante no universo, constituindo mais de 90% de todos os átomos. Além disso, destaca-se como o elemento mais leve, com um peso molecular de 2.016, e o maior conteúdo de energia conhecido (valor calorífico), em comparação com qualquer outro combustível (ABE et al., 2019).

A natureza sustentável e não tóxica do hidrogênio reforça sua atratividade como portador de energia. Em contraste com fontes tradicionais como petróleo, gás natural ou carvão, o hidrogênio é ambientalmente amigável e benéfico. Durante sua conversão para energia, tem a água como único produto de exaustão, o que contribui para a preservação do meio ambiente (ABE et al., 2019).

O hidrogênio pode ser gerado tanto a partir de fontes renováveis, como hidro, vento, ondas, solar, biomassa e energia geotérmica, quanto de fontes não renováveis, como carvão, gás natural e energia nuclear. Pode ser armazenado como combustível e utilizado em transporte, em sistemas de geração de energia usando células de combustível, em motores de combustão interna ou turbinas. Além disso, o hidrogênio possui uma capacidade impressionante de armazenamento de energia, com aproximadamente 120 MJ (33,33 kWh) em 1 kg de hidrogênio, o que excede mais que o dobro da maioria dos combustíveis convencionais (ABE et al., 2019).

A produção de biohidrogênio a partir de substâncias lignocelulósicas oferece vantagens significativas em comparação aos métodos convencionais, como menor consumo de energia, impacto ambiental reduzido e simplicidade operacional. Esta abordagem transforma resíduos de biomassa em produtos de alto valor agregado, atendendo simultaneamente aos desafios da gestão de resíduos e representando uma inovação tecnológica (RAMBABU et al., 2019).

Muitos microrganismos pertencentes ao gênero *Clostridium* podem produzir hidrogênio como produto de fermentação. Durante a acidogênese, os principais produtos provenientes da fermentação de carboidratos, são H₂ e CO₂ (como gás) e ácido acético e ácido butírico (na fase líquida). Esses produtos derivam de reações catalisadas por enzimas-chave de acidogênese: hidrogenase, acetato quinase e butirato quinase (FONSECA et al., 2020).

Dentre as espécies clostridiais, destaca-se o *Clostridium thermocellum*, que apresenta notáveis capacidades na produção de hidrogênio. Essa bactéria sintetiza

enzimas celulolíticas para a degradação da celulose, convertendo os açúcares redutores resultantes em hidrogênio, além de gerar acetato, butirato e etanol como subprodutos. A capacidade de crescimento do *C. thermocellum* a 60 °C confere uma vantagem termodinâmica, propiciando rendimentos de hidrogênio mais elevados e reduzindo a probabilidade de contaminação por microrganismos mesofílicos. Entretanto, apesar de todas essas vantagens, é importante ressaltar que a produtividade de hidrogênio pelo *C. thermocellum* é limitada, devido às suas taxas de crescimento relativamente baixas, sensibilidade ao pH e eficiência reduzida na hidrólise (RAMBABU et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

A presente proposta tem como objetivo identificar microrganismos não patogênicos do gênero *Clostridium* a partir de amostras ambientais, visando à produção de produtos de alto valor agregado, como ácidos graxos voláteis, com ênfase em ácido butírico, além de hidrogênio. Este estudo busca explorar a capacidade biotecnológica desses microrganismos em processos de fermentação, aproveitando sua eficiência e versatilidade na conversão de substratos em compostos de interesse industrial e energético.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento abrangente na literatura visando selecionar cepas de *Clostridium* produtoras de AGV e hidrogênio, com preferência por aquelas não patogênicas e disponíveis em bancos de cepas;
- Isolar microrganismos do gênero *Clostridium* a partir de amostra ambiental;
- Avaliar a capacidade das cepas de *Clostridium* de produzir AGV e hidrogênio usando meio sintético;
- Identificar cepas isoladas utilizando ferramentas de biologia molecular, como o sequenciamento genético;
- Avaliar os parâmetros de tolerância das cepas isoladas a açúcares e produtos do processo fermentativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LEVANTAMENTO DA LITERATURA DE CEPAS DE *CLOSTRIDIUM* PRODUTORAS DE AGV E BIOHIDROGÊNIO.

Foi realizada uma revisão da literatura utilizando as bases de dados Scopus e Web of Science, com o objetivo de identificar cepas de *Clostridium* como potencial de produzir AGV, em particular o ácido butírico, e hidrogênio.

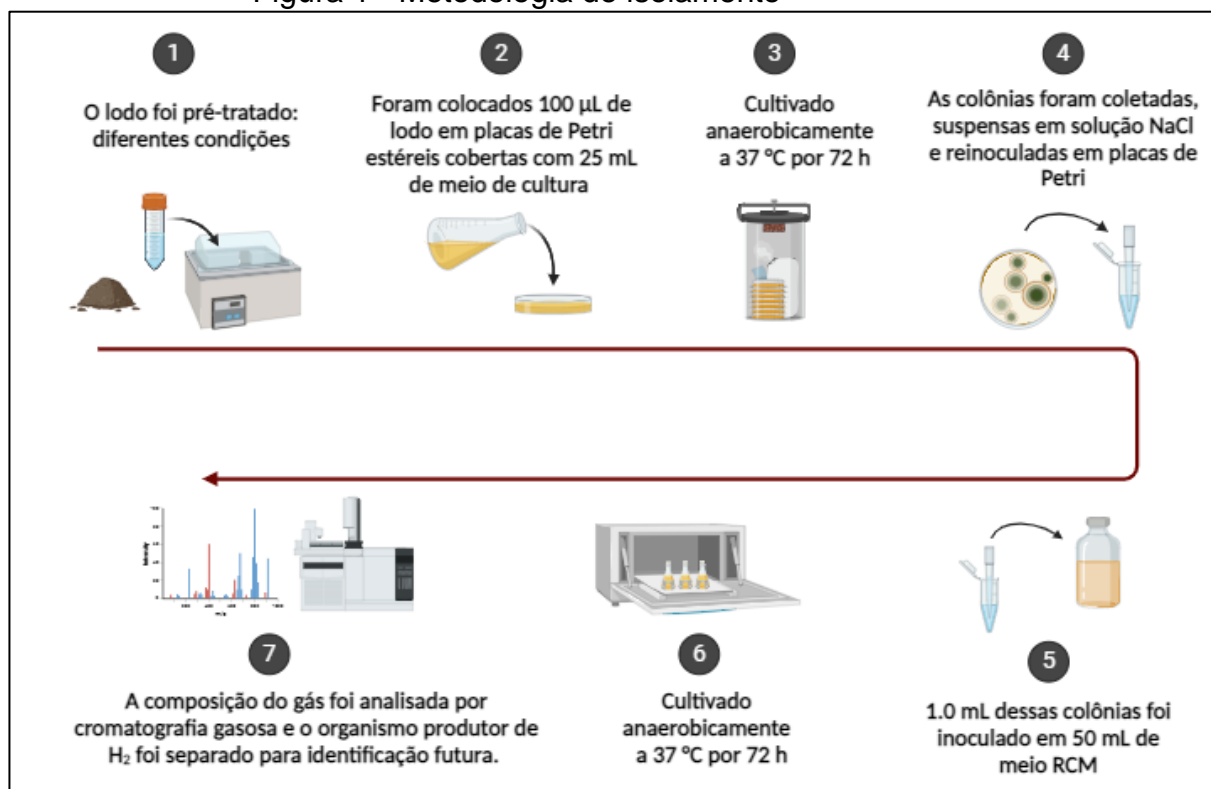
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

