

MARCELO RODRIGUES DE MELO

**BIOCONVERSÃO DE GLICERINA BRUTA DA INDÚSTRIA DO
BIODIESEL EM 1,3-PROPANODIOL POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE
AMOSTRAS AMBIENTAIS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

MARCELO RODRIGUES DE MELO

**BIOCONVERSÃO DE GLICERINA BRUTA DA INDÚSTRIA DO
BIODIESEL EM 1,3-PROPANODIOL POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE
AMOSTRAS AMBIENTAIS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.**

APROVADA: 18 de março de 2011

**Prof^a. Flávia Maria Lopes Passos
Co-Orientadora**

**Prof. Marcos Rogério Tótola
Co-Orientador**

Prof^a. Andréa de Oliveira Barros Ribon

Prof^a. Vera Lúcia dos Santos

**Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
Orientador**

A Deus ofereço com gratidão pelo privilégio e à família, Mário, Luzia, Ana Paula, Fernando, Renata, Gabriel, José, Luzia (*in memoriam*), Virgílio (*in memoriam*) e Leonina (*in memoriam*), dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao longo do caminho até o Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, o qual gentilmente abriu suas portas, muitas foram as pessoas e instituições que forjaram a pessoa e o profissional que sou hoje. Dos primeiros passos em Primeiro de Maio-PR, trago comigo as letras e os números, assim como o amigo Sérgio que “carreguei” durante a mudança para Ibitorã-PR. Uma mudança, um recomeço, e a oportunidade cursar a tão sonhada universidade onde conheci os amigos Camila, Carolina, Ernane, Luiz Henrique, Sandra Márcia... No curso de Biomedicina da UEL conheci também a Microbiologia, pela qual me apaixonei, graças aos ensinamentos e a amizade da Dra. Noemia Ishikawa. Não foi a primeira paixão, alguns anos antes já havia conhecido a Ana Paula, mas essa é uma longa história. Por meio da Dra. Noemia tomei conhecimento da UFV, a qual conheci pessoalmente, ainda durante a graduação, com a ajuda das professoras Cristina Vanetti e Catarina Kasuya. A graduação acabou, os amigos se mudaram, eu também, e mesmo assim continuamos próximos. Uma mudança, para Viçosa-MG, outro recomeço. Fui recebido pelo Prof. Hilário Mantovani no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e começava a ter três casas. Na casa de Londrina-PR ficou a família, na de Viçosa conheci o compadre Filipe a comadre Fabíola e, no Laboratório entrava para uma nova família, a dos Anaeróbios, e nessa nova casa já moravam o Marcelão, Janaína, Ana Andréa, Rafael, Fernanda, André, Isabela e José Carlos. Vieram também as amizades com as famílias vizinhas, Alimentos, Patógenos, Fisiologia, Micorriza, Industrial, Petróleo, Genética, Ecologia... Com o tempo, novos Anaeróbios chegaram, Aline, Cláudia, Aryádina, Alexandra, Anna Gabriella, Déborah, Juliana, Mônica, Wemerson, Analice, Samira... Durante esse período, dos mestres recebi os ensinamentos para a profissão e para a vida. Dos amigos, carinho e ajuda para vencer as dificuldades. Dos professores Frederico Passos, Flávia Passos, Marcos Tótola, Míriam dos Santos, Andréa Ribon e Vera Lúcia dos Santos, valiosas ajudas para engrandecer os trabalhos. Do professor Hilário, um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido. O caminho foi longo, e as pessoas que ajudaram na realização desse sonho, seja com um sorriso ou com a ajuda diária, inúmeras. A Pós-Graduação acabou, os amigos continuam se mudando, eu também, mas continuaremos sempre próximos...

MUITO OBRIGADO A TODOS!

“Observadores são necessários para criar o universo”

Amit Goswami

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO GERAL	1

CAPÍTULO I

Biodiesel, Glicerina e 1,3-Propanodiol: Mercado, Produção, Inter-relação e Perspectivas

RESUMO	4
1. BIODIESEL	5
1.1 Produção de Biodiesel	6
2. GLICEROL	8
2.1 Mercado do Glicerol	9
2.2 Usos Alternativos para o Glicerol e para a Glicerina de Biodiesel	10
3. 1,3-PROPANODIOL	13
3.1 Microrganismos Produtores de 1,3-Propanodiol	15
3.2 Metabolismo do Glicerol	16
3.3 Regulon <i>dha</i>	20
3.4 Produção Microbiana de 1,3-Propanodiol	21
Referências	25

CAPÍTULO II

Isolamento de Bactérias Bioconversoras de Glicerina Bruta em 1,3-Propanodiol

RESUMO	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1 Meio de Cultivo e Estocagem das Culturas	41

2.2 Enriquecimento de Microrganismos em Meio Contendo Glicerina Bruta	41
2.3 Isolamento de Microrganismos Utilizadores de Glicerina Bruta	43
2.4 Seleção de Microrganismos Produtores de 1,3-propanodiol	43
2.5 Identificação dos Microrganismos Produtores de 1,3-propanodiol	44
2.6 Procedimentos Analíticos	45
3. RESULTADOS	46
3.1 Enriquecimento de Microrganismos em Meio Contendo Glicerina Bruta	46
3.1.1 <i>Líquido de Rúmen</i>	46
3.1.2 <i>Solo</i>	47
3.1.3 <i>Esgoto</i>	48
3.1.4 <i>Dejetos suínos</i>	50
3.2 Seleção e Identificação de Microrganismos Produtores de 1,3-propanodiol	51
3.2.1 <i>Solo – batelada</i>	52
3.2.2 <i>Solo – cultura contínua</i>	53
3.2.3 <i>Esgoto – cultura contínua</i>	57
3.2.4 <i>Dejetos suínos – cultura contínua</i>	57
4. DISCUSSÃO	60
5. CONCLUSÕES	62
Referências	63

CAPÍTULO III

Fatores que Afetam o Crescimento e a Produção de 1,3-Propanodiol por Bactérias Isoladas por Enriquecimento em Glicerina Bruta

RESUMO	67
1. INTRODUÇÃO	68
2. MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.1 Microrganismos e Meios de Cultivo	70
2.2 Condições de Cultivo	70
2.3 Procedimentos Analíticos	71
3. RESULTADOS	73
3.1 Efeito da Temperatura de Cultivo sobre o Crescimento	73
3.2 Efeito do pH Inicial de Cultivo sobre o Crescimento e a Fermentação	74

3.3 Efeito da Concentração Inicial de Glicerol ou Glicerina Bruta sobre o Crescimento e a Fermentação	75
3.4 Efeito dos Produtos da Fermentação do Glicerol ou Glicerina Bruta sobre o Crescimento e a Fermentação	80
4. DISCUSSÃO	89
5. CONCLUSÕES	93
Referências	94

CAPÍTULO IV

Bioconversão de Glicerina Bruta em 1,3-Propanodiol por Bactérias Isoladas por Enriquecimento em Glicerina Bruta

RESUMO	98
1. INTRODUÇÃO	99
2. MATERIAL E MÉTODOS	101
2.1 Microrganismos e Meios de Cultivo	101
2.2 Condições de Cultivo	101
2.3 Delineamento Fatorial Fracionado	102
2.4 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	103
2.5 Procedimentos Analíticos	104
3. RESULTADOS	105
3.1 Produção de 1,3-propanodiol por <i>C. butyricum</i> Sb06 e <i>K. pneumoniae</i> Ec18	105
3.2 Delineamento Fatorial Fracionado	108
3.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	109
4. DISCUSSÃO	118
5. CONCLUSÕES	121
Referências	122
CONCLUSÕES GERAIS	125

LISTA DE SÍMBOLOS

ATP - adenosina trifosfato.

B2 - diesel de petróleo contendo 2 % (v/v) de biodiesel.

B3 - diesel de petróleo contendo 3 % (v/v) de biodiesel.

B4 - diesel de petróleo contendo 4 % (v/v) de biodiesel.

B5 - diesel de petróleo contendo 5 % (v/v) de biodiesel.

BTU - British Thermal Unit, equivalente a 1.055,05585 joules (J).

C - carbono.

Ca - cálcio.

CaCl₂ – cloreto de cálcio.

Co - cobalto.

CO₂ - dióxido de carbono.

CoA - coenzima A.

D - taxa de diluição (h⁻¹).

KDa - quilodalton.

DHAK - dihidroxiacetona cinase.

DO_{600nm} - densidade óptica a 600 nanômetros.

DO_{630nm} - densidade óptica a 630 nanômetros.

g – força centrífuga relativa.

g - grama.

GDH - glicerol desidrogenase.

GDHt - glicerol desidratase.

GlpF - proteína facilitadora da entrada de glicerol nas células.

h - hora.

H₂ - hidrogênio molecular.

HCl - ácido clorídrico.

K - potássio.

Kg - quilograma.

K₂HPO₄ - fosfato de potássio dibásico.

KH₂PO₄ - fosfato de potássio monobásico.

KOH - hidróxido de potássio.

L - litro.

m - massa.

M - molar (mol/L)
Mg - magnésio.
MgSO₄·7H₂O – Sulfato de magnésio heptahidratado.
min - minuto.
mL - mililitro.
mm – milímetro.
Mn - manganês.
mol - mol (quantidade de matéria ou de substância).
Na - sódio.
NaCl - cloreto de sódio.
Na₂CO₃ - carbonato de sódio.
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma oxidada.
NADH+H⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma reduzida.
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato em sua forma reduzida.
NaOH - hidróxido de sódio.
(NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônio.
O₂ - oxigênio molecular.
OH - grupos hidroxila.
P - fósforo.
PDOR - 1,3-propanodiol oxidoreductase.
PEP - fosfoenolpiruvato.
PbO - óxido de chumbo.
S - enxofre.
seg - segundo.
t - tonelada.
TCA - ciclo do ácido tricarboxílico.
v - volume.
Y_{P/S} - rendimento de produto por substrato (mol/mol ou g/g).
μ - velocidade específica de crescimento.
μL - microlitro.
μm - micrometro.
°C - graus Celsius.
US\$ - dólar americano.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.1.** Reação sequencial de transesterificação entre triglicerídeos e álcoois para produção de biodiesel 7
- Figura 1.2.** Metabolismo anaeróbio do glicerol por enterobactérias e clostrídios produtores de 1,3-propanodiol 18
- Figura 1.3.** Organização gênica do regulon *dha* em *K. pneumoniae* e *C. butyricum* 21

CAPÍTULO III

- Figura 3.1.** Plot de Arrhenius para *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 cultivados em meio basal contendo glicerol ou glicerina bruta nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C 73
- Figura 3.2** Cultivo de *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 em meio basal com pH inicial 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,0 74
- Figura 3.3** Crescimento de *C. butyricum* Sb06 cultivado em meio basal contendo glicerol ou glicerina bruta nas concentrações iniciais de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 e 200 g/L 76
- Figura 3.4** Crescimento de *K. pneumoniae* Ec18 cultivada em meio basal contendo glicerol ou glicerina bruta nas concentrações iniciais de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 e 200 g/L 78
- Figura 3.5** Efeito de 1,3-propanodiol, acetato e butirato sobre a μ_{\max} de *C. butyricum* Sb06 cultivado em meio basal contendo glicerol ou glicerina bruta. 80
- Figura 3.6** Efeito de 1,3-propanodiol, acetato, lactato e etanol sobre a μ_{\max} de *K. pneumoniae* Ec18 cultivada em meio basal adicionado de glicerol ou glicerina bruta .. 84

CAPÍTULO IV

- Figura 4.1** Cultivo de *C. butyricum* Sb06 em meio basal com pH controlado em 6,8 contendo 40 ou 80 g/L de glicerina bruta..... 106
- Figura 4.2** Cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 em meio basal com pH controlado em 6,8 contendo 40 ou 80 g/L de glicerina bruta 107
- Figura 4.3** Concentração final estimada de 1,3-propanodiol para *K. pneumoniae* Ec18 cultivada em meio basal RS contendo 80 g/L de glicerina bruta 112

Figura 4.4 Rendimento estimado de 1,3-propanodiol para <i>K. pneumoniae</i> Ec18 cultivada em meio basal RS contendo 80 g/L de glicerina bruta e concentração de fosfato (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) de 0,16 ou 1,6 mM.	113
Figura 4.5 Rendimento estimado de 1,3-propanodiol para <i>K. pneumoniae</i> Ec18 cultivada em meio basal RS contendo 80 g/L de glicerina bruta e concentração de extrato de levedura de 0 ou 10 g/L	114
Figura 4.6 Rendimento estimado de 1,3-propanodiol para <i>K. pneumoniae</i> Ec18 cultivada em meio basal RS contendo 80 g/L de glicerina bruta e pH 5,5 ou 7,0 g/L ...	115
Figura 4.7 Crescimento de <i>K. pneumoniae</i> Ec18 em condições de cultivo otimizadas.	116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.1. Produção microbiana de 1,3-propanodiol (PD), rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q) em diferentes sistemas de cultivo	23
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 2.1 Enriquecimento de líquido de rúmen em meio basal contendo glicerina bruta por cultivos sucessivos em batelada	46
Tabela 2.2 Enriquecimento de líquido de rúmen em cultura contínua contendo meio basal com glicerina bruta	47
Tabela 2.3 Enriquecimento de solo em meio basal contendo glicerina bruta por cultivos sucessivos em batelada	48
Tabela 2.4 Enriquecimento de solo em cultura contínua contendo meio basal com glicerina bruta	49
Tabela 2.5 Enriquecimento de esgoto em meio basal contendo glicerina bruta por cultivos sucessivos em batelada	49
Tabela 2.6 Enriquecimento de esgoto em cultura contínua contendo meio basal com glicerina bruta	50
Tabela 2.7 Enriquecimento de dejetos suínos em meio basal contendo glicerina bruta por cultivos sucessivos em batelada	51
Tabela 2.8 Enriquecimento de dejetos suínos em cultura contínua contendo meio basal com glicerina bruta	52
Tabela 2.9 Fermentação de glicerina bruta em meio basal por bactérias isoladas de amostra de solo enriquecida em cultivos sucessivos por batelada	53
Tabela 2.10 Fermentação de glicerina bruta em meio basal por bactérias isoladas de amostra de solo enriquecida em cultura contínua	54
Tabela 2.11 Fermentação de glicerina bruta em meio basal por bactérias isoladas de amostra de esgoto enriquecida em cultura contínua	58
Tabela 2.12 Fermentação de glicerina bruta em meio basal por bactérias isoladas de amostra de dejetos suínos enriquecida em cultura contínua	59