A metodologia utilizada foi adaptada conforme descrito por (REGINATTO, 2016) e está apresentada a seguir.

4.2.1 Pré-tratamento

A cultura mista (lodo granular anaeróbico) usada para isolar microrganismos produtores de AGVs e hidrogênio foi coletada a partir de um reator anaeróbico (UASB) fornecido por uma indústria alimentícia brasileira, localizada no estado de Santa Catarina, Brasil. Para assegurar a presença das bactérias formadoras de esporos, frequentemente identificadas como produtoras de AGVs e H₂, o lodo foi pré-tratado antes do plaqueamento. As condições de pré-tratamento aplicadas às culturas mistas foram anteriormente descritas por (REGINATTO, 2016) como uma estratégia eficaz para enriquecer o lodo com bactérias que produzem os produtos de interesse. As seguintes condições foram testadas: O lodo (Sólidos voláteis: 42,73 ± 0,44 g/L) foi pré-tratado, diminuindo o pH para 3,0 antes do plaqueamento. A acidificação foi realizada adicionando a amostra de lodo (5 mL) de tampão citrato fosfato 0,1 M em pH 3,0 (35 mL). Em seguida, a amostra foi incubada por 12 horas a 37 °C com agitação de 150 rpm (Figura 1).

Figura 1 - Metodologia de isolamento



Fonte: Autor

4.2.2 Plaqueamento e seleção de colônias

Após o pré-tratamento, 100 µL de lodo foram diluídos em 900 µL (0,9% p/v) de solução salina. Em seguida, 100 µL da amostra diluída foram colocados em placas de Petri estéreis cobertas com 25 mL de meio de cultura Clostridial Reforçado Diferencial (DRCM) para cultivar espécies de *Clostridium* em pH 7,0 (Figura 1, Etapa 2). As placas de Petri foram incubadas em frasco anaeróbio a 37°C até o aparecimento de colônias (Figura 1, Etapa 3).

Para garantir o isolamento das colônias, elas foram coletadas e suspensas em solução de NaCl (0,9% p/v), e reinoculadas em novas placas de Petri para posterior crescimento dos isolados (Figura 1, Etapa 4).

Para permitir o crescimento dos isolados, as colônias isoladas foram ressuspendidas em solução de NaCl (0,9% p/v) e 1,0 mL dessas colônias foram inoculadas em frasco de soro de 100 mL contendo 50 mL de meio *Reinforced Clostridial Medium* (RCM) (Figura 1, etapa 5). Gás nitrogênio foi borbulhado por 3 minutos nos frascos antes de serem fechados com uma rolha de borracha e selo de alumínio. Os frascos de soro foram então incubados em um agitador orbital a 37 °C

por 72 horas (Figura 1, etapa 6). Durante um período de 72 horas (a cada 24 horas), utilizando uma seringa descartável, foi medida em volume a produção de gás de cada isolado.

Após este período, a composição do *headspace* gasoso foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a um metanador. Com a porção líquida, foi realizada a análise dos AGVs (com cromatografia gasosa-espectrometria de massa). Os organismos produtores de AGVs-H₂ foram então separados para identificação.

A composição do meio sintético utilizado para o cultivo dos isolados é descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do meio Reinforced Clostridial Medium (RCM)

RCM	
Composição	[] g/L
Triptose	10
Extrato de Carne	10
Dextrose	5
NaCl	5
Amido Solúvel	1
L-Cysteine-HCl	0,5
Acetato de sódio	3
Resazurina (0,025%)	0,04
Extrato de levedura	3

4.2.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA DA CEPA ISOLADA

4.2.3.1 *Método de Amplificação e Sequenciamento do gene 16S rRNA.*

Os isolados foram cultivados em meio RCM por 3 dias e em seguida sua biomassa foi centrifugada a 10000 rpm e 4 °C por 10 minutos. As amostras foram congeladas a -80 °C e, posteriormente, enviadas para análise. A purificação e extração de DNA, a preparação molecular das amostras e o sequenciamento de alta performance da região V3–V4 do gene 16S rRNA (Illumina MiSeq) foram realizados

pelo Laboratório Neopropecta Microbiome – Florianópolis, Brasil (Christoff et al., 2017). Em resumo, a extração de DNA foi realizada seguindo um protocolo (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, Brasil), cujos detalhes estão sujeitos a direitos de propriedade intelectual. O DNA foi quantificado em um fluorímetro Qubit com o kit de ensaio dsDNA BR (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Após a quantificação, o DNA foi diluído para $0,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e armazenado a -20°C para análises moleculares. A preparação das bibliotecas seguiu um protocolo (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, Brasil), cujos detalhes estão sujeitos a direitos de propriedade intelectual. A amplificação foi realizada com os primers específicos para a região V3–V4 do gene 16S rRNA, 341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (CAPORASO et al., 2011; WANG; QIAN, 2009). As bibliotecas foram sequenciadas no Sistema de Sequenciamento MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA), utilizando primers padrão fornecidos pelo fabricante, com 500 ciclos e sequenciamento paired-end.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