CAPÍTULO III

Tabela 3.1 Fermentação de glicerol por <i>C. butyricum</i> Sb06 cultivado em pH inicial 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,0	75
Tabela 3.2 Fermentação de glicerol por <i>K. pneumoniae</i> Ec18 cultivada em pH inicial 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0 e 4,5	75
Tabela 3.3 Fermentação de glicerol ou glicerina bruta nas concentrações iniciais de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 e 200 g/L, por <i>C. butyricum</i> Sb06 cultivado em meio basal	77
Tabela 3.4 Fermentação de glicerol ou glicerina bruta nas concentrações iniciais de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 e 200 g/L, por <i>K. pneumoniae</i> Ec18 cultivada em meio basal	79
Tabela 3.5 Efeito de diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol, acetato ou butirato sobre a fermentação do glicerol por <i>C. butyricum</i> Sb06 cultivado em meio basal adicionado de glicerol	82
Tabela 3.6 Efeito de diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol, acetato ou butirato sobre a fermentação de glicerina bruta por <i>C. butyricum</i> Sb06 cultivado em meio basal adicionado de glicerina bruta	83
Tabela 3.7 Efeito de diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol, acetato, lactato ou etanol sobre a fermentação do glicerol por <i>K. pneumoniae</i> Ec18 cultivada em meio basal adicionado de glicerol	86
Tabela 3.8 Efeito de diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol, acetato, lactato ou etanol sobre a fermentação de glicerina bruta por <i>K. pneumoniae</i> Ec18 cultivada em meio basal adicionado de glicerina	87

CAPÍTULO IV

Tabela 4.1 Valores reais dos níveis de cada fator avaliado no delineamento fatorial fracionado em meio basal FF contendo 80 g/L de glicerina bruta	103
Tabela 4.2 Valores reais dos níveis de cada fator avaliado no delineamento composto central rotacional em meio basal RS contendo 80 g/L de glicerina bruta	105
Tabela 4.3 Seleção dos fatores que influenciam a concentração final e o rendimento de 1,3-propanodiol do isolado <i>K. pneumoniae</i> Ec18	108
Tabela 4.4 Análise de variância para os valores reais da concentração final de 1,3-propanodiol de <i>K. pneumoniae</i> Ec18 no delineamento fatorial fracionado	109

Tabela 4.5 Análise de variância para os valores reais de rendimento de 1,3-propanodiol de <i>K. pneumoniae</i> Ec18 no delineamento fatorial fracionado	109
Tabela 4.6 Descrição da natureza da superfície de resposta na região ótima de concentração e rendimento de 1,3-propanodiol de <i>K. pneumoniae</i> Ec18	110
Tabela 4.7 Análise de variância para os valores reais do modelo quadrático de concentração final de 1,3-propanodiol por <i>K. pneumoniae</i> Ec18	111
Tabela 4.8 Análise de variância para os valores reais do modelo quadrático de rendimento de 1,3-propanodiol de <i>K. pneumoniae</i> Ec18	111

RESUMO

MELO, Marcelo Rodrigues de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2011. **Bioconversão de glicerina bruta da indústria do biodiesel em 1,3-propanodiol por bactérias isoladas de amostras ambientais.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-Orientadores: Flávia Maria Lopes Passos e Marcos Rogério Tótola.

O biodiesel é produzido por meio de reações de transesterificação entre óleos vegetais ou gorduras animais e álcoois (metanol ou etanol), resultando na formação de ésteres metílicos ou etílicos e glicerina bruta. Composto por glicerol, sabões, álcool, sais inorgânicos, ácidos graxos livres e outras matérias orgânicas, esse co-produto da indústria do biodiesel pode ser utilizado como substrato para produção microbiana de 1,3-propanodiol. Este diol tem sido produzido principalmente por vias petroquímicas e utilizado na produção de poliésteres, poliéteres, poliuretanos, solventes, adesivos, laminados, resinas, detergentes, anticongelantes e cosméticos. Neste trabalho, amostras de líquido de rúmen, solo, esgoto e dejetos suínos foram enriquecidas em meio contendo 5 % (v/v) de glicerina bruta, resultando no isolamento de 48 culturas produtoras de 1,3-propanodiol. As amostras de solo, esgoto e dejetos suínos contribuíram com 31, 12 e cinco culturas, respectivamente. Duas dessas culturas foram selecionadas para novos estudos e identificadas como *Clostridium butyricum* Sb06 e *Klebsiella pneumoniae* Ec18. *K. pneumoniae* Ec18 apresentou crescimento em concentrações de substrato (glicerol ou glicerina bruta) e 1,3-propanodiol de 200 e 80 g/L, respectivamente. Por outro lado, o crescimento de *C. butyricum* Sb06 foi totalmente inibido em concentrações de 160 e 40 g/L de substrato e 1,3-propanodiol, respectivamente. O crescimento dos isolados *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 foi favorecido em condições de neutralidade e os produtos da fermentação mais inibitórios ao crescimento foram o butirato e o acetato, respectivamente. O crescimento de *C. butyricum* Sb06 em meio basal, com e sem controle do pH do meio de cultivo, foi limitado a concentração de aproximadamente 1,5 g/L de biomassa, o que limitou a produção de 1,3-propanodiol em 10,23 g/L, com rendimento de 0,56 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}. O controle do pH do meio de cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 resultou em aumento de 2,5 vezes na

formação de biomassa e produção 13,96 e 21,43 g/L de 1,3-propanodiol, com rendimento de 0,43 e 0,42 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicérol}, em meio contendo 40 e 80 g/L de glicerina bruta, respectivamente. As condições de cultivo de *K. pneumoniae* Ec18, na presença de 80 g/L de glicerina bruta, foram otimizadas utilizando de forma sequencial o delineamento fatorial fracionado e a metodologia de superfície de resposta, resultando em aumento de 56 % na concentração final de 1,3-propanodiol e de 22 % no rendimento de 1,3-propanodiol, em relação ao cultivo nas condições não-otimizadas. Os resultados deste trabalho indicam que o isolado *K. pneumoniae* Ec18 possui potencial para bioconversão de glicerina bruta em 1,3-propanodiol. Entretanto, outros estudos deverão ser realizados para a adequação do sistema de cultivo e a redução da formação de co-produtos da fermentação que competem com a formação de 1,3-propanodiol.

ABSTRACT

MELO, Marcelo Rodrigues de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2011.
Bioconversion of crude glycerin from biodiesel industry in 1,3-propanediol by bacteria isolated from environmental samples. Adviser: Hilario Cuquetto Mantovani. Co-advisers: Flávia Maria Lopes Passos and Marcos Rogério Tótoła.

Biodiesel is produced by transesterification between vegetable oils or animal fats and alcohols (methanol or ethanol), a reaction that results in methyl or ethyl esters and crude glycerin. Composed of glycerol, soaps, alcohols, inorganic salts, free fatty acids and other organic matter, the crude glycerin can be used as a substrate for microbial production of 1,3-propanediol. This diol has been mainly produced by petrochemical routes and applied industrially for the production of polyesters, polyethers, polyurethans, solvents, adhesives, laminates, resins, detergents, antifreeze and cosmetics. In this study, samples of ruminal fluid, soil, sewage and pig manure were enriched in medium containing 5 % (v/v) of crude glycerin, resulting in the isolation of 48 cultures that produced 1,3-propanediol. The soil samples, sewage and pig manure contributed with 31, 12 and five cultures, respectively. Two cultures were selected for further studies and identified as *Clostridium butyricum* Sb06 and *Klebsiella pneumoniae* Ec18. *K. pneumoniae* Ec18 grew in concentrations of substrate (glycerol or crude glycerin) and 1,3-propanediol of 200 and 80 g/L, respectively. On the other hand, the growth of *C. butyricum* Sb06 was completely inhibited at concentrations of 160 and 40 g/L of substrate and 1,3-propanediol, respectively. The growth of *C. butyricum* Sb06 and *K. pneumoniae* Ec18 was favored by pH values near neutrality and butyrate and acetate, respectively, were the most inhibitory products of substrate fermentation. The growth of *C. butyricum* Sb06 in basal medium, with and without pH control, reached approximately 1.5 g/L of biomass, which limited the production of 1,3-propanediol in 10.23 g/L, with a yield of 0.56 mol_{1,3-propanediol}/mol_{glycerol}. The biomass formation by *K. pneumoniae* Ec18 grown in medium with controlled pH increased 2.5 times when compared to the uncontrolled pH cultivation. With pH control the production of 1,3-propanediol reached 13.96 and 21.43 g/L, and the yield was 0.43 and 0.42 mol_{1,3-propanediol}/mol_{glycerol} in medium containing 40 and 80 g/L of crude glycerin,

respectively. The culture conditions of *K. pneumoniae* Ec18 in the presence of 80 g/L of crude glycerin were sequentially optimized using the fractional factorial design and response surface methodology, resulting in an increase of 56 % in the final concentration of 1,3-propanediol and 22 % in the yield of 1,3-propanediol, when compared to cultivation in non-optimized conditions. These results indicate that *K. pneumoniae* Ec18 has potential for bioconversion of crude glycerin to 1,3-propanediol. However, further studies are needed to improve the cultivation system and reduce the formation of by-products that compete with 1,3-propanediol formation.

INTRODUÇÃO GERAL

A diminuição da importação de petróleo, o incentivo da produção rural, e as pressões crescentes pela adoção de modelos econômicos ecologicamente sustentáveis levaram a criação de programas de produção de biodiesel em vários países nas últimas décadas. Esses programas incentivam a produção e o uso do biodiesel nas frotas de seus países por meio de reduções fiscais e da exigência de limites mínimos de mistura ao diesel de petróleo. No Brasil a adição de biodiesel ao diesel de petróleo está fixada atualmente em 5 % (v/v), e os incentivos fiscais variam de acordo com a região produtora.

A produção de biodiesel é realizada por meio da transesterificação entre óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois, como metanol e etanol, gerando como principais produtos finais ésteres metílicos ou etílicos e glicerina bruta. Para cada 10 Kg de óleos vegetais ou gorduras reagidos com álcoois, cerca de 1 Kg de glicerina bruta é formada. Esse co-produto é composto principalmente por glicerol (30 a 85 %, m/m), sendo a massa restante composta principalmente de metanol, sabões e outras impurezas, que reduzem o valor comercial e impossibilitam a utilização direta da glicerina bruta pelo mercado. Para a inserção da glicerina bruta no mercado, o glicerol presente nesse co-produto deve apresentar pelo menos 80 % (m/v) de pureza, com menos de 1 % (m/v) de álcool residual.

O processo de purificação da glicerina bruta demanda investimentos em plantas de purificação, cuja rentabilidade depende da escala de produção. Essa condição, associada ao aumento na oferta de glicerina bruta, com consequente queda no preço do glicerol, tem diminuído consideravelmente a rentabilidade associada à purificação do glicerol, tornando a glicerina bruta um subproduto com custo associado ao seu descarte. No Brasil, a produção de biodiesel alcançou 2,05 milhões de toneladas ao final do ano 2010, com consequente produção de mais de 200 mil toneladas de glicerina bruta, em um mercado estimado em cerca de 40 mil toneladas de glicerol puro, já suprido por outros fornecedores.

Dentre as possibilidades atuais para a glicerina excedente está a substituição de outros polióis atualmente utilizados, como a substituição do sorbitol pelo glicerol. Modificações químicas do glicerol também têm sido alvo de estudos para produção de ácido glicérico, tri-*t*-butil glicerol éter, propilenoglicol (1,2-propanodiol), acroleína, glicerol carbonato, glicidol, epícloridrina, propanol, polímeros, entre

outros. Porém, essas alternativas são dependentes da purificação do glicerol presente na glicerina bruta. Outros possíveis usos para a glicerina bruta são a sua adição à alimentação animal ou a utilização como substrato em fermentações microbianas para produção dos ácidos succínico, cítrico e propiônico, butanol, etanol, poliidroxicanoatos e 1,3-propanodiol.

O 1,3-propanodiol é um composto com variadas aplicações na indústria, dentre as quais se destaca a produção do poliéster polítrimetileno tereftalato (PTT), que apresenta ótimas características para a produção de fibras têxteis. A produção comercial de 1,3-propanodiol é realizada por vias petroquímica e fermentativa, esta última utilizando microrganismos geneticamente modificados para o metabolismo de carboidratos como substrato. Para bactérias não modificadas geneticamente, o glicerol é o único substrato para a produção de 1,3-propanodiol, sendo também o fator de maior impacto sobre os custos da produção microbiológica de 1,3-propanodiol.

A maioria dos estudos para produção microbiológica de 1,3-propanodiol a partir de glicerol tem utilizado o glicerol puro como substrato. O uso da glicerina bruta da indústria do biodiesel para a produção microbiológica de 1,3-propanodiol é limitado pela presença de impurezas nesse substrato, as quais podem reduzir a eficiência fermentativa dos microrganismos utilizados. Contudo, a substituição do glicerol puro pela glicerina bruta, a qual apresenta valor até dez vezes inferior ao glicerol puro, pode viabilizar economicamente o processo. Neste estudo, foram selecionados microrganismos capazes de produzir 1,3-propanodiol a partir da glicerina bruta da indústria do biodiesel, avaliados os efeitos das condições de crescimento desses microrganismos e a produção de 1,3-propanodiol em sistema de batelada com controle de pH.

CAPÍTULO I

Biodiesel, Glicerina e 1,3-Propanodiol: Mercado, Produção, Inter-relação e Perspectivas

RESUMO

A produção e utilização do biodiesel como alternativa sustentável ao diesel de petróleo tem provocado a geração de quantidades consideráveis de glicerina bruta, seu principal co-produto. Produzida na proporção de 1 Kg para cada 10 Kg de biodiesel e composta principalmente por glicerol, a glicerina bruta aumentou consideravelmente a oferta do glicerol no mercado nos últimos anos, reduzindo os preços do glicerol purificado em até 80 %. A retração dos preços do glicerol reduziu a competitividade do processo de purificação da glicerina bruta, transformando esse co-produto, que antes contribuía para a cadeia produtiva do biodiesel, em um resíduo com custos associados ao seu descarte. Outra consequência tem sido a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias para utilização deste composto como matéria prima para reações químicas ou como substrato para fermentações microbianas. Dentre os possíveis produtos da utilização microbiana do glicerol, o 1,3-propanodiol, utilizado na produção de poliésteres, poliéteres, poliuretanos, solventes, adesivos, laminados, resinas, detergentes, anticongelantes e cosméticos, tem sido um dos principais focos de investigação em anos recentes. Nesse contexto, a utilização da glicerina bruta da indústria do biodiesel como substrato para produção do 1,3-propanodiol pode favorecer economicamente tanto a produção microbiana de 1,3-propanodiol quanto a cadeia produtiva do biodiesel.