4.3.1 Quantificação de H₂ e CO₂ por GC-TCD

A concentração de H₂ e CO₂ no headspace foi medida por cromatografia gasosa (GC-TCD/FID-8; modelo GC-2014ATFSLP; Shimadzu, Kyoto) com uma coluna empacotada Carboxen 1000 60/80 mesh, 15'x1/8" SS (i.d. 2,1 mm) e um metanador acoplado (MTZ-1) (Shimadzu, Kyoto). O H₂ é identificado no detector TCD. A injeção do gás a ser analisado no GC foi realizada manualmente para um volume de 1 mL (PACIONI, 2017). O cromatógrafo a gás e o metanador utilizados no processo possuem as seguintes características: temperatura de 10 a 400 °C, com taxa de aquecimento entre 7 e 30 °C por minuto, e pressão de 0 a 970 kPa. A unidade de injeção de amostra é um injetor de dupla capilaridade (Split/splitless), com coluna para análise empacotada e análise capilar - MDQ, e detectores TCD. O controlador de fluxo do gás de arraste é AFC, com fluxo variando de 0 a 1200 mL por minuto. O metanador opera a uma temperatura de 100 a 450 °C, utilizando como catalisador Shimalite-Ni.

4.3.2 Quantificação de ácidos graxos voláteis

Para a quantificação dos ácidos graxos voláteis, 5 mL de amostras dos isolados foram transferidas para um frasco SPME de 20 mL, e os compostos voláteis

foram coletados por HS-SPME usando uma fibra DVB/CAR/PDMS, STABLEFLEX, 24Ga fornecida pela Supelco (Bellefonte, PA). A incubação e extração ocorreram a 80°C por 1800s e 3600s, respectivamente, sob agitação contínua (250 rpm). A dessorção foi realizada no injetor do GC a 250°C por 900s. Todo o processo de incubação, extração e dessorção dos compostos voláteis foi automatizado utilizando um amostrador automático Combi-Pal (GC autosampler 80, Agilent)(AFSAH-HEJRI et al., 2023).

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo gasoso GC (GC 7890A, Agilent) acoplado a um espectrômetro de massa (5875C, Agilent). As injeções foram feitas no modo splitless, e os compostos voláteis foram separados em uma coluna HP-5 MS (5%-fenil)-metilpolissiloxano 30 m x 250 µm x 0.25 µm) conectada a uma fonte de EI (Ionização por Impacto Eletrônico) operando a 70 eV com um analisador de massa por quadrupolo. A varredura de massa abrangeu de 30 a 500 m/z. A temperatura da linha de transferência foi mantida a 250 °C. O hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo constante de 0,8 mL/min. As condições de temperatura do forno foram de 35 °C por 2 min, aumentando a 8 °C/min até 250 °C por 2 min. A identificação dos compostos voláteis foi verificada por comparação com a biblioteca espectral do *National Institute of Standards and Technology* (NIST)(AFSAH-HEJRI et al., 2023).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LEVANTAMENTO DE CEPAS DE *CLOSTRIDIUM* PRODUTORAS DE AGVs E BIOH₂

A digestão anaeróbia convencional é composta por quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. A segunda etapa, a acidogênese, é responsável pela formação de ácidos (CHENG; BAO; YANG, 2019). A fermentação acidogênica ocorre através de vias metabólicas coexistentes em processos anaeróbios, que determinam os produtos formados pelo direcionamento do ácido pirúvico, que pode ser bioconvertido em uma ampla gama de produtos, tais como acetato, propionato, butirato, etanol, propanol, butanol, H₂ e CO₂. A escolha da via metabólica está relacionada com os parâmetros operacionais adotados na fermentação acidogênica, como tipo de inóculo, substrato, pH e temperatura.

Inóculos de origem anaeróbia com inibição de microrganismos metanogênicos, pH próximo de 7,0 e temperatura acima de 30 °C são fatores que geralmente aceleram a cinética da reação de acidogênese, resultando em uma produção mais rápida de acetato, o ácido que se forma em maiores quantidades durante o processo de digestão anaeróbia. Além dos fatores mais comuns, como pH e temperatura, a redução de equivalentes redutores pode favorecer a via metabólica do tipo butirato, em que o NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) é consumido para reduzir acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA e crotonil-CoA a butiril-CoA. Assim, a produção de butirato aumenta com o aumento do acetato no sistema, devido ao fato de que a alta concentração de ácido acético interfere na geração de acetato (inibição por retroalimentação) e também leva a um grande excedente de NADH.

As bactérias do gênero *Clostridium* são anaeróbicas e metabolizam desde carbono inorgânico, como CO e CO₂, até fontes mais complexas, como carboidratos e gorduras, produzindo intermediários importantes industrialmente, como 1,3-propanodiol (PDO), ácido propiônico, dihidroxiacetona, etanol, ácido succínico, ácido cítrico e biosurfactantes (Jang et al., 2012). As cepas de *C. butyricum* são geralmente relatadas pela produção de PDO a partir de glicerol como substrato. Além disso, este microrganismo mostra-se promissor na síntese de ácido butírico.

A Tabela 2 abaixo, demonstra as cepas de *Clostridium* caracterizadas por serem promissoras ao estudo, pois são produtoras de AGVs (principalmente ácido acético e ácido butírico) e bioH₂.

Tabela 2 - Cepas de *Clostridium* selecionadas

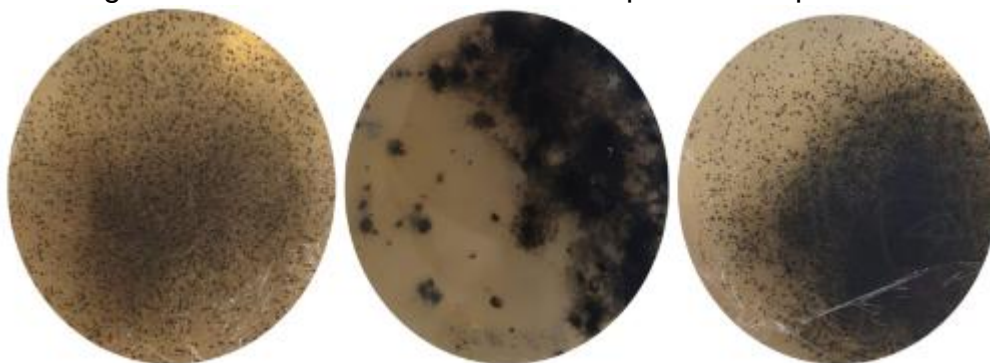
Via metabólica	Cepa de <i>Clostridium</i>	Nível de biossegurança	Temperatura (°C)	Substrato	Produtos
Acidogênica	<i>C. butyricum</i> ATCC19398	1	37	Glicose e dissacarídeos	Ácido acético e Ácido butírico, acetona, butanol, etanol, CO ₂ e H ₂
	<i>C. tyrobutyricum</i> ATCC 25755	1	37	Glicose, xilose e acetato	Ácido acético e Ácido butírico, CO ₂ e H ₂
	<i>C. thermobutyricum</i> ATCC 49875	1	55	Glicose, xilose e celulobiose	Ácido acético e Ácido butírico, CO ₂ e H ₂
Hidrolítica	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	1	55	Celulose e açúcares	Enzimas hidrolíticas
	<i>C. cellulolyticum</i> ATCC 35319	1	37	Celulose e açúcares	Enzimas hidrolíticas
	<i>C. cellulovorans</i> ATCC 743B	1	37	Celulose e açúcares	Enzimas hidrolíticas

5.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *Clostridium* sp. PRODUTORAS DE ÁCIDO BUTÍRICO E BIOH_2

Conforme relatado por (REGINATTO, 2016), o pré-tratamento ácido (H_2SO_4) do lodo anaeróbico resultou no isolamento de um microrganismo produtor de hidrogênio. Neste estudo, a metodologia foi adaptada, substituindo-se o ácido sulfúrico (H_2SO_4) pelo tampão fosfato-citrato. Esse tampão mantém a estabilidade do pH necessário inicialmente, evitando alterações durante o período de incubação de 12 horas. Alguns microrganismos liberam metabólitos secundários no meio, o que facilita o crescimento de microrganismos que preferem pH neutro. Portanto, o uso do tampão seleciona microrganismos que formam esporos, como as cepas de *Clostridium*, pois eles se adaptam melhor a condições atípicas e, conseqüentemente, melhoram o isolamento.

Após o pré-tratamento (descrito no item 4.2.1), as amostras foram plaqueadas em meio DRCM. (descrito no item 4.2.2). Devido à presença do citrato de ferro (III) na formulação do DRCM, torna-se possível observar o escurecimento do meio, indicando redução do sulfito. Tal fato, ressalta a presença de bactérias redutoras de sulfito, características comuns das cepas do gênero *Clostridium* (EISGRUBEF; REUTER, 1995). A Figura 2 ilustra o surgimento de colônias de tonalidades escuras, o que sugere o isolamento bem-sucedido de cepas do gênero *Clostridium*.

Figura 2 - Imagens das colônias de *Clostridium* na primeira etapa de isolamento

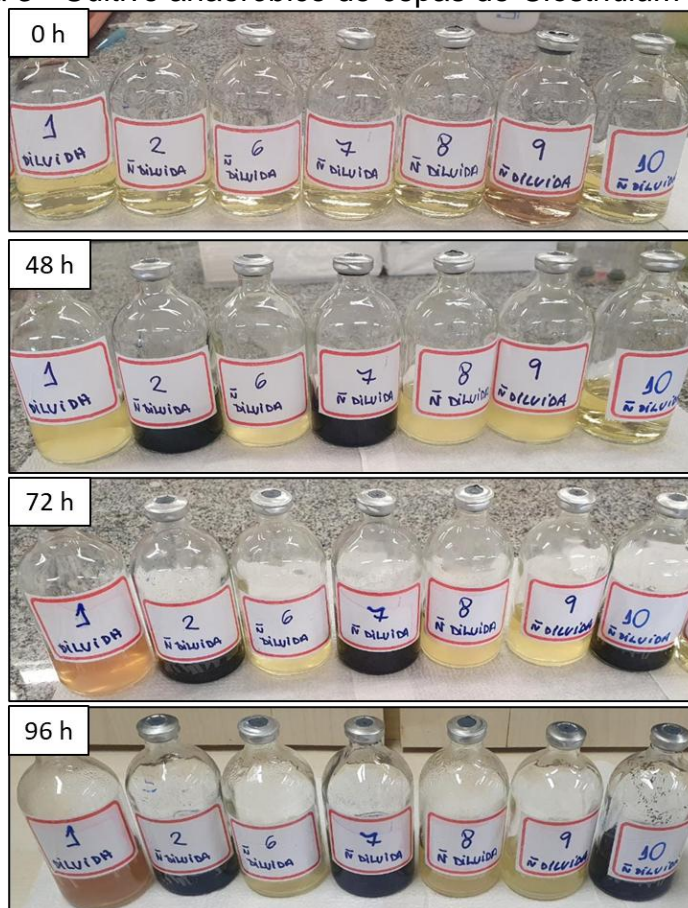


Fonte: Autor

As colônias obtidas nas placas da primeira etapa foram propagadas novamente em uma segunda e terceira etapas de isolamento. Como resultado, foram isoladas 10

colônias microbianas do inóculo tratado, denominadas ISO01, ISO02, ISO03, ISO04, ISO05, ISO06, ISO07, ISO08, ISO09 e ISO10 (Figura 3).