1. BIODIESEL

Biodiesel é o nome dado a ésteres monoalquílicos de ácidos graxos derivados de lipídeos de origem animal ou vegetal, normalmente ésteres metílicos e etílicos, e sua utilização como combustível foi inicialmente proposta em 1937 em uma patente apresentada ao governo belga (CHAVANNE, 1937; KNOTHE, 2001). Anteriormente, no ano de 1900, a utilização de fontes renováveis como combustível em motores de combustão interna foi demonstrada, com a utilização de óleo de amendoim por Rudolf Diesel. No entanto, a alta viscosidade dos óleos vegetais, cujo uso resulta na formação de depósitos nas câmaras de combustão dos motores, aliada aos baixos preços do diesel de petróleo inibiram a utilização comercial tanto dos óleos vegetais quanto do biodiesel (KNOTHE, 2001).

As décadas de 1970 e 1980 marcaram a retomada do interesse por combustíveis alternativos ao diesel de petróleo, causada pelas crises do petróleo que elevaram consideravelmente seu preço e de seus derivados. Nessa época, foi criado o primeiro programa brasileiro para a produção de óleos vegetais destinados à combustão, o PRO-ÓLEO. Com uma proposta inicial de mistura de 30 % (v/v) de óleos vegetais ou de seus derivados ao diesel de petróleo, este programa pretendia substituir totalmente o diesel de petróleo. Contudo, o recuo dos preços do petróleo levou a desativação do programa em 1986 (POUSA *et al.*, 2007). Ainda na década de 1980 teve início na Europa a instalação de plantas de produção de biodiesel, as quais visavam estimular o setor rural e responder ao aumento na demanda energética (DUFÉY, 2006).

Essa iniciativa, somada a novas elevações dos preços do petróleo e a preocupação com a emissão de gases do efeito estufa resultou em aumento significativo da produção de biodiesel a partir de meados da década de 1990 (DUFÉY, 2006; VERTES *et al.*, 2006). No final dessa mesma década a utilização do biodiesel tornou-se tema de discussões do Governo Federal, que no ano de 2002 lançou por meio do Ministério da Ciência e Tecnologia o PROBIODIESEL (Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel) (POUSA *et al.*, 2007). A partir do ano de 2003, tiveram início os estudos sobre a viabilidade técnico-econômica da utilização do biodiesel que culminaram na criação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) em 2004 e a inserção do biodiesel

na matriz energética brasileira por meio da Lei Nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005 (BRASIL, 2005; POUSA *et al.*, 2007).

Com a implantação do PNPB o governo federal espera reduzir a importação do diesel de petróleo, que responde por aproximadamente 10 % de todo o diesel de petróleo consumido no país, incluir pequenos produtores rurais na cadeia produtiva do biodiesel e aumentar a participação das fontes renováveis na matriz energética nacional (BRASIL, 2004; SEGALL e ARTZ, 2007). Para alcançar esses objetivos, o PNPB estabeleceu misturas mínimas obrigatórias de biodiesel ao diesel de petróleo, com a inclusão de 2 % (v/v, B2) entre 2008 e 2012, e uma mistura de 5 % (v/v, B5) a partir de 2013. No entanto, a rápida expansão da cadeia produtiva do biodiesel no Brasil levou à antecipação das metas, sendo o B2 utilizado entre janeiro e junho de 2008, o B3 (3 %, v/v) entre julho de 2008 e junho de 2009, o B4 (4 %, v/v) entre julho e dezembro de 2009 e o B5 implantado a partir de 1 de janeiro de 2010 (ANP, 2008).

1.1 Produção de Biodiesel

A produção de biodiesel é normalmente realizada por meio da transesterificação dos triglicerídeos constituintes dos óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois como o metanol ou o etanol. Durante a reação de transesterificação os triglicerídeos são consecutivamente convertidos por meio de reações reversíveis a ésteres monoalquílicos e glicerol (Figura 1.1). Para que a reação ocorra com alta eficiência e favoreça a formação dos ésteres monoalquílicos utiliza-se excesso de álcool e catalisadores, sendo os mais utilizados o NaOH ou KOH. A reação de transesterificação também é afetada pelo tipo de álcool utilizado, temperatura e tempo de reação, conteúdo de água e ácidos graxos livres (BALAT e BALAT, 2008).

Como resultado da reação de transesterificação, formam-se duas fases distintas, as quais devem ser separadas. Menos densos, os ésteres constituem a fase superior e representam em torno de 90 % da massa reagida. Na fase inferior encontra-se a glicerina bruta, a qual contém cerca de 10 % da massa reagida e quantidades variáveis de glicerol, sabões, álcool, água, sais inorgânicos provenientes dos catalisadores, ácidos graxos livres, mono, di ou triglicerídeos que não reagiram, ésteres metílicos ou etílicos e outras matérias orgânicas (Figura 1.1) (RIVALDI *et*

al., 2007; PAGLIARO e ROSSI, 2008). Após a separação das fases, o biodiesel é purificado, normalmente por meio de lavagem e evaporação para neutralização dos catalisadores, remoção de álcoois e da glicerina bruta (BALAT e BALAT, 2008).

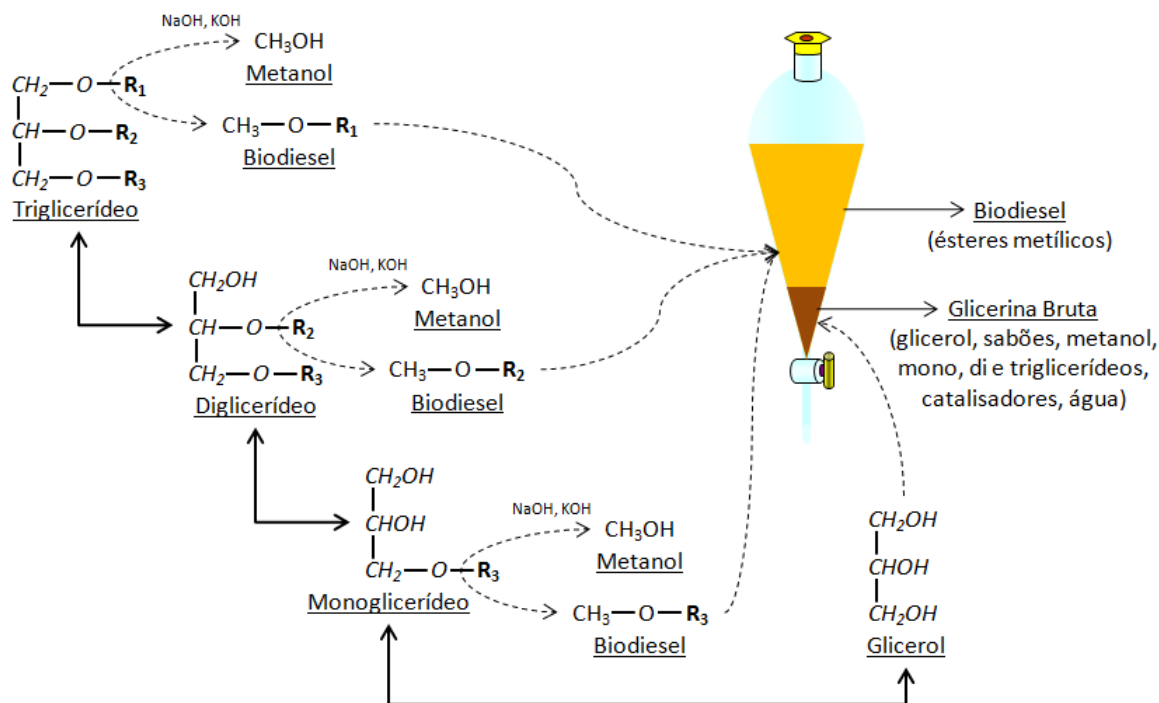


Figura 1.1. Reação sequencial de transesterificação entre triglicerídeos e álcoois para produção de biodiesel.

Uma vez purificado, o biodiesel utiliza a mesma infraestrutura de distribuição do diesel de petróleo e pode ser usado nos motores diesel atualmente produzidos sem que esses necessitem de adaptações. Devido a isto, atualmente o biodiesel é o único biocombustível capaz de substituir, parcial ou integralmente o diesel de petróleo (JOHNSON e TACONI, 2007), alcançando uma produção mundial de aproximadamente 12,8 milhões de toneladas (t) no ano de 2009, com aumento de 388 % na produção somente nos últimos cinco anos (JOHNSON e TACONI, 2007; BROWN, 2009). No mesmo quinquênio, a produção brasileira de biodiesel saltou de 633 t, no primeiro ano do PNPB, para 1,4 milhão de t no ano de 2009. Além disso, no ano de 2010 foram produzidos no Brasil 2,05 milhões de t de biodiesel, um aumento de 68,3 % em relação ao ano anterior (ANP, 2010b)¹.

Essa tendência de aumento na produção de biodiesel deve ser mantida, mesmo na ausência de novos aumentos na mistura diesel de petróleo-biodiesel,

¹ Valores calculados com base na densidade média do biodiesel de 0,86 Kg/L.

atualmente em 5 % (v/v), com a produção anual brasileira alcançando 2,3 milhões de t até 2014, e 2,5 milhões t de biodiesel ao final da próxima década (FAPRI, 2010). Contudo, estes valores podem ser excedidos se forem consideradas a capacidade de produção de biodiesel já instalada em território nacional de 4,8 milhões t/ano (ANP, 2010a). Além disso, estima-se que o potencial brasileiro de produção de biodiesel seja de 2,2 bilhões de t/ano considerando a capacidade total de produção de matérias primas (óleos vegetais e gorduras animais), sendo a demanda do mercado o maior fator limitante à expansão da produção de biodiesel (JOHNSTON e HOLLOWAY, 2007; ANP, 2010a).

Como consequências da rápida expansão da produção de biodiesel em âmbitos nacional e mundial, grandes quantidades de seus co-produtos têm alcançado o mercado. Dentre esses, o glicerol presente na glicerina bruta é um dos casos mais preocupantes. Inicialmente vendida com geração de renda para os produtores, a glicerina bruta tem se transformado em um resíduo, cuja disposição de acordo com as normas ambientais acarreta em custos para os produtores (WILLKE e VORLOP, 2004; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

2. GLICEROL

O glicerol (1,2,3-propanotriol) é um líquido incolor, inodoro, viscoso e com sabor doce. Seu nome é derivado da palavra grega *glykys*, que significa doce, sendo o termo glicerina normalmente utilizado para soluções comerciais na qual o glicerol é o principal componente (PAGLIARO e ROSSI, 2008). Componente básico das moléculas de gorduras animais e óleos vegetais, o glicerol é provavelmente a molécula orgânica mais antiga isolada pelo homem, por volta de 2.800 anos a.C., durante a fabricação de sabões (HUNT, 1999). Contudo, sua identificação e caracterização ocorreram apenas em 1779, quando Carl W. Scheele aqueceu uma mistura de azeite de oliva e PbO obtendo um líquido transparente e viscoso (PAGLIARO e ROSSI, 2008).

Os três grupos hidroxila (OH) presentes na molécula de glicerol permitem que este composto seja totalmente solúvel em água e também higroscópico. O glicerol também é solúvel em álcoois e levemente solúvel em vários solventes comuns como éter e dioxano, mas insolúvel em hidrocarbonetos (PAGLIARO e ROSSI, 2008). A natureza flexível da molécula do glicerol permite a formação de

ligações de hidrogênio inter e intramolecular, o que, aliado a suas demais propriedades, tornam o glicerol uma substância bastante versátil, com mais de 1.500 utilidades descritas (DAVID e HENRY-ACADEMY, 1996; CALLAM *et al.*, 2001).

Inicialmente, produzido a partir da hidrólise de óleos e gorduras nas fábricas de sabão, o glicerol teve sua demanda aumentada e direcionada para a produção de nitroglicerina e dinamite durante a I e II Guerras Mundiais. Durante esse período, o glicerol tornou-se um composto de importância estratégica para os países beligerantes, levando o governo americano a incentivar a produção de glicerol a partir da epícloridrina, obtida do propileno, para torná-la independente das fábricas de sabão. (PAGLIARO *et al.*, 2007). Porém, a entrada do glicerol oriundo da produção do biodiesel no mercado, nos últimos anos, tem reduzido a rentabilidade da produção de glicerol tanto pelo processamento de óleos e gorduras quanto por via petroquímica, levando ao fechamento de unidades de produção de glicerol de duas das maiores fabricantes mundiais, Procter & Gamble e Dow Chemical (MCCOY, 2006; MOTA *et al.*, 2009).

2.1 Mercado do Glicerol

O glicerol oriundo das indústrias de biodiesel, de processamento de óleos e gorduras e petroquímicas tem como principais aplicações a produção de fármacos (18 %), produtos de higiene pessoal (16 %), poliéter/polióis (14 %), alimentos (11 %), triacetina (10 %), resinas (8 %), tabaco (6 %), detergentes (2 %), celofane (2 %) e explosivos (2 %). Os 11 % restantes do mercado de glicerol estão distribuídos em diversos setores (PAGLIARO *et al.*, 2007). A demanda de glicerol gerada por esse mercado é estimada em 1,2 milhão de t/ano, com expectativa de crescimento de até 2,8 % ao ano. Além disso, a maior parte do mercado para o glicerol utiliza o produto de alto grau de pureza como especificado pela *United States Pharmacopeia* (USP) e *Food and Chemical Codex* (FCC) (CHOI, 2008; ZHOU *et al.*, 2008).

No Brasil, a demanda por glicerol segue a tendência mundial, sendo a produção absorvida principalmente pelas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia, tabagista e de tintas, as quais consomem de 35 a 40 mil t/ano (FAIRBANKS, 2009). Portanto, considerando a geração de aproximadamente 1 Kg de glicerina bruta, com concentração média de glicerol de 60 % (m/m), para cada 10 Kg de biodiesel produzidos, a disponibilidade de glicerina de biodiesel no mercado

nacional excede em mais de 80 mil t/ano a demanda por glicerol. Soma-se a este excedente, uma capacidade produtiva de 55 a 60 mil t/ano das empresas que antes do biodiesel já supriam o mercado nacional com o glicerol (SÂNZIO, 2008; FAIRBANKS, 2009).

O resultado imediato desse excesso de glicerol no mercado foi a queda acentuada de seus preços. No mercado nacional, o valor do glicerol bidestilado caiu de 2.200 US\$/t para 450 US\$/t entre a entrada dos primeiros lotes de glicerina de biodiesel no mercado, no ano de 2007, e o início de 2009. Desde então, a saída de fornecedores do mercado e a exportação de parte da glicerina, principalmente para a China, diminuíram a oferta de glicerol no mercado, elevando os preços para em torno de 1.100 \$/t (SÂNZIO, 2008; FAIRBANKS, 2009). Para a glicerina de biodiesel, os valores alcançados são ainda menores, de 114 - 228 US\$/t para a glicerina bruta e 342 - 457 US\$/t para a glicerina parcialmente tratada (glicerina loira - 80 %, m/m de glicerol), sendo que os custos para extração e destilação do glicerol presente na glicerina de biodiesel estão próximos do valor do glicerol purificado (RIVALDI *et al.*, 2007; FAIRBANKS, 2009)².

2.2 Usos Alternativos para o Glicerol e para a Glicerina de Biodiesel

Dentre as possibilidades imediatas para a expansão do mercado de glicerol estão a sua queima para geração de energia e o seu uso como substituto de polióis. A queima do glicerol para produção de energia térmica produz aproximadamente 19,8 mil BTU/Kg, com custo levemente inferior ao gás natural. No entanto, os sais presentes na glicerina de biodiesel podem se incrustar nas paredes do equipamento, diminuindo sua via útil, e levar à formação de quantidades consideráveis de cinzas (JOHNSON e TACONI, 2007). Além disso, a presença de água nesse resíduo diminui seu valor calorífico e sua queima incompleta pode levar à desidratação do glicerol e a formação de acroleína, um produto potencialmente tóxico (JOHNSON e TACONI, 2007; STEVENS e MAIER, 2008).

Por outro lado, o seu uso como poliálcool em substituição ao sorbitol, trimetilol propanol, pentaeritritol e propilenoglicol, depende da purificação do glicerol contido na glicerina de biodiesel. Outros fatores importantes para a substituição de polióis

² Preços estimados considerando a cotação do dólar americano (US\$) = 1,75 real (R\$).

pelo glicerol em produtos como cremes dentais, tabaco ou alimentos, são as possíveis alterações nas características do produto, as quais dependem da aceitação dos consumidores (CLAUDE, 1999). Ademais, os polióis são normalmente empregados em pequenas quantidades (0,05 a 1 %) nos produtos finais, não sendo suas substituições suficientes para absorver o excesso de glicerol disponível no mercado (CLAUDE, 1999; BONNARDEAUX, 2006).

Grandes quantidades de glicerol podem ser absorvidas por meio de sua utilização como matéria prima na indústria química, em substituição aos derivados de petróleo. No entanto, apenas recentemente o preço do glicerol tem se tornado competitivo, de modo que tecnologias e processos para sua utilização ainda estão em desenvolvimento (WERPY e PETERSEN, 2004). Dentre os processos estudados estão a oxidação seletiva ou a eterificação dos grupamentos hidroxila do glicerol para a produção de ácido glicérico ou tri-*t*-butil glicerol éter (GTBE), respectivamente. O primeiro pode ser utilizado na produção de novos tipos de poliéster, enquanto o GTBE pode ser utilizado como aditivo para aumento da octanagem em combustíveis e substituir o MTBE (éter metil-*t*-butílico), anteriormente utilizado e banido no Brasil e Estados Unidos (WERPY e PETERSEN, 2004; PAGLIARO *et al.*, 2007).

Outros processos em desenvolvimento são a hidrogenólise e a desidratação do glicerol. Pelo primeiro, obtêm-se o propilenoglicol (1,2-propanodiol), o qual pode ser utilizado como humectante e anticongelante. Por meio da desidratação do glicerol obtém-se a acroleína, que pode ser utilizada na síntese de ésteres de acrilato e apresenta grande potencial de mercado. Além disso, a versatilidade da molécula de glicerol permite ainda sua modificação química para a produção de compostos como glicerol carbonato, glicidol, epicloriglicina, propanol, polímeros, gás de síntese, entre outros (WERPY e PETERSEN, 2004; KOUTINAS *et al.*, 2007; PAGLIARO *et al.*, 2007).

A produção de compostos químicos a partir do glicerol apresenta como vantagens a diminuição da emissão de gases do efeito estufa e o estímulo da utilização do biodiesel, uma vez que contribui para o escoamento do seu principal co-produto (HERMANN *et al.*, 2007). Nesse sentido, as transformações químicas do glicerol não são as únicas opções de substituição para a indústria petroquímica, uma vez que o glicerol também pode ser utilizado como fonte de carbono em bioconversões microbianas. Como vantagem às transformações químicas, as

bioconversões microbianas possibilitam o uso tanto do glicerol purificado como da glicerina bruta (KOUTINAS *et al.*, 2007; CHOI, 2008).

Dentre os produtos da bioconversão do glicerol, aqueles com dois ou mais grupamentos reativos na molécula estão entre os mais promissores, pois além da transformação em outros intermediários químicos podem ser aplicados em reações de polimerização. Neste grupo de compostos encontra-se o ácido succínico, o qual pode ser utilizado na indústria química como matéria prima para a produção de outros compostos como 1,3-butanodiol, γ -butirolactona, tetraidrofurano, 2-pirrolidona e metilpirrolidona (WERPY e PETERSEN, 2004). Estima-se que a viabilidade econômica do processo de bioconversão de glicerol em ácido succínico dependa de uma produção mínima de 80 g/L (BEAUPREZ, 2010), a qual não foi obtida até o momento em estudos realizados com *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (LEE *et al.*, 2001) e *Escherichia coli* (DHARMADI *et al.*, 2006).

Com o objetivo de produzir plásticos com maior biodegradabilidade a produção de biopolímeros têm sido outro foco de pesquisas. Os polihidroxicanoatos (PHAs) podem ser acumulados como material de reserva por diferentes bactérias e têm sido produzidos a partir de glicerol com rendimentos de PHAs de até 87 % da biomassa seca utilizando *Zobellella denitrificans* (IBRAHIM e STEINBÜCHEL, 2010). Utilizando glicerina de biodiesel produzido com pinhão manso (*Jatropha curcas*), Shrivastav e colaboradores (2010) isolaram nove bactérias capazes de acumular PHAs e obtiveram rendimentos de até 75,8 % da massa seca de *Halomonas hydrothermalis*.

Produtos com grande mercado e demanda já consolidados também são opções atrativas para o consumo do glicerol excedente, como o ácido cítrico. Utilizado principalmente como flavorizante o ácido cítrico tem 90 % de sua produção total, 1,4 milhão de t/ano, realizada por meio da bioconversão de carboidratos por fungos, como *Aspergillus niger* (SOCCOL *et al.*, 2006). Resultados promissores têm sido obtidos por Rywinska e colaboradores (2010), obtendo concentrações de ácido cítrico de 157 g/L e rendimento de 0,6 g_{citrato}/g_{glicerol}. Estes resultados, obtidos em laboratório, são comparáveis aos obtidos em escala industrial por meio de fermentação, demonstrando o potencial desta aplicação (SOCCOL *et al.*, 2006; RYWINSKA *et al.*, 2010).

Com uma produção anual em torno de 200 mil t, suprida atualmente por via petroquímica, a bioconversão a ácido propiônico é outra opção para o consumo do

glicerol disponível (SUWANNAKHAM, 2005). Apresentando o mesmo potencial de oxido-redução do glicerol, o ácido propiônico pode ser produzido a partir desse substrato com rendimento teórico máximo de 1 mol_{propionato}/mol_{glicerol}. Rendimentos entre 0,79 e 0,84 mol_{propionato}/mol_{glicerol}, e concentrações finais de ácido propiônico entre 12 e 42 g/L, respectivamente, foram obtidos em estudos realizados com a bactéria *Propionibacterium acidipropionici* (BARBIRATO *et al.*, 1997; HIMMI *et al.*, 2000). Utilizando a bactéria ruminal *Selenomonas ruminantium* 22A, estudos realizados no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios da Universidade Federal de Viçosa, resultaram em rendimento de 0,92 mol_{propionato}/mol_{glicerol} e concentração final de 4,98 g/L de ácido propiônico (LOPES *et al.*, 2008).

O glicerol gerado na cadeia produtiva do biodiesel também pode retornar à cadeia de biocombustíveis por meio de sua bioconversão em etanol e butanol. Para o etanol, até o momento, apenas pequenas concentrações foram obtidas com os microrganismos *Klebsiella planticola* (1,38 g/L) (JARVIS *et al.*, 1997), *Enterobacter aerogenes* (4,49 g/L) (ITO *et al.*, 2005) e *Saccharomyces cerevisiae* (2,4 g/L) (YU *et al.*, 2010). Assim como o etanol, o butanol também pode ser utilizado em misturas com a gasolina, apresentando maior conteúdo energético, menor higroscopicidade e melhor capacidade de mistura quando comparados com a gasolina (DÜRRE, 2007). Bioconversões utilizando a bactéria *Clostridium pasteurianum* alcançaram concentrações de butanol de 17 g/L (BIEBL, 2001) e 21 g/L (SANCHEZ, 2009).

Os exemplos acima são apenas uma amostra das possibilidades e desafios criados pela grande oferta de glicerol no mercado, os quais incluem ainda a produção de ácido 3-hidroxiopropiônico (SUTHERS e CAMERON, 2005; RAJ *et al.*, 2008), 3-hidroxiopropionaldeído (DOLEYRES *et al.*, 2005), biomassa (RAJ *et al.*, 2002), lipídeos (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008), diidroxiacetona (GÄTGENS *et al.*, 2007), eritropoetina (CELIK *et al.*, 2008), ácido docosahexanóico (CHI *et al.*, 2007), ácido eicosapentanóico (CERÓN GARCÍ *et al.*, 2000) e 1,3-propanodiol (BIEBL *et al.*, 1999), este último, foco de várias pesquisas nos últimos anos (SAUER *et al.*, 2008).

3. 1,3-PROPANODIOL

O 1,3-propanodiol, também chamado de trimetileno glicol, é um diol de três carbonos que apresenta a fórmula molecular C₃H₈O₂. Este composto se apresenta como um líquido incolor e viscoso, miscível em água e etanol (The Merck Index,

2006). A presença de dois grupamentos hidroxila na molécula torna o 1,3-propanodiol um composto útil como monômero em reações de polimerização para produção de poliésteres, poliéteres e poliuretanos (ZENG e BIEBL, 2002; SAXENA *et al.*, 2009). De fato, a aplicação do 1,3-propanodiol na produção do poliéster PTT a partir de 1995 alterou consideravelmente a demanda por este glicol, que passou de *fine chemical* (<10.000 t/ano) para *bulk chemical*, com demanda superior a 80 mil t/ano ao valor de 1,76 US\$/Kg (ZENG e BIEBL, 2002; KRAUS, 2008).

Produzido a partir da polimerização de 1,3-propanodiol com ácido tereftálico, o PTT apresenta uma conformação em espiral que proporciona maior capacidade de estiramento e recuperação, menor temperatura de tingimento, maior aceitabilidade de cores, melhor manutenção das cores e resistência aos raios UV em relação aos demais poliésteres (CHUAH *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2005; KRAUS, 2008). Além da produção de PTT, o 1,3-propanodiol pode ser utilizado na produção de polímeros balísticos transparentes, resultado da combinação de 2,2,4,4-tetrametil-1,3-ciclobutanodiol com 1,3-propanodiol. Outros usos para o 1,3-propanodiol são a produção de tranquilizantes leves (Merprobamato), biocidas (PCT 3015, 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol), solventes, adesivos, laminados, resinas, detergentes, anticongelantes e cosméticos (ZENG e BIEBL, 2002; SAXENA *et al.*, 2009).

Atualmente, a produção comercial de 1,3-propanodiol está baseada na síntese química, através de dois processos diferentes desenvolvidos pela Shell Chemical Company e pela Degussa. No primeiro processo utiliza-se a hidroformilação do óxido de etileno, seguido por sua hidrogenação, com um rendimento de aproximadamente 80 % (CHUAH *et al.*, 1999). O processo utilizado pela Degussa realiza a hidratação catalítica da acroleína produzindo 3-hidroxiopropanol, o qual gera 1,3-propanodiol por meio de hidrogenação, com rendimento em torno de 60 % (LAWRENCE e SULLIVAN, 1972). Em ambos os casos, utilizam-se altas temperaturas, altas pressões e catalisadores caros, com liberação de intermediários tóxicos (SAXENA *et al.*, 2009).

Um terceiro processo em atividade desde 2002, desenvolvido pela DuPont em parceria com a Genencor, utiliza uma linhagem de *E. coli* geneticamente modificada para a produção de 1,3-propanodiol utilizando carboidratos como substrato (Genencor International and DuPont expand R&D collaboration to make key biobased polymer, 2001; FRAZZETTO, 2003). Os carboidratos são convertidos à glicerol por meio da expressão das enzimas glicerol-3-fosfato desidrogenase e

glicerol-3-fosfatase de *S. cerevisiae*, enquanto a produção de 1,3-propanodiol é realizada pela expressão da enzima glicerol desidratase de *K. pneumoniae* e de uma desidrogenase dependente de NADPH da própria *E. coli*, além de várias outras modificações que direcionam o glicerol para a produção de 1,3-propanodiol (CERVIN *et al.*, 2004; SAUER *et al.*, 2008). Dentre as vantagens da produção microbiológica do 1,3-propanodiol estão o uso de matérias-primas renováveis e de condições de produção amenas em comparação com as rotas petroquímicas. Ademais, estima-se que os riscos convencionais à saúde humana (acidente de trabalho, doenças, e riscos externos causados por emissões e desastres) da produção biotecnológica sejam 12 a 25 % menores quando comparados com a produção petroquímica (ROES e PATEL, 2007). No entanto, a alternativa apresentada pela DuPont não contempla a utilização de glicerol ou glicerina bruta como substrato para a produção de 1,3-propanodiol, permanecendo a necessidade de estudos para viabilizar suas utilizações (CHOI, 2008).

3.1 Microrganismos Produtores de 1,3-Propanodiol

A fermentação de glicerol com produção de 1,3-propanodiol foi descrita em 1881 (FREUND, 1881). Contudo, a ausência de aplicabilidade desse composto fez com que poucos trabalhos fossem dedicados à produção fermentativa de 1,3-propanodiol até a década de 1990, exceções aos trabalhos de Mickelson e Werkman (1940) com enterobactérias, Lin (1976) com as enzimas glicerol e diol desidratase, e Nakas *et al.* (1983) com *Clostridium pasteurianum*. Desde então, vários trabalhos sobre a produção de 1,3-propanodiol vêm sendo publicados, utilizando microrganismos naturalmente produtores, cujo único substrato utilizado para produção é o glicerol, ou organismos geneticamente modificados (BIEBL *et al.*, 1999; SAUER *et al.*, 2008; WILLKE e VORLOP, 2008).