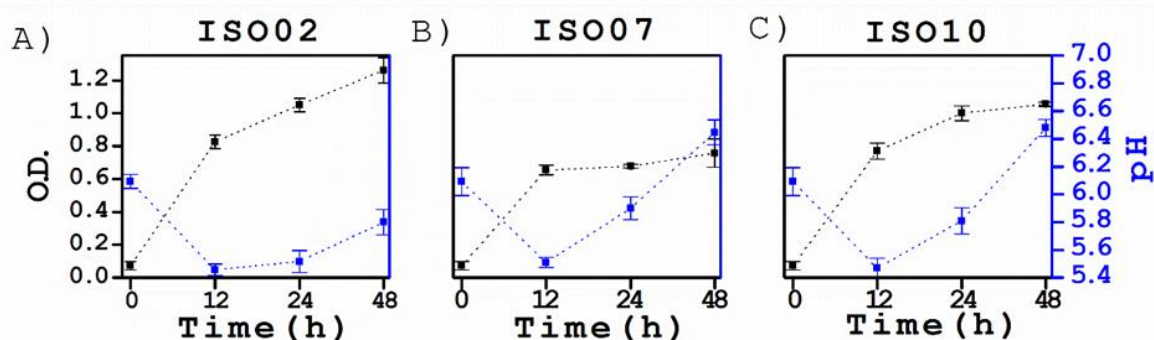
Figura 3 - Cultivo anaeróbico de cepas de *Clostridium*



Fonte: Autor

Todas as colônias isoladas foram submetidas a ensaios de fermentação em lote para avaliar a produção de gases de interesse. Entre as colônias testadas, apenas três isolados, designados como ISO02, ISO07 e ISO10, demonstraram produção significativa de gases após 48 horas sob as condições experimentais estabelecidas. Esses isolados foram submetidos a uma cinética de crescimento em meio RCM, visando a obtenção de parâmetros específicos relacionados à sua dinâmica de crescimento e capacidade de produção de gases.

Figura 4 - Teste cinético dos isolados: (A)ISO02, (B)ISO07, (C)ISO10



Fonte: Autor

Na Figura 4A, pode-se observar que o isolado ISO02 apresentou um prolongamento da fase Log, estendendo-se até 48 horas. Em contrapartida, o isolado ISO07, ilustrado na Figura 4B, exibiu uma fase Log significativamente mais curta, durando apenas 12 horas. Já o isolado ISO10, mostrado na Figura 4C, seguiu um padrão intermediário, com a fase Log se estendendo até 24 horas. Esses comportamentos também refletiram nas variações de pH observadas. Inicialmente, todos os isolados mostraram uma redução no pH durante as primeiras 12 horas. No entanto, após essa queda inicial, foi observado um comportamento distinto nos isolados ISO07 e ISO10. Conforme demonstrado nas Figuras 4B e 4C, após as primeiras 12 horas de redução, o pH desses isolados começou a aumentar, indicando uma possível adaptação metabólica.

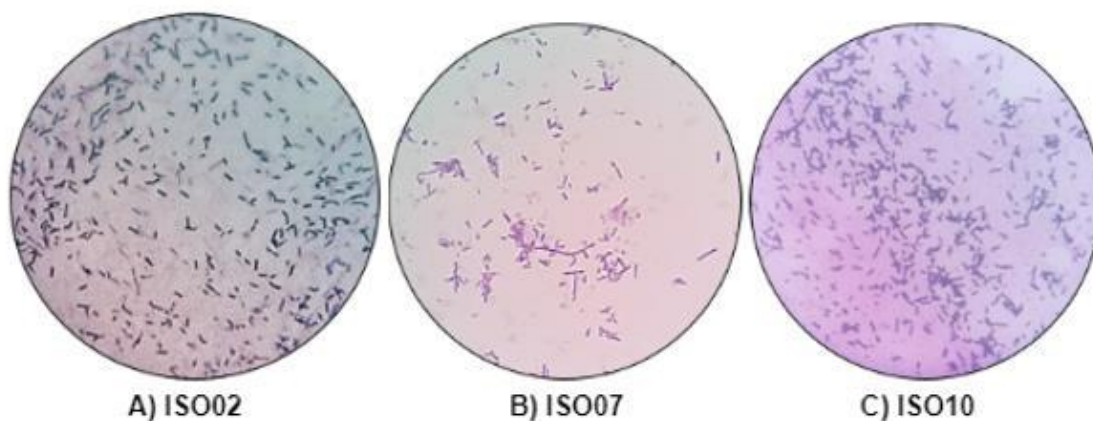
Esses fatos observados contribuem para a validação do isolamento. De acordo com (MILLAT, 2017), cepas de *Clostridium*, produzem metabolismo fermentativo caracterizado por duas fases distintas: acidogênese e solventogênese. Durante uma fermentação em batelada, como mostrado na Fig. 4, a mudança de acidogênese para solventogênese está ligada à fase de crescimento. Na fase exponencial inicial e intermediária, as células produzem ácidos para maximizar a produção de ATP, resultando na diminuição do pH do meio de cultura. À medida que a densidade celular aumenta e a cultura entra na fase estacionária, inicia-se a formação de solventes. Enquanto o consumo de açúcar continua, as células reabsorvem os ácidos previamente excretados, aumentando o pH da cultura.

Os resultados obtidos para o perfil de produção de gás revelaram que, ao final do processo, todos os isolados produziram quantidades significativas de gás. Especificamente, foram registradas produções de $11,5 \pm 0,85$ mL para o isolado

ISO02, $12,10 \pm 1,02$ mL para o isolado ISO07 e $14,80 \pm 0,9$ mL para o isolado ISO10. De acordo com Espinola et al. (2017), cepas de *Clostridium* são conhecidas por produzirem hidrogênio e dióxido de carbono nas proporções de 48% e 23%, respectivamente, validando os achados deste estudo.

Uma análise de coloração de Gram, avaliando cor e forma, é essencial para confirmar o isolamento das cepas. Portanto, após o ensaio fermentativo foi realizada a caracterização morfológica e morfotintorial das colônias selecionadas. A microscopia mostrou que os microrganismos isolados exibiram coloração Gram-positiva e morfologia de bastonetes, o que também era consistente com Cepas de *Clostridium*, conforme ilustrado na figura 5.

Figura 5 - Imagens de microscopia com ampliação para os isolados



Fonte: Autor

Para identificar as bactérias produtoras de ácido butírico e bioH_2 (ISO02, ISO07 e ISO10), o DNA genômico foi extraído para a amplificação da sequência do gene 16S rRNA. Em seguida, a sequência de bases obtida foi comparada com o banco de dados GenBank.