Os microrganismos naturalmente produtores de 1,3-propanodiol podem ser divididos em quatro grupos: 1) enterobactérias; 2) clostrídios; 3) lactobacilos; e 4) microrganismos termofílicos e demais organismos (WILLKE e VORLOP, 2008). No primeiro grupo, encontram-se as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* (HOMANN *et al.*, 1990), *Citrobacter freundii* (MICKELSON e WERKMAN, 1940) e *Enterobacter agglomerans* (BARBIRATO *et al.*, 1995). No grupo dos clostrídios produtores de 1,3-propanodiol estão *C. butyricum*, *C.*

acetobutyricum, *C. beijerinckii* (FORSBERG, 1987), *C. pasteurianum* (NAKAS *et al.*, 1983) e *C. diolis* (BIEBL e SPROER, 2002). Nesses dois primeiros grupos encontram-se os principais organismos produtores de 1,3-propanodiol, *K. pneumoniae* e *C. butyricum* (CHOI, 2008).

Os microrganismos dos dois últimos grupos apresentam, em geral, menor produção de 1,3-propanodiol em relação às enterobactérias e clostrídios. Entre os lactobacilos, cinco espécies são capazes de produzir 1,3-propanodiol. *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri* (SCHÜTZ e RADLER, 1984), *L. collinoides* (CLAISSE e LONVAUD-FUNEL, 2000), *L. reuteri* (TALARICO *et al.*, 1990) e *Pediococcus pentosaceus* (VIZOSO PINTO *et al.*, 2004). Até o momento, apenas um microrganismo termofílico produtor de 1,3-propanodiol foi isolado, *Caloramator viterbensis* (SEYFRIED *et al.*, 2002), o qual tem sido agrupado com os demais produtores de 1,3-propanodiol, *Anaerovibrio burkinabensis* (OUATTARA *et al.*, 1992), *Ilyobacter polytropus* (STIEB e SCHINK, 1984) e *Pelobacter venetianus* (SCHINK e STIEB, 1983).

3.2 Metabolismo do Glicerol

O metabolismo do glicerol pelas bactérias produtoras de 1,3-propanodiol tem início com a entrada de glicerol na célula, a qual ocorre por meio da difusão simples através da membrana plasmática, equilibrando a concentração de glicerol no citosol à concentração externa (DA SILVA *et al.*, 2009). *K. pneumoniae* apresenta ainda uma proteína facilitadora, transmembrana, chamada GlpF, a qual forma poros seletivos permitindo o transporte do glicerol a favor de seu gradiente (SUN *et al.*, 2003). A presença dessa proteína facilitadora favorece o crescimento das bactérias em concentrações de glicerol abaixo de 8 mM (RICHEY e LIN, 1972; FU *et al.*, 2000). Uma vez no citoplasma, o metabolismo anaeróbico do glicerol pode ser dividido em dois ramos, redutivo e oxidativo (Figura 1.2) (FORAGE e LIN, 1982).

A primeira enzima do ramo redutivo é a glicerol desidratase (GDHt, E.C. 4.2.1.3.0), que remove uma molécula de água do glicerol produzindo 3-hidroxi-propionaldeído (DECKWER, 1995; CELINSKA, 2010). Esta enzima é dependente de adenosilcobalamina, a qual pode ser modificada pela clivagem da ligação Co-C durante a catálise do glicerol, inativando a holoenzima. A holoenzima também pode ser inativada por O₂ na ausência de substrato (TORAYA, 2000). Em

ambos os casos, a holoenzima pode ser reativada por meio da substituição da coenzima modificada por uma molécula de adenosilcobalamina intacta. Esta substituição é realizada pelo fator de reativação da GDHt na presença de ATP e Mg^{2+} (HONDA *et al.*, 1980). Diferentemente dos demais microrganismos, *C. butyricum* apresenta uma GDHt independente de adenosilcobalamina, a qual é inativada na presença de O_2 (RAYNAUD *et al.*, 2003; MAERVOET *et al.*, 2011). O 3-hidroxi propionaldeído anteriormente produzido é o substrato da enzima 1,3-propanodiol oxidoreductase (PDOR, E.C. 1.1.1.202), que reduz o 3-hidroxi propionaldeído à 1,3-propanodiol utilizando $NADH+H^+$ (Figura 1.2). PDOR é constituída de um octâmero de polipeptídeos de aproximadamente 43 KDa, competitivamente inibida por NAD^+ e requer Mn^{2+} para seu funcionamento (BARBIRATO *et al.*, 1995).

No ramo oxidativo, a enzima glicerol desidrogenase (GDH, E.C. 1.1.1.6), formada por seis unidades idênticas com aproximadamente 40 KDa cada, oxida o glicerol produzindo diidroxiacetona e $NADH+H^+$ (DANIEL *et al.*, 1995b). A diidroxiacetona formada na primeira reação pode ser fosforilada a diidroxiacetona-fosfato pela ação de duas diidroxiacetona cinases (E.C. 2.7.1.29) diferentes, ATP-dependente (DHAK I) ou fosfoenolpiruvato-dependente (DHAK II) (SUN *et al.*, 2003). No primeiro caso, a enzima é formada por duas subunidades, com massa molecular total de 53 KDa. A diidroxiacetona cinase fosfoenolpiruvato-dependente utiliza fosfoenolpiruvato (PEP) como doador de fosfato e apresenta três subunidades, sendo que a subunidade DhaM pode variar de 128 aminoácidos em *C. butyricum* a 473 aminoácidos em *K. pneumoniae* (DANIEL *et al.*, 1995b; SUN *et al.*, 2003).

Klebsiella sp. apresenta ainda uma via oxidativa alternativa, utilizada normalmente em aerobiose, pela qual o glicerol é metabolizado à glicerol-3-fosfato e posteriormente à diidroxiacetona-fosfato, pela ação das enzimas glicerol cinase (GlpK, E.C. 2.7.1.30) e glicerol-3-fosfato desidrogenase (GlpD, E.C. 1.1.5.3), respectivamente (FORAGE e LIN, 1982). Os lactobacilos, por outro lado, não são capazes de metabolizar o glicerol pela via oxidativa, mas o são pela via redutiva. Dessa forma, na presença de glicerol e de uma fonte metabolizável de carbono e energia (ex.: glicose), microrganismos como *L. brevis* e *L. buchneri* oxidam a glicose produzindo os $NADH+H^+$ necessários para a redução do glicerol à 1,3-propanodiol (SCHÜTZ e RADLER, 1984; VEIGA DA CUNHA e FOSTER, 1992).

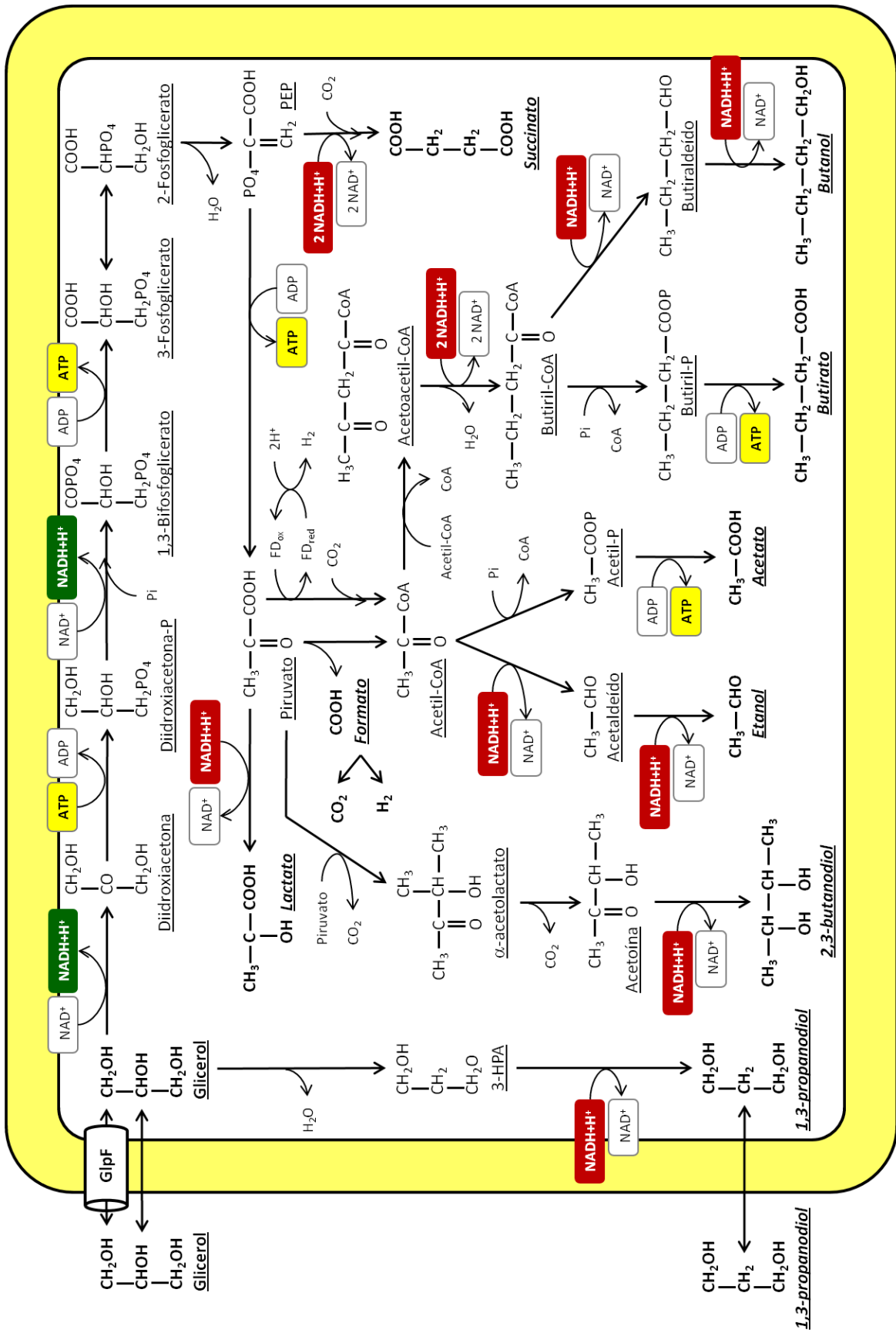


Figura 1.2. Metabolismo anaeróbio do glicerol por enterobactérias e clostrídios produtores de 1,3-propanodiol.

O destino da diidroxiacetona-fosfato formada no ramo oxidativo, em anaerobiose, é o metabolismo através da via glicolítica, até a formação de fosfoenolpiruvato (PEP) e piruvato. Em enterobactérias, o PEP é o precursor do succinato e do piruvato, que por sua vez, pode sofrer a ação das enzimas piruvato desidrogenase, ou piruvato formato liase, produzindo formato e acetil-CoA. A partir deste último são formados acetato e etanol, enquanto o formato pode ser clivado em H₂ e CO₂ (MENZEL *et al.*, 1997a). O piruvato também pode ser condensado produzindo α -acetolactato, acetoína e finalmente 2,3-butanodiol ou reduzido a ácido láctico (BIEBL *et al.*, 1999) (Figura 1.2). Entre os clostrídios, em geral, os dois principais produtos formados são acetato e butirato, o último produzido pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA. Contudo, em bactérias como *C. butyricum*, os equivalentes redutores gerados durante a clivagem do piruvato a acetil-CoA podem ser transferidos para uma ferredoxina, e posteriormente transferidos para coenzimas oxidadas (NAD⁺) através de uma NAD:ferredoxina oxidoreductase (ABBAD-ANDALOUSSI *et al.*, 1996). Outros produtos também produzidos, dependendo do clostrídio utilizado, são o etanol ou o butanol (Figura 1.2) (BIEBL *et al.*, 1999).

A partir da análise das vias de metabolismo do glicerol expostas na figura 1.2 e das demais vias metabólicas possivelmente ativas em anaerobiose, diferentes rendimentos teóricos têm sido calculados para o 1,3-propanodiol. Segundo Chen e colaboradores (2003) o rendimento teórico máximo é de 0,85 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}, considerando o metabolismo de todo o acetil-CoA produzido através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), sem fosforilação oxidativa dos equivalentes redutores e formação de acetato ou outros co-produtos. No entanto, em condições anaeróbias os intermediários do TCA são necessários apenas para a produção de biomassa, de forma que apenas parte do acetil-CoA formado é utilizado no TCA (MENZEL *et al.*, 1998). Por outro lado, se todo o acetil-CoA produzido for utilizado para produção de acetato, sem produção de H₂ e com seus equivalentes redutores utilizados na geração de coenzimas reduzidas, o rendimento teórico de 1,3-propanodiol alcança 0,72 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}, ou 0,67 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} se a formação de H₂ for considerada (ZENG *et al.*, 1993; ZENG, 1996).

Esses rendimentos raramente são alcançados, uma vez que, em condições normais de cultivo outras vias metabólicas competem com o 1,3-propanodiol pelas coenzimas reduzidas (ZENG *et al.*, 1993; ZENG, 1996). Essa flexibilidade

metabólica proporcionada pelas diferentes vias de reoxidação do $\text{NADH}+\text{H}^+$ é encontrada principalmente ao nível do piruvato e acetil-CoA e contribui para a manutenção da homeostase celular (ZHANG *et al.*, 2008; CELINSKA, 2010). Em contraste, análises da distribuição do glicerol entre as vias redutiva e oxidativa, utilizando dados de cultura contínua de *K. pneumoniae* sob diferentes taxas de diluição e diferentes concentrações iniciais de glicerol, demonstraram que a partição do glicerol é alterada apenas em relação ao fluxo absoluto pelas vias, mantendo constante sua distribuição relativa nas diferentes condições (ZHANG *et al.*, 2008). Esta rigidez dificulta o aumento da produção de 1,3-propanodiol através da superexpressão de genes relacionados à partição do glicerol entre os ramos redutivo e oxidativo e resulta das enzimas GDHt, PDOR e GDH, cujas atividades *in vivo* e *in vitro* variam quase nas mesmas frequências durante as oscilações (MENZEL *et al.*, 1996; AHRENS *et al.*, 1998).

3.3 Regulon *dha*

Os genes para as três enzimas responsáveis pela rigidez da partição do glicerol entre as vias redutiva e oxidativa (GDHt, PDOR e GDH) e da enzima DHAK fazem parte do regulon chamado *dha* e são expressos coordenadamente na presença de glicerol ou dihidroxiacetona e na ausência de aceptores externos de elétrons como oxigênio, fumarato ou nitrato (FORAGE e FOSTER, 1982; FORAGE e LIN, 1982). Os genes destas quatro enzimas encontram-se agrupados no genoma das bactérias produtoras de 1,3-propanodiol *K. pneumoniae* (TONG *et al.*, 1991), *C. freundii* (DANIEL e GOTTSCHALK, 1992) e *C. butyricum* (RAYNAUD *et al.*, 2003). Além disso, em todos os organismos onde a organização gênica do regulon *dha* foi caracterizada, os genes do ramo oxidativo e do ramo redutivo do glicerol se encontram distribuídos próximos uns aos outros. Contudo, diferenças nos genes presentes e em suas organizações dentro do regulon indicam a existência de regulons *dha* diversos (Figura 1.3) (SUN *et al.*, 2003).

Em *K. pneumoniae*, seis genes estão relacionados ao ramo redutivo do regulon *dha*, são eles: *dhaB*, *dhaC*, *dhaE*, *dhaF*, *dhaG* e *dhaT*. Os três primeiros são responsáveis pelas subunidades α , β e γ da GDHt, respectivamente. PDOR é codificada apenas pelo gene *dhaT* enquanto os genes *dhaF* e *dhaG* codificam as subunidades grande e pequena do fator de reativação de GDHt, respectivamente.

Outros cinco genes codificam as três enzimas do ramo oxidativo, *dhaD* (GDH), *dhaK* (DHAK I), *dhaK3*, *dhaK2*, *dhaK1* (subunidades grande, pequena e média da DHAK II, respectivamente) (SUN *et al.*, 2003; CELINSKA, 2010). O regulon *dha* também apresenta um gene regulador, *dhaR*, cujo produto induz a expressão de DHAK II (BACHLER *et al.*, 2005), GDH (DANIEL *et al.*, 1995a) e PDOR (ZHENG *et al.*, 2006). Próximo aos genes do regulon *dha* também está presente o gene *glpF* que codifica a proteína facilitadora GlpF, contudo, não se sabe se esta proteína é coordenadamente expressa com os genes do regulon *dha* (SUN *et al.*, 2003).

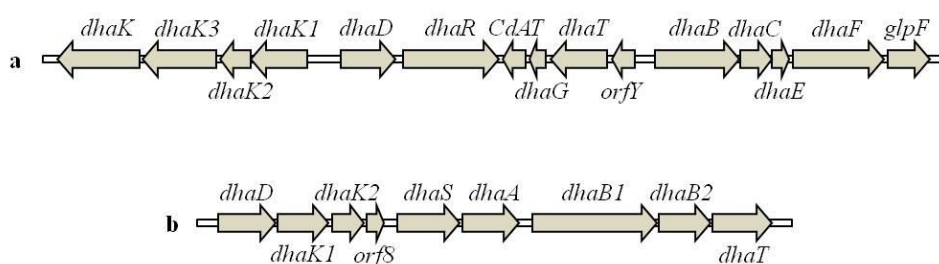


Figura 1.3. Organização gênica do regulon *dha* em *K. pneumoniae* (a) e *C. butyricum* (b). Adaptado de Sun *et al.* (2003) e Celinska (2010).

Diferentemente de *K. pneumoniae*, em *C. butyricum* todos os nove genes do regulon *dha* são transcritos no mesmo sentido. As duas enzimas do ramo oxidativo são codificadas pelos genes *dhaD*, *dhaK1*, *dhaK2* e *orf8*, sendo os três últimos referentes à DHAK (SUN *et al.*, 2003). *C. butyricum* não apresenta um regulador transcricional como DhaR, por outro lado, os genes *dhaS* e *dhaA* codificam um sistema de dois componentes, sendo o primeiro gene responsável pela histidina cinase sensora e o segundo pela proteína reguladora de resposta. Contudo, não existe até o momento confirmação de controle do regulon *dha* por este sistema de dois componentes (RAYNAUD *et al.*, 2003). Apenas três genes codificam as enzimas relacionadas ao ramo redutivo do regulon *dha*, *dhaB1* (GDHt coenzima B₁₂-independente), *dhaB2* (fator de reativação de GDHt) e *dhaT* (PDOR) (RAYNAUD *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2003).

3.4 Produção Microbiana de 1,3-Propanodiol

Os principais microrganismos utilizados para a bioconversão de glicerol em 1,3-propanodiol são *K. pneumoniae* e *C. butyricum*. Quando comparados, estes dois

modelos para a produção de 1,3-propanodiol apresentam vantagens e desvantagens para o processo de produção (DECKWER, 1995; ZENG e BIEBL, 2002). Em relação à manipulação, *C. butyricum* pertence à classe de risco 1 (GRAS), enquanto *K. pneumoniae* é um organismo potencialmente patogênico (classe de risco 2). Por outro lado, a enterobactéria pode ser facilmente manipulada por se tratar de um microrganismo anaeróbio facultativo, enquanto *C. butyricum* é um anaeróbio estrito e requer cuidados para não contaminação do ambiente com oxigênio (O₂) (WILLKE e VORLOP, 2008).

Além de apresentar maior facilidade de manipulação, *K. pneumoniae* também apresenta, em geral, maior velocidade de crescimento, que resulta em maior produtividade volumétrica (g/L/h) de 1,3-propanodiol, e maior tolerância ao 1,3-propanodiol em relação a *C. butyricum*. Esse, por sua vez, produz normalmente apenas acetato e butirato como co-produtos da fermentação do glicerol, culminando em maior rendimento final ($Y_{P/S}$) de 1,3-propanodiol em relação à enterobactéria (BIEBL *et al.*, 1999; WILLKE e VORLOP, 2008). No entanto, a possibilidade de uso de técnicas e ferramentas de manipulação genética empregadas com sucesso para *E. coli*, em *K. pneumoniae*, tem favorecido a escolha deste microrganismo em estudos que utilizam a engenharia genética para aumento da produção de 1,3-propanodiol, inclusive em condições micro-aeróbia e aeróbia (CELINSKA, 2010).

Outros fatores importantes para a produção microbiana de 1,3-propanodiol são a linhagem do microrganismo e a estratégia de fermentação adotada. A Tabela 1.1 apresenta uma compilação de trabalhos realizados nos últimos 15 anos com diferentes microrganismos e estratégias fermentativas, na qual se observa que apenas alguns trabalhos utilizam como substrato a glicerina bruta, oriunda do processo de transesterificação para produção de biodiesel (CELINSKA, 2010). Isto se deve à presença de contaminantes na glicerina bruta que, em geral, afetam a produção de 1,3-propanodiol (KOUTINAS *et al.*, 2007). No entanto, um dos principais fatores para a produção microbiana de 1,3-propanodiol é o preço da matéria prima, no caso o glicerol. Baseado em dados obtidos por Deckwer (1995), Biebl e colaboradores (1999) estimaram o custo da produção microbiológica de 1,3 propanodiol como:

$$\mathbf{1,3\text{-propanodiol} = 1 + 2 \times (\text{preço do glicerol})}$$

Tabela 1.1. Produção microbiana de 1,3-propanodiol (PD), rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q) em diferentes sistemas de cultivo. Adaptado de Willke e Vorlop (2008), e Saxena *et al.* (2009).

Metodologia	Organismo	Substrato	PD (g/L)	$Y_{P/S}$ (mol/mol)	Q (g/L/h)	Referência
Batelada	<i>K. pneumoniae</i> M5al	Glicerol puro	58,8	0,53	0,92	Cheng <i>et al.</i> (2007)
	<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Glicerol puro	56,0	0,62	2,2	Biebl <i>et al.</i> (1992)
	<i>C. butyricum</i> VPI 3266	Glicerol puro	35,0	0,65	0,6	Saint-Amans <i>et al.</i> (1994)
	<i>C. butyricum</i> CNCM 1211	Glicerol puro	67,0	0,63	-	Himmi <i>et al.</i> (1999)
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC	Glicerol puro	73,3	0,48	0,92	Cameron <i>et al.</i> (1998)
Batelada alimentada	<i>K. pneumoniae</i> M5al	Bio-Glicerol ¹	53,0	0,41	0,94	Cheng <i>et al.</i> (2006)
	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Glicerina bruta	53,0	0,47	1,7	Mu <i>et al.</i> (MU <i>et al.</i> , 2006)
	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Glicerol puro	75,0	0,61	2,2	Liu <i>et al.</i> (2007)
	<i>K. pneumoniae</i> AC15	Glicerol puro	71,0	0,64	2,37	Zheng <i>et al.</i> (2008)
	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Glicerina bruta ²	61,1	0,51	2,0	Mu <i>et al.</i> (2008)
	<i>K. pneumoniae</i> LDH526	Glicerol puro	102,1	0,52	2,13	Xu <i>et al.</i> (2009)
	<i>C. acetobutylicum</i> DG1	Glicerina bruta	83,9	0,65	1,7	González-Pajuelo <i>et al.</i> (2005b)
	<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Glicerol puro	58,0	0,68	2,7	Günzel <i>et al.</i> (1991)
	<i>C. butyricum</i> VPI 3266	Glicerol puro	65,0	0,69	1,0	Saint-Amans <i>et al.</i> (1994)
	<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Glicerol puro	70,3	0,68	1,5	Abbad-Andaloussi <i>et al.</i> (1995)
	<i>C. butyricum</i> E5	Glicerina bruta	58,4	0,53	1,2	Petitdemange <i>et al.</i> (1995)
	<i>C. butyricum</i> DSM 5431	Glicerol puro	70,4	0,68	1,4	Reimann e Biebl (1996)
	Batelada alimentada em dois estágios	<i>K. pneumoniae</i> AC15	Glicerol puro	74,0	0,62	3,08
Cultura contínua	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Glicerol puro	48,5	0,61	4,9	Menzel <i>et al.</i> (1997b)
	<i>C. butyricum</i> VPI 3266	Glicerol puro	30,0	0,61	10,3	González-Pajuelo <i>et al.</i> (2005a)
Cultura contínua com dois estágios	<i>C. butyricum</i> F2b	Glicerina bruta	46,3	0,53	3,4	Papanikolaou <i>et al.</i> (2000)
	<i>C. butyricum</i> F2b	Glicerina bruta	43,5	0,49	1,33	Papanikolaou <i>et al.</i> (2008)
Batelada micro-aeróbica	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Glicerol puro	59,5	-	1,57	Chen <i>et al.</i> (2003)
Batelada alimentada micro-aeróbica	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Glicerol puro	72,0	0,57	2,1	Liu <i>et al.</i> (2007)
	<i>K. oxytoca</i> LDH3	Glicerol puro	83,5	0,62	1,39	Yang <i>et al.</i> (2007)
Batelada alimentada aeróbica	<i>K. pneumoniae</i> XJPD-Li	Glicerol puro	65,26	0,56	3,16	Ma <i>et al.</i> (2009)
	<i>K. pneumoniae</i> TUAC01	Glicerol puro	70,6	0,56	1,05	Hao <i>et al.</i> (2008)
Células imobilizadas	<i>K. pneumoniae</i> ZJU 5205	Glicerol puro	4,1	0,3	16,4	Zhao <i>et al.</i> (2006)
	<i>C. freundii</i> DSM 30040	Glicerol puro	16,4	0,57	8,2	Pflugmacher e Gottschalk (1994)

¹Glicerol produzido por cultura de *Candida krusei* ICM-Y-05 a partir de glicose.

²Glicerol obtido através de transesterificação enzimática (lípase de *Candida Antarctica*, Novozym 435)

Assumindo esta equação e os preços atuais do glicerol puro no mercado, em torno de 1,10 US\$/Kg, o custo estimado da bioconversão do glicerol em 1,3-propanodiol é de aproximadamente 3,20 US\$/Kg. Contudo, o preço do 1,3-propanodiol produzido por rotas petroquímicas está em torno de 1,76 US\$/Kg, inviabilizando a produção microbiana a partir do glicerol (KRAUS, 2008). Por outro lado, se for utilizada a glicerina bruta (60 %, m/m de glicerol), a qual tem valor entre 0,11 e 0,23 US\$/Kg, o custo do 1,3-propanodiol bioconvertido irá variar entre 1,38 e 1,76 US\$/Kg, sendo economicamente competitivo como o 1,3-propanodiol atualmente produzido. Desta forma, uma das principais estratégias para viabilizar economicamente a produção microbiológica do 1,3-propanodiol é o uso da glicerina bruta. Para alcançar este objetivo, no entanto, é necessária a obtenção de linhagens microbianas capazes de tolerar altas concentrações de glicerina bruta e converter eficientemente este substrato em 1,3-propanodiol (KOUTINAS *et al.*, 2007; CELINSKA, 2010).

Referências

ABBAD-ANDALOUSSI S, DURR C, RAVAL G, PETITDEMANGE H (1996) Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. **Microbiology** 142 (5):1149-1158.

ABBAD-ANDALOUSSI S, MANGINOT-DURR C, AMINE J, PETITDEMANGE E, PETITDEMANGE H (1995) Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. **Appl Environ Microbiol** 61 (12):4413-4417.

AHRENS K, MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD (1998) Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation. **Biotechnol Bioeng** 59 (5):544-552.

ANP (2008) RESOLUÇÃO ANP Nº 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008. [http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$q=\\$x=\\$nc=8430](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$q=$x=$nc=8430). Accessed 17/08/2010 2010

ANP (2010a) Boletim Mensal de Biodiesel : abril de 2011. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. <http://www.anp.gov.br/SITE/acao/download/?id=37366>. Accessed 20/04/2011 2011

ANP (2010b) Produção de biodiesel - B100 por produtor - 2005-2010 (m³). **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. <http://www.anp.gov.br/SITE/acao/download/?id=8740&cachebust=1290686590289>. Accessed 20/10/2010 2010

BACHLER C, SCHNEIDER P, BAHLER P, LUSTIG A, ERNI B (2005) *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. **EMBO J** 24 (2):283-293.

BALAT M, BALAT H (2008) A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. **Energ Convers Manage** 49 (10):2727-2741.

BARBIRATO F, CAMARASA-CLARET C, GRIVET J, BORIES A (1995) Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. **Appl Microbiol Biotechnol** 43 (5):786-793.

BARBIRATO F, CHEDAILE D, BORIES A (1997) Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates **Appl Microbiol Biotechnol** 47 (4):441-446.