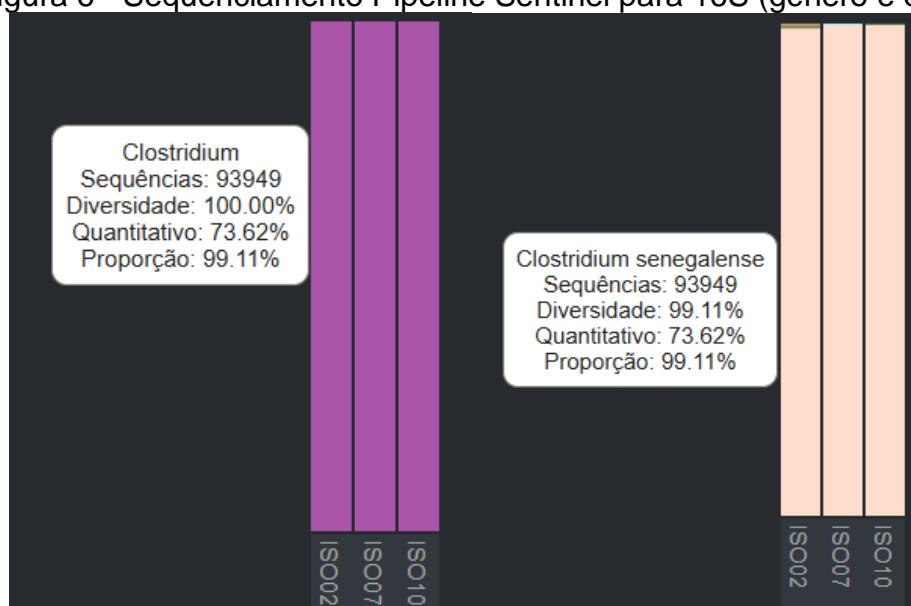
5.2.1 Análise do sequenciamento dos isolados

O sequenciamento de alta performance da região V3–V4 do gene 16S rRNA, amplificada a partir do DNA genômico das cepas isoladas ISO02, ISO07 e ISO10, revelou uma nova variante dentro da espécie *Clostridium senegalense*. A Figura 5 apresenta uma análise abrangente do gênero bacteriano *Clostridium*, destacando a predominância expressiva de *C. senegalense* nas amostras ISO02, ISO07 e ISO10.

Foram identificadas 93.949 sequências relacionadas a esse gênero e à sua espécie principal, demonstrando uma ampla presença nos dados avaliados. A diversidade observada para o gênero é de 100%, indicando que todas as amostras analisadas são exclusivamente representadas por *Clostridium*, sem contribuição de outros gêneros. Para a espécie *Clostridium senegalense*, a diversidade é de 99,11%, sugerindo uma leve possibilidade de presença de outras espécies em conjunto.

Na análise quantitativa, *Clostridium* e sua espécie *C. senegalense* representam 73,62% do total de microrganismos sequenciados, confirmando sua significativa abundância relativa. Além disso, a proporção de 99,11% para ambos reforça sua posição como os principais ou quase exclusivos componentes bacterianos das amostras analisada conforme mostra a figura 6.

Figura 6 - Sequenciamento Pipeline Sentinel para 16S (gênero e espécie)



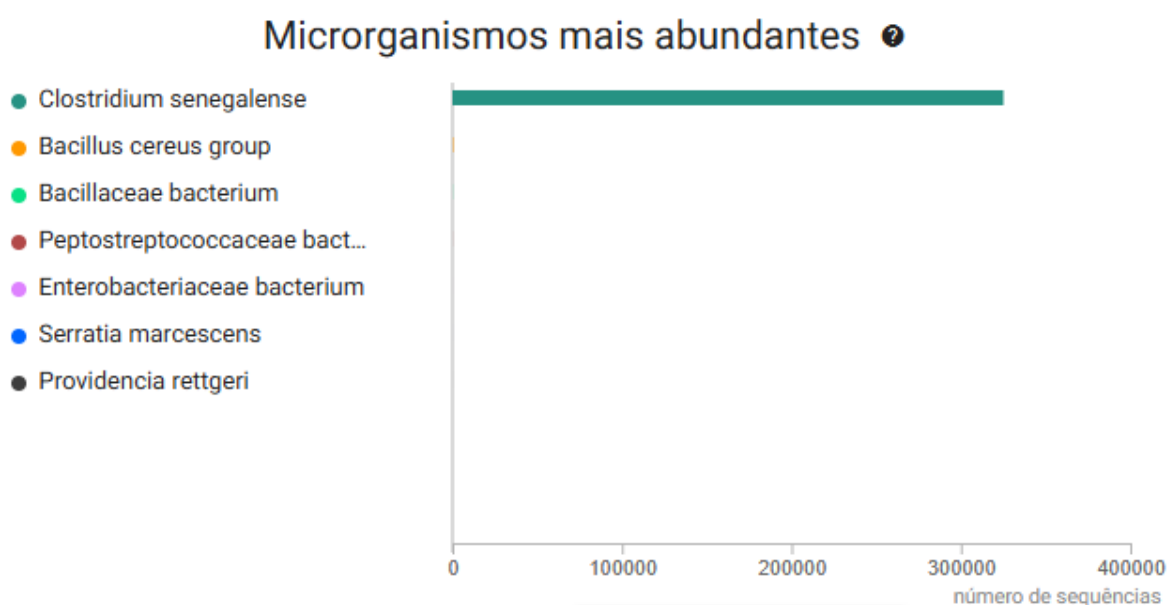
Fonte: Neoprosecta

A partir da análise da quantidade de sequências de DNA associadas aos microrganismos mais abundantes identificados, também é possível observar a predominância de *Clostridium senegalense* em comparação com outras espécies ou grupos microbianos (Fig 7). A barra correspondente a *Clostridium senegalense* exibe um número significativamente maior de sequências, aproximando-se de 400.000, o que o destaca como o microrganismo mais abundante nas amostras avaliadas.

Outros microrganismos, como o *Bacillus cereus*, bactérias da família Bacillaceae, *Peptostreptococcaceae bacterium*, e representantes de

Enterobacteriaceae, além de espécies como *Serratia marcescens* e *Providencia rettgeri*, apresentam números de sequências consideravelmente menores, refletindo uma menor contribuição relativa para a composição microbiana total, podendo estar associados a erros de análise comparativa com o banco de dados.

Figura 7 - Sequências de DNA encontradas em um microrganismo



Fonte: Neoprospecta.