BEAUPREZ J (2010) **Metabolic engineering and modelling of *Escherichia coli* for the production of succinate**. Dissertation, Ghent University, Ghent

- BIEBL H (2001) Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*-batch and continuous culture studies. **J Ind Microbiol Biotechnol** 27 (1):18-26.
- BIEBL H, MARTEN S, HIPPE H, DECKWER W-D (1992) Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. **Appl Microbiol Biotechnol** 36 (5):592-597.
- BIEBL H, MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. **Appl Microbiol Biotechnol** 52 (3):289-297.
- BIEBL H, SPROER C (2002) Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. **Syst Appl Microbiol** 25 (4):491-497.
- BONNARDEAUX J (2006) **Glycerin Overview**. Department of Agriculture and Food/Western Australia.
- BRASIL (2004) Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. <http://www.biodiesel.gov.br/programa.html>. Accessed 20/10/2010 2010
- BRASIL (2005) **Lei N° 11.097**. Diário Oficial da União, Brasília.
- BROWN LE (2009) Plan B 4.0: Mobilizing to save civilization. **W.W. Noton & Company**. http://www.earth-policy.org/datacenter/xls/book_pb4_ch4-5_34.xls. Accessed 20/10/2010 2010
- CALLAM CS, SINGER SJ, LOWARY TL, HADAD CM (2001) Computational analysis of the potential energy surfaces of glycerol in the gas and aqueous phases: effects of level of theory, basis set, and solvation on strongly intramolecularly hydrogen-bonded systems. **J Am Chem Soc** 123 (47):11743-11754.
- CAMERON DC, ALTARAS NE, HOFFMAN ML, SHAW AJ (1998) Metabolic engineering of propanediol pathways. **Biotechnol Prog** 14 (1):116-125.
- CELIK E, OZBAY N, OKTAR N, CALIK P (2008) Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Ind Eng Chem Res** 47 (9):2985-2990.
- CELINSKA E (2010) Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. **Biotechnol Adv** 28 (4):519-530.
- CERÓN GARCÍ MC, FERNÁNDEZ SEVILLA JM, ACIÉN FERNÁNDEZ FG, MOLINA GRIMA E, GARCÍA CAMACHO F (2000) Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **J Appl Phycol** 12 (3):239-248.
- CERVIN MA, SOUCAILLE P, VALLE F (2004) **Process for the biological production of 1,3-propanediol with high yield**. USA Patent, Aug 5, 2004
- CHAVANNE CG (1937) **Procédé de transformation d'huiles végétales en vue de leur utilisation comme carburants**. Belgium Patent 422,887, 25/07/1937

CHEN X, XIU Z, WANG J, ZHANG D, XU P (2003) Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. **Enzyme Microb Technol** 33 (4):386-394.

CHENG KK, ZHANG JA, LIU DH, SUN Y, LIU HJ, YANG MD, XU JM (2007) Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochem** 42 (4):740-744.

CHENG KK, ZHANG JA, LIU DH, SUN Y, YANG MD, XU JM (2006) Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* from glycerol broth. **Biotechnol Lett** 28 (22):1817-1821.

CHI Z, PYLE D, WEN Z, FREAR C, CHEN S (2007) A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochem** 42 (11):1537-1545.

CHOI WJ (2008) Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals. **Recent Pat Biotechnol** 2 (3):173-180.

CHUAH HH, BROWN HS, DALTON PA (1999) CORTERRA Poly(Trimethylene Terephthalate) - A New Performance Carpet Fiber. **Shell Chemical Company**. http://www.shellchemicals.com/chemicals/pdf/corterra/NewPerformanceCarpets.pdf?section=our_products.

CLAISSE O, LONVAUD-FUNEL A (2000) Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. **Food Microbiol** 17 (5):513-519.

CLAUDE S (1999) Research of new outlets for glycerol : recent developments in France. **Lipid** 101 (3):101-104.

DA SILVA GP, MACK M, CONTIERO J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnol Adv** 27 (1):30-39.

DANIEL R, BOENIGK R, GOTTSCHALK G (1995a) Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 177 (8):2151-2156.

DANIEL R, GOTTSCHALK G (1992) Growth temperature-dependent activity of glycerol dehydratase in *Escherichia coli* expressing the *Citrobacter freundii* *dha* regulon. **FEMS Microbiol Lett** 100 (1-3):281-285.

DANIEL R, STUERTZ K, GOTTSCHALK G (1995b) Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. **J Bacteriol** 177 (15):4392-4401.

DAVID MA, HENRY-ACADEMY GS (1996) Glycerol: A Jack Of All Trades. http://www.chem.yorku.ca/hall_of_fame/essays96/glycerol.htm.

DECKWER W-D (1995) Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. **FEMS Microbiol Rev** 16 (2-3):143-149.

DHARMADI Y, MURARKA A, GONZALEZ R (2006) Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnol Bioeng** 94 (5):821-929.

DOLEYRES Y, BECK P, VOLLENWEIDER S, LACROIX C (2005) Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. **Appl Microbiol Biotechnol** 68 (4):467-474.

DÜRRE P (2007) Biobutanol: An attractive biofuel. **Biotechnol J** 2 (12):1525-1534.

DUFEY A (2006) **Biofuels production, trade and sustainable development: emerging issues**. International Institute for Environment and Development (IIED), London.

FAIRBANKS M (2009) **Crescimento do biodiesel provoca inundação no mercado de glicerina, incentivando a descobrir novas aplicações**. Revista Química e Derivados, 487 edn. Editora QD Ltda., São Paulo.

FAPRI (2010) **U.S. and World Agricultural Outlook**. Food and Agricultural Policy Research Institute, Iowa State University and the University of Missouri-Columbia, Ames.

FORAGE RG, FOSTER MA (1982) Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases. **J Bacteriol** 149 (2):413-419.

FORAGE RG, LIN EC (1982) DHA system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. **J Bacteriol** 151 (2):591-599.

FORSBERG CW (1987) Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. **Appl Environ Microbiol** 53 (4):639-643.

FRAZZETTO G (2003) White biotechnology **EMBO Reports** 4 (9):835-837.

FREUND A (1881) Über die Bildung und Darstellung von Trimethylenalkohol aus Glycerin. **Monatsh Chem** 2 (1):636-641.

FU D, LIBSON A, MIERCKE LJW, WEITZMAN C, NOLLERT P, KRUCINSKI J, STROUD RM (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. **Science** 290 (5491):481-486.

GÄTGENS C, DEGNER U, BRINGER-MEYER S, HERRMANN U (2007) Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. **Appl Microbiol Biotechnol** 76 (3):553-559.

Genencor International and DuPont expand R&D collaboration to make key biobased polymer. (2001). http://www.genencor.com/wps/wcm/connect/genencor/genencor/media_relations/news/archive/2001/gen_120301_en.htm. Accessed 20/10/2010 2010

GONZALEZ-PAJUELO M, ANDRADE JC, VASCONCELOS I (2005a) Production of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. **J Ind Microbiol Biotechnol** 32 (9):391-396.

GONZALEZ-PAJUELO M, MEYNIAL-SALLES I, MENDES F, ANDRADE JC, VASCONCELOS I, SOUCAILLE P (2005b) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Metab Eng** 7 (5-6):329-336.

GÜNZEL B, YONSEL S, DECKWER W-D (1991) Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m³. **Appl Microbiol Biotechnol** 36 (3):289-294.

HAO J, WANG W, TIAN J, LI J, LIU D (2008) Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing *dhaT* gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. **J Ind Microbiol Biotechnol** 35 (7):735-741.

HERMANN BG, BLOK K, PATEL MK (2007) Producing bio-based bulk chemicals using industrial biotechnology saves energy and combats climate change. **Environ Sci Technol** 41 (22):7915-7921.

HIMMI EH, BORIES A, BOUSSAID A, HASSANI L (2000) Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. **Appl Microbiol Biotechnol** 53 (4):435-440.

HIMMI HE, BORIES A, BARBIRATO F (1999) Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* **Bioresour Technol** 67 (2):123-128.

HOMANN T, TAG C, BIEBL H, DECKWER W-D, SCHINK B (1990) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Appl Microbiol Biotechnol** 33 (2):121-126.

HONDA S, TORAYA T, FUKUI S (1980) In situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B12-dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase. **J Bacteriol** 143 (3):1458-1465.

HUNT JA (1999) A short history of soap. **Pharm J** 263 (7076):985-989.

IBRAHIM MHA, STEINBÜCHEL A (2010) *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. **J Appl Microbiol** 108 (1):214-225.

ITO T, NAKASHIMADA Y, SENBA K, MATSUI T, NISHIO N (2005) Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **J Biosci Bioeng** 100 (3):260-265.

JARVIS GN, MOORE ER, THIELE JH (1997) Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. **J Appl Microbiol** 83 (2):166-174.

JOHNSON DT, TACONI KA (2007) The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production **Environ Prog** 26 (4):338-348.

JOHNSTON M, HOLLOWAY T (2007) A global comparison of national biodiesel production potentials. **Environ Sci Technol** 41 (23):7967-7973.

KNOTHE G (2001) Historical perspectives on vegetable oil-based fuels. **INFORM - International News on Fats, Oils and Related Materials** 12 (11):1103-1107.

KOUTINAS AA, WANG RH, WEBB C (2007) The biochemurgist -Bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. **Biofuels Bioprod Bioref** 1 (1):24-38.

KRAUS GA (2008) Synthetic methods for the preparation of 1,3-propanediol. **CLEAN – Soil, Air, Water** 36 (8):648-651.

LAWRENCE FR, SULLIVAN RH (1972) **Process for making a dioxane**. United States of America Patent 3687981, 08/29/1972

LEE PC, LEE WG, LEE SY, CHANG HN (2001) Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. **Biotechnol Bioeng** 72 (1):41-48.

LIN ECC (1976) Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. **Annu Rev Microbiol** 30 (1):535-578.

LIU HJ, ZHANG DJ, XU YH, MU Y, SUN YQ, XIU ZL (2007) Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. **Biotechnol Lett** 29 (8):1281-1285.

LIU W, MOHANTY AK, DRZAL LT, MISRA M, KURIAN JV, MILLER RW, STRICKLAND N (2005) Injection molded glass fiber reinforced poly(trimethylene terephthalate) composites: fabrication and properties evaluation. **Ind Eng Chem Res** 44 (4):857-862.

LOPES DRG, MELO MR, MANTOVANI HC (2008) Produção de ácido propiônico em glicerina de biodiesel por *Selenomonas ruminantium* 22A. In: **XVIII Simpósio de Iniciação Científica, VIII Simpós - Mostra Científica da Pós-Graduação, VI Simpósio de Extensão Universitária e II Sen – Simpósio de Ensino**, Viçosa-MG, Brasil, 2008. UFV, Viçosa-MG, Brasil.

MA BB, XU XL, ZHANG GL, WANG LW, WU M, LI C (2009) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li under different aeration strategies. **Appl Biochem Biotechnol** 152 (1):127-134.

MAERVOET VET, DE MEY M, BEAUPREZ J, DE MAESENEIRE S, SOETAERT WK (2011) Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. **Org Process Res Dev** 15 (1):189-202.

MCCOY M (2006) Glycerin surplus. **Chem Eng News** 84 (6):7.

MENZEL K, AHRENS K, ZENG AP, DECKWER WD (1998) Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: IV. Enzymes and fluxes of pyruvate metabolism. **Biotechnol Bioeng** 60 (5):617-626.

MENZEL K, ZENG A-P, BIEBL H, DECKWER W-D (1996) Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: I. The phenomena and characterization of oscillation and hysteresis. **Biotechnol Bioeng** 52 (5):549-560.

MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD (1997a) Enzymatic evidence for an involvement of pyruvate dehydrogenase in the anaerobic glycerol metabolism of *Klebsiella pneumoniae*. **J Biotechnol** 56 (2):135-142.

MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD (1997b) High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae* **Enzyme Microb Technol** 20 (2):82-86.

The Merck Index (2006). 14 edn. John Wiley & Sons.

MICKELSON MN, WERKMAN CH (1940) The dissimilation of glycerol by coli-aerogenes intermediates. **J Bacteriol** 39 (6):709-715.

MOTA CJA, SILVA CXAD, GONÇALVES VLC (2009) Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Quim Nova** 32:639-648.

MU Y, TENG H, ZHANG DJ, WANG W, XIU ZL (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnol Lett** 28 (21):1755-1759.

MU Y, XIU ZL, ZHANG DJ (2008) A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem Eng J** 40 (3):537-541.

NAKAS JP, SCHAEDEL M, PARKINSON CM, COONLEY CE, TANENBAUM SW (1983) System development for linked-fermentation production of solvents from algal biomass. **Appl Environ Microbiol** 46 (5):1017-1023.

OUATTARA AS, TRAORE AS, GARCIA J-L (1992) Characterization of *Anaerovibrio burkinabensis* sp. nov., a lactate fermenting bacterium isolated from rice field soils. **Int J Syst Bacteriol** 42 (3):390-397.

PAGLIARO M, CIRIMINNA R, KIMURA H, ROSSI M, DELLA PINA C (2007) From glycerol to value-added products. **Angew Chem Int Ed Engl** 46 (24):4434-4440.

PAGLIARO M, ROSSI M (2008) **The Future of Glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

PAPANIKOLAOU S, FAKAS S, FICK M, CHEVALOT I, GALIOTOU-PANAYOTOU M, KOMAITIS M, MARC I, AGGELIS G (2008) Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass Bioenergy** 32 (1):60-71.

PAPANIKOLAOU S, RUIZ-SANCHEZ P, PARISET B, BLANCHARD F, FICK M (2000) High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. **J Biotechnol** 77 (2-3):191-208.

PETITDEMANGE E, DÜRR C, ABBAD-ANDALOUSSI S, RAVAL G (1995) Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 15 (6):498-502.

PFLUGMACHER U, GOTTSCHALK G (1994) Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*. **Appl Microbiol Biotechnol** 41 (3):313-316.

POUSA GPAG, SANTOSA ALF, SUAREZ AZ (2007) History and policy of biodiesel in Brazil. **Energ Policy** 35 (11):5393-5398.

RAJ AE, KUMAR HSS, KUMAR SU, MISRA MC, GHILDYAL NP, KARANTH NG (2002) High-cell-density fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol. **Biotechnol Prog** 18 (5):1130-1132.

RAJ SM, RATHNASINGH C, JO J-E, PARK S (2008) Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. **Process Biochem** 43 (12):1440-1446.

RAYNAUD C, SARCABAL P, MEYNIAL-SALLES I, CROUX C, SOUCAILLE P (2003) Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100 (9):5010-5015.

REIMANN A, BIEBL H (1996) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and product tolerant mutants in fedbatch culture: feeding strategy for glycerol and ammonium. **Biotechnol Lett** 18 (7):827-832.

RICHEY DP, LIN ECC (1972) Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 112 (2):784-790.

RIVALDI JD, SARROUB BF, FIORILO R, SILVA SS (2007) Glicerol de Biodiesel. **Biotechnologia Cienc Desenvolv X** (37):44-51.

ROES AL, PATEL MK (2007) Life cycle risks for human health: a comparison of petroleum versus bio-based production of five bulk organic chemicals. **Risk Anal** 27 (5):1311-1321.

RYWINSKA A, RYMOWICZ W, MARCINKIEWICZ M (2010) Valorization of raw glycerol for citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast. **Electron J Biotechnol** 13:9-10.

SAINT-AMANS S, PERLOT P, GOMA G, SOUCAILLE P (1994) High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. **Biotechnol Lett** 16 (8):831-836.

SANCHEZ DLR (2009) **Butanol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum* in dedined culture medium - a phenotipic approach.** Thesis, University of Maryland, College Park

SÂNZIO R (2008) **O que fazer com a glicerina excedente?** CNT Transporte Atual. SEST/SENAT, Belo Horizonte.

SAUER M, MARX H, MATTANOVICH D (2008) Microbial production of 1,3-propanediol. **Recent Pat Biotechnol** 2 (3):191-197.

SAXENA RK, ANAND P, SARAN S, ISAR J (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. **Biotech Adv** 27 (6):895-913.

SCHINK B, STIEB M (1983) Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. **Appl Environ Microbiol** 45 (6):1905-1913.

SCHÜTZ H, RADLER F (1984) Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. **Syst Appl Microbiol** 5:283-287.

SEGALL SD, ARTZ WE (2007) The Brazilian experience with biofuels. **Eur J Lipid Sci Technol** 19 (1):12-15.

SEYFRIED M, LYON D, RAINEY FA, WIEGEL J (2002) *Caloramator viterbensis* sp. nov., a novel thermophilic, glycerol-fermenting bacterium isolated from a hot spring in Italy. **Int J Syst Evol Microbiol** 52 (4):1177-1184.

SHRIVASTAV A, MISHRA SK, SHETHIA B, PANCHA I, JAIN D, MISHRA S (2010) Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. **Int J Biol Macromol** 47 (2):283-287.

SOCCOL CR, VANDENBERGHE LPS, RODRIGUES C, PANDEY A (2006) New perspectives for citric acid production and application. **Food Technol Biotech** 44 (2):141-149.

STEVENS JF, MAIER CS (2008) Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. **Mol Nutr Food Res** 52 (1):7-25.

STIEB M, SCHINK B (1984) A new 3-hydroxybutyrate fermenting anaerobe, *Ilyobacter polytropus*, gen. nov. sp. nov., possessing various fermentation pathways. **Arch Microbiol** 140 (2):139-146.

SUN J, VAN DEN HEUVEL J, SOUCAILLE P, QU Y, ZENG AP (2003) Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. **Biotechnol Prog** 19 (2):263-272.

SUTHERS PF, CAMERON DC (2005) **Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms**. United States of America Patent, Feb 8, 2005

SUWANNAKHAM S (2005) **Metabolic engineering for enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici***. Thesis, Ohio State University, Columbus

TALARICO TL, AXELSSON LT, NOVOTNY J, FIUZAT M, DOBROGOSZ WJ (1990) Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:NAD⁺ oxidoreductase. **Appl Environ Microbiol** 56 (4):943-948.

TONG IT, LIAO HH, CAMERON DC (1991) 1,3-propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae dha* regulon. **Appl Environ Microbiol** 57 (12):3541-3546.

TORAYA T (2000) Radical catalysis of B12 enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. **Cell Mol Life Sci** 57 (1):106-127.

VEIGA DA CUNHA M, FOSTER MA (1992) Sugar-glycerol cofermentations in Lactobacilli: the fate of lactate. **J Bacteriol** 174 (3):1013-1019.

VERTES AA, INUI M, YUKAWA H (2006) Implementing biofuels on a global scale. **Nat Biotechnol** 24 (7):761-764.

VIZOSO PINTO MG, PASTERIS SE, STRASSER DE SAAD AM (2004) Glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from beer. **Food Microbiol** 21 (1):111-118.

WERPY T, PETERSEN G (2004) **Top Value Added Chemicals from Biomass – Results of screening for potential candidates from sugars synthesis gas.**, vol I. U. S. Department of Energy, Oak Ridge.

WILLKE T, VORLOP K (2008) Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. **Eur J Lipid Sci Technol** 110 (9):831-840.

WILLKE T, VORLOP KD (2004) Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. **Appl Microbiol Biotechnol** 66 (2):131-142.

XU YZ, GUO NN, ZHENG ZM, OU XJ, LIU HJ, LIU DH (2009) Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnol Bioeng**.

YANG G, TIAN J, LI J (2007) Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. **Appl Microbiol Biotechnol** 73 (5):1017-1024.

YAZDANI SS, GONZALEZ R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Curr Opin Biotechnol** 18 (3):213-219.

YU KO, KIM SW, HAN SO (2010) Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresour Technol** 101 (11):4157-4161.

ZENG AP (1996) Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Bioproc Biosystems Eng** 14 (4):169-175.

ZENG AP, BIEBL H (2002) Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. **Adv Biochem Eng Biotechnol** 74:239-259.

ZENG AP, BIEBL H, SCHLIEKER H, DECKWER WD (1993) Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: regulation of reducing equivalent balance and product formation. **Enzyme Microb Technol** 15 (9):770-779.

ZHANG Q, TENG H, SUN Y, XIU Z, ZENG A (2008) Metabolic flux and robustness analysis of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. **Bioprocess Biosyst Eng** 31 (2):127-135.

ZHAO YN, CHEN G, YAO SJ (2006) Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem Eng J** 32 (2):93-99.

ZHENG P, WEREATH K, SUN J, HEUVEL J, ZENG AP (2006) 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 Biochem** 41 (10):2160-2169.

ZHENG Z, CHENG KK, HU QL, LIU HJ, GUO NN, LIU DH (2008) Effect of culture conditions on 3-hydroxypropionaldehyde detoxification in 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem Eng J** 39 (2):305-310.

ZHOU C-H, BELTRAMINI JN, FAN Y-X, LU GQ (2008) Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chem Soc Rev** 37 (3):527-549.

CAPÍTULO II

Isolamento de Bactérias Bioconversoras de Glicerina Bruta em 1,3-Propanodiol

RESUMO

Amostras de líquido de rúmen, solo, esgoto e dejetos suínos foram enriquecidas em meio de cultivo contendo glicerina bruta, por meio de cultivos sucessivos em batelada ou cultura contínua, para o isolamento de microrganismos produtores de 1,3-propanodiol tolerantes a este co-produto da indústria do biodiesel. 48 culturas produtoras de 1,3-propanodiol foram obtidas a partir do enriquecimento das amostras de solo (31), esgoto (12) e dejetos suínos (5), sendo 45 culturas gram-negativas e três culturas gram-positivas. A produção de 1,3-propanodiol pelas culturas isoladas variou de 0,15 a 10,34 g/L, enquanto o rendimento de 1,3-propanodiol ficou entre 0,01 e 0,63 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicérol}. Para seleção das culturas com maior potencial de produção de 1,3-propanodiol foram estabelecidas como valores mínimos de produção e rendimento de 1,3-propanodiol 8,37 g/L e 0,56 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicérol}, respectivamente. Quatro culturas superaram os valores mínimos de referência, Sb06, Sb10, Ec18 e Ec19, sendo as duas primeiras isoladas a partir do enriquecimento da amostra de solo por cultivos sucessivos em batelada, e as duas últimas a partir do enriquecimento da amostra de esgoto em cultura contínua, na taxa de diluição de 0,2 h⁻¹. Destas, as culturas Sb06 e Ec18 foram selecionadas e caracterizadas por meio de testes bioquímicos e sequenciamento parcial do gene do rRNA 16S como *Clostridium butyricum* e *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

A glicerina bruta é o principal co-produto da transesterificação de triglicerídeos para produção de biodiesel. Produzido na proporção de 1 Kg para cada 10 Kg de biodiesel, este co-produto da indústria do biodiesel é composto principalmente de glicerol, 30 a 85 % (m/m) dependendo do processo de produção (MU *et al.*, 2006; KOUTINAS *et al.*, 2007; YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Variadas proporções de álcoois, água, sais inorgânicos oriundos dos catalisadores, ácidos graxos livres, mono, di ou triglicerídeos que não reagiram, metil ou etil ésteres e outras matérias orgânicas compõem o restante de sua massa (THOMPSON e HE, 2006; PAGLIARO e ROSSI, 2008). Além disso, minerais como Ca (10 a 20 ppm), Mg (3 a 7 ppm), P (10 a 60 ppm) e S (14 a 21 ppm), K (2,20 %) e Na (2,33 %) também podem ser encontrados na glicerina bruta (SCHRÖDER e SÜDEKUM, 1999; THOMPSON e HE, 2006).

Acompanhando o crescimento da indústria do biodiesel, foram produzidas no Brasil, no ano de 2010, aproximadamente 205 mil toneladas (t) de glicerina bruta, a qual não encontra aplicação direta na indústria em função da presença considerável de sais, óleos e metanol em sua composição (PAGLIARO e ROSSI, 2008; ANP, 2010). Como resultado, este co-produto da indústria do biodiesel tem sido pouco valorizado no mercado, estimulando estudos para sua utilização como substrato em fermentações microbianas (JOHNSON e TACONI, 2007). Esses estudos visam desenvolver a produção de compostos de maior valor agregado, e podem concomitantemente estimular a produção de biodiesel pelo aumento da rentabilidade da cadeia produtiva desse biocombustível (YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

Apesar do estímulo gerado pelos baixos preços, a utilização de glicerina bruta sem prévio tratamento como substrato em fermentações microbianas têm apresentado efeitos adversos. Athalye e colaboradores (2009) observaram inibição no crescimento do fungo *Pythium irregulare* por glicerina bruta durante a fermentação para produção de ácido eicosapentaenóico. Para a alga *Schizochytrium limacinum*, tanto o crescimento quanto a produção do ácido docosa-hexanóico foram negativamente afetadas pela utilização de glicerina bruta como substrato (PYLE *et al.*, 2008). Dentre os microrganismos produtores de 1,3-propanodiol, foco de vários estudos nos últimos anos, várias linhagens de *Clostridium butyricum* apresentaram sensibilidade à glicerina bruta, sendo todas as linhagens obtidas de coleções de

culturas avaliadas por Petitdemange e colaboradores (1995) incapazes de crescer nesse co-produto.

O 1,3-propanodiol pode ser utilizado para produção de poliésteres, poliéteres, poliuretanos, solventes, adesivos, resinas, detergentes, anticongelantes e cosméticos, e tem sido produzido em quantidades superiores a 80 mil t/ano, principalmente por vias petroquímicas (ZENG e BIEBL, 2002; KRAUS, 2008). Apesar de representar uma alternativa sustentável e ambientalmente limpa, a bioconversão de glicerol em 1,3-propanodiol é dependente do preço do substrato, o qual pode representar mais de 50 % dos custos de produção (BIEBL *et al.*, 1999). Neste contexto, a utilização da glicerina bruta, co-produto da produção de biodiesel, como substrato para essa bioconversão representa uma boa alternativa, uma vez que seu preço é até 10 vezes inferior ao preço do glicerol puro (HIREMATH *et al.*, 2011).

Neste trabalho, amostras de líquido de rúmen, solo, esgoto e dejetos suínos foram enriquecidas em meio contendo glicerina bruta da indústria do biodiesel para a seleção microrganismos tolerantes e capazes de utilizar eficientemente este co-produto para a produção de 1,3-propanodiol.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Meio de Cultivo e Estocagem das Culturas

O enriquecimento, isolamento e cultivo dos microrganismos isolados foram realizados em meio basal contendo (por litro): 292 mg de K_2HPO_4 , 240 mg de KH_2PO_4 , 480 mg de $(NH_4)_2SO_4$, 480 mg de NaCl, 100 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 64 mg de $CaCl_2$, 600 mg de hidrocloreto de cisteína, 500 mg de extrato de levedura, 1 g de Trypticase e 4 g de Na_2CO_3 . Ágar (1,5 %, m/v) foi adicionado ao meio basal para os procedimentos em placas de Petri. Soluções anaeróbias de glicerol (16 %, v/v) e glicerina bruta (50 %, v/v) foram preparadas a partir de glicerol puro (Amresco) e glicerina bruta (60 %, m/m de glicerol, 1,25 %, m/m de etanol, pH 10), e adicionadas ao meio basal para a concentração final de 1,6 % (v/v) ou 5 % (v/v), respectivamente.

Alíquotas (4 mL) do cultivo de bactérias isoladas foram adicionadas à meio de estocagem (3 mL) contendo (por litro): 292 mg de K_2HPO_4 , 240 mg de KH_2PO_4 , 480 mg de $(NH_4)_2SO_4$, 480 mg de NaCl, 100 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 64 mg de $CaCl_2$, 800 mg de hidrocloreto de cisteína, 460 mL de glicerol e armazenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (TEATHER, 1982). Os meios de cultivo e soluções de glicerol ou glicerina bruta, com pH ajustado em 6,5 pela adição de NaOH 4 M ou HCl 2 M, foram aquecidos à temperatura de ebulição para remoção do O_2 dissolvido. Após o aquecimento os meios de cultivo e soluções foram mantidos sob fluxo de CO_2 até o momento de sua transferência para frascos previamente purgados com CO_2 . Os frascos contendo meios de cultivo e soluções livres de O_2 foram vedados com rolhas de borracha, lacrados com lacres de alumínio e esterilizados em autoclave ($121\text{ }^\circ\text{C}$, 15 min). Os meios de cultivo e soluções anaeróbias estéreis foram manipulados com auxílio de seringas e agulhas estéreis.

2.2 Enriquecimento de Microrganismos em Meio Contendo Glicerina Bruta

Amostras de líquido ruminal, solo, esgoto e dejetos suínos foram coletadas em diferentes locais da Universidade Federal de Viçosa e utilizadas para o enriquecimento de microrganismos em meio basal contendo 5 % (v/v) de glicerina bruta. As amostras coletadas foram mantidas em frascos hermeticamente fechados

durante o período entre sua coleta e seu processamento no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa. Uma vez processadas, alíquotas de 10 % (v/v) foram utilizadas como inóculo para o enriquecimento dos microrganismos em batelada e cultura contínua.

O líquido ruminal foi obtido a partir da digesta ruminal de um animal macho, da raça mestiça, alimentado a pasto no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. O líquido ruminal filtrado através de quatro camadas de gaze foi mantido em repouso (30 min, 39 °C) para separação de fases, sendo a fase intermediária utilizada como inóculo para os experimentos. A amostra de solo foi coletada das margens do lago próximo ao Recanto das Cigarras (Campus UFV) e continha também água do lago e material orgânico como folhas e raízes. Os torrões de solo presentes na amostra foram homogeneizados na água presente na amostra sob fluxo de CO₂, e o material orgânico removido por meio da filtração