Os resultados obtidos evidenciam uma forte similaridade genética com a espécie *Clostridium senegalense*. A alta dominância observada reflete fatores ambientais e condições específicas, como pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e interações microbianas, que favoreceram o crescimento e a presença predominante dessa bactéria, confirmando o sucesso do processo de isolamento. As outras espécies, embora presentes, desempenham papéis secundários ou de menor relevância no contexto específico do estudo.

5.3 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOH₂ PELOS ISOLADOS

A partir do *headspace* gasoso das amostras de isolados foi possível confirmar a produção de hidrogênio e gás carbônico. Os resultados preliminares obtidos por cromatografia gasosa demonstraram parâmetros de tempo de retenção de 1 a 1,27 min para hidrogênio e um tempo de retenção para CO₂ de 3,30 a 4,30 min. A quantificação desses compostos é mostrada na tabela abaixo.

Tabela 3 - Quantificação de hidrogênio e dióxido de carbono produzidos pelos isoladas por cromatografia gasosa

Amostras	Hidrogênio (%mol/ mol)	Dióxido de Carbono (%mol/ mol)
ISO02	5,57 ± 0,82	30,40 ± 0,91
ISO07	6,15 ± 1,15	20,23 ± 1,06
ISO10	5,62 ± 0,5	23,23 ± 0,75

Durante as fases do processo de fermentação das cepas de *Clostridium*, são produzidos hidrogênio e dióxido de carbono como subprodutos. Segundo (REGINATTO, 2016), o pH inicial do meio é crucial para a produção de H₂, influenciando o crescimento bacteriano e a concentração de solventes. Em espécies de *Clostridium*, a redução do pH de 6 para 4,5 está associada à mudança na fase de crescimento. O crescimento máximo ocorre na fase acidogênica, que resulta na produção de H₂, acetato e butirato, sendo essa fase a que gera os maiores rendimentos de hidrogênio

De acordo com (ANANTHI et al., 2022), o pH ideal para a produção de hidrogênio está entre 5,5 e 6,5, faixa na qual se obtém a maior quantidade de gás hidrogênio e a menor quantidade de solvente. Este intervalo de pH não apenas otimiza a atividade metabólica das cepas de *Clostridium*, mas também influencia a eficácia da enzima hidrogenase, cuja atividade é inibida em pH baixos, reduzindo a geração de hidrogênio. Portanto, o controle do pH é essencial para maximizar a produção de hidrogênio pelas cepas de *Clostridium*, destacando sua importância na eficiência do processo fermentativo e na regulação das condições do meio.

5.4 ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COV) PELOS ISOLADOS

Os metabólitos solúveis foram analisados ao final de cada ensaio fermentativo, revelando a presença de ácidos orgânicos, como o ácido butírico e ácido acético, além de álcoois, aldeídos, ésteres e cetonas. Os principais compostos estão destacados na Figura 8.

Figura 8 - Principais compostos orgânicos voláteis produzidos pela ISO02, ISO07, ISO10

Compound name	Formula	MW (g/mol)	RT	ISO 02	ISO 07	ISO10
				Average Peak area (%)	Average Peak area (%)	Average Peak area (%)
Alcohols						
Ethanol	C ₂ H ₆ O	46,07	1,98	1,98		0,35
1-Butanol	C ₄ H ₁₀ O	74,12	3,45	2,85	0,38	0,25
3-Thietanol	C ₃ H ₆ OS	90,14	3,96	10,17		
1-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102,17	7,37	5,16		
1-Butanol, 3-methyl-	C ₅ H ₁₂ O	88,15	4,60	1,11	2,88	1,62
1-Nonanol	C ₉ H ₂₀ O	144,25	8,81	1,34		
1-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	130,23	11,61	1,68		
Alkane						
Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	C ₈ H ₂₄ O ₄ Si ₄	296,62	14,59	0,49	2,19	2,45
Benzene, (1-hexylheptyl)-	C ₁₉ H ₃₂	260,46	23,79	0,10		
Chlorinated compound						
Phenol, 2-chloro-4-(1,1-dimethylpropyl)-	C ₁₁ H ₁₆ ClO	198,69	18,03	0,15		13,00
Ester						
Phytol, acetate	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338,57	23,88	0,23		
Di-sec-butyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,34	24,35	0,13		
Acetic acid, hexyl ester	C ₈ H ₁₆ O ₂	144,21	10,43	0,14		
Propanoic acid, 2-methyl-, 3-methylbutyl ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	158,24	11,34			15,45
Butanoic acid, 3-methyl-, 3-methylbutyl ester	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172,26	12,29		0,24	3,81
Butanoic acid, 3-methylbutyl ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	158,24	11,31	8,55	2,43	0,32
Organic Acid						
Butanoic acid	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	6,70	3,78	2,34	
Butanoic acid, 3-methyl-	C ₅ H ₁₀ O ₂	102,32	7,62		0,83	

A detecção de ácidos graxos voláteis pode fornecer informações valiosas sobre as rotas metabólicas das bactérias. Durante o processo de fermentação anaeróbica, a produção de ácidos graxos voláteis ou dióxido de carbono (CO₂) provoca uma diminuição no pH do meio (ANANTHI et al., 2022).

De acordo com o estudo (REGINATTO, 2016), a segunda fase metabólica das cepas de *Clostridium* (solventogênese) começa quando o pH atinge cerca de 4,5, devido à acumulação de ácidos. Nesse pH, as células estão na fase estacionária e convertem acetato e butirato em butanol e acetona (proporção molar de butanol/acetona/etanol de 6:3:1). A presença de ácidos orgânicos também indica a produção de H₂, com o ácido butírico gerando dois moles de H₂ por mole de glicose. O ácido acético, por sua vez, leva a rendimentos mais altos de H₂, com quatro moles de H₂ por mole de glicose, em comparação aos dois moles gerados pelo ácido butírico. As espécies de *Clostridium* também podem gerar ácido láctico e etanol, mas esses compostos não participam diretamente da via metabólica do H₂.

É importante destacar que os testes realizados consistem em análises qualitativas preliminares, conduzidas sem a otimização de parâmetros, com o objetivo principal de verificar a produção de bioH₂ e AGVs. Os resultados desses ensaios indicaram uma resposta consistentemente positiva na produção de bioH₂ e AGVs em todos os isolados avaliados.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta tese confirmam o alcance dos objetivos propostos, demonstrando a viabilidade do isolamento de microrganismos não patogênicos do gênero *Clostridium* a partir de amostras ambientais para a produção de produtos de alto valor agregado, como ácidos graxos voláteis – com destaque para o ácido butírico – e hidrogênio.

Com base na análise apresentada, conclui-se que as bactérias do gênero *Clostridium* desempenham papel fundamental na fermentação acidogênica, destacando-se como promissoras na produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) e hidrogênio em processos anaeróbios. A escolha adequada de cepas, como as mencionadas na Tabela 2 (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* e *C. cellulovorans*), e o controle de parâmetros operacionais como pH, temperatura e substrato, permitem direcionar as vias metabólicas para a formação de produtos específicos.

Os testes de fermentação em meio sintético comprovaram a capacidade das cepas isoladas de produzir ácido butírico e hidrogênio, resultados reforçados por análises de cromatografia gasosa e líquida de alta eficiência, que evidenciaram a eficiência e versatilidade desses microrganismos na conversão de substratos em compostos de interesse industrial e energético. Além disso, o sequenciamento genético revelou uma forte similaridade das cepas isoladas com a espécie *Clostridium senegalense*, apresentando 99,11% de identidade genética.

Os resultados obtidos evidenciam que a identificação de uma possível nova estirpe produtora de ácido butírico e hidrogênio contribui significativamente para o avanço do conhecimento sobre a aplicação biotecnológica de microrganismos em processos fermentativos. A abordagem explorada também abre novas perspectivas para futuras otimizações na produção de produtos de alto valor agregado, envolvendo o uso de fontes alternativas de substratos e o planejamento de processos em escala industrial. Dessa forma, promove-se o fortalecimento da bioeconomia e a valorização de resíduos orgânicos, impulsionando soluções sustentáveis para os desafios industriais e ambientais.

REFERÊNCIAS

ABE, J. O. et al. ScienceDirect Hydrogen energy , economy and storage : Review and recommendation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 29, p. 15072–15086, 2019.

AFSAH-HEJRI, L. et al. Identification of volatile organic compounds (VOCs) by SPME-GC-MS to detect *Aspergillus flavus* infection in pistachios. **Food Control**, v. 154, n. May, p. 110033, 2023.

ANANTHI, V. et al. ScienceDirect A review on the impact of various factors on biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 52, p. 33–45, 2022.

BAER, S. H.; BLASCHEK, H. P.; SMITH, T. L. Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*. v. 53, n. 12, p. 2854–2861, 1987.

BIRGEN, C. et al. Biotechnology for Biofuels Butanol production from lignocellulosic biomass : revisiting fermentation performance indicators with exploratory data analysis. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1–15, 2019.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4516–4522, 2011.

CHENG, C.; BAO, T.; YANG, S. T. Engineering *Clostridium* for improved solvent production: recent progress and perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 14, p. 5549–5566, 2019.

CHI, X. et al. Bioresource Technology Hyper-production of butyric acid from delignified rice straw by a novel consolidated bioprocess. **Bioresource Technology**, v. 254, n. November 2017, p. 115–120, 2018.

EISGRUBER, H.; REUTER, G. A selective medium for the detection and enumeration of mesophilic sulphite-reducing clostridia in food monitoring programs. v. 28, n. 3, p. 219–226, 1995.

FONSECA, B. C. et al. Bioresource Technology Reports Butyric acid as sole product from xylose fermentation by a non-solventogenic *Clostridium beijerinckii* strain under controlled pH and nutritional conditions. **Bioresource Technology Reports**, v. 10, n. April, p. 100426, 2020.

FU, H. et al. Butyric acid production from lignocellulosic biomass hydrolysates by engineered *Clostridium tyrobutyricum* overexpressing xylose catabolism genes for glucose and xylose co-utilization. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 389–396, 2017.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70–78, 2012.

JIANG, L. et al. Butyric acid: Applications and recent advances in its bioproduction. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2101–2117, 2018a.

JIANG, L. et al. Butyric acid: Applications and recent advances in its bioproduction. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2101–2117, 2018b.

JIANG, Y. et al. Bioresource Technology Reports Current status and perspectives on biobutanol production using lignocellulosic feedstocks. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, n. May, p. 100245, 2019.

LLAMAS, M. et al. Microbial co-cultures for biochemicals production from lignocellulosic biomass: A review. **Bioresource Technology**, v. 386, n. May, 2023.

LUO, G. et al. com Butyric Acid Fermentation in Xylose and Glucose by *Clostridium tyrobutyricum*. v. 12, n. 2, p. 2930–2940, 2017.

MILLAT, T. Mathematical modelling of clostridial acetone-butanol-ethanol fermentation. p. 2251–2271, 2017.

MOORE, C. Butyric Acid Generation by *Clostridium tyrobutyricum* from Low-Moisture Anhydrous Ammonia (LMAA) Pretreated Sweet Sorghum Bagasse. p. 761–776, 2021.

PACIONI, T. R. Obtenção de gás de síntese por meio da gaseificação de resíduos agroindustriais com vapor de água. p. 183, 2017.

RAMBABU, K. et al. ScienceDirect Enhanced biohydrogen production from date seeds by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 42, p. 22271–22280, 2019.

RAMBABU, K. et al. Enhanced biohydrogen production from date seeds by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 42, p. 22271–22280, 2020.

REGINATTO, V. ScienceDirect Fermentative production of H₂ from different concentrations of galactose by the new isolate *Clostridium beijerinckii* Br21. v. 1, 2016.

RODIONOVA, M. V. et al. A comprehensive review on lignocellulosic biomass biorefinery for sustainable biofuel production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 3, p. 1481–1498, 2022.

SUN, J.; ZHANG, L.; LOH, K. C. Review and perspectives of enhanced volatile fatty acids production from acidogenic fermentation of lignocellulosic biomass wastes. **Bioresources and Bioprocessing**, 2021.

SUO, Y. et al. Bioresource Technology Butyric acid production from lignocellulosic biomass hydrolysates by engineered *Clostridium tyrobutyricum* overexpressing Class I heat shock protein GroESL. **Bioresource Technology**, v. 250, n. November 2017, p. 691–698, 2018.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

ZHANG, C. et al. Current progress on butyric acid production by fermentation. **Current Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 656–663, 2009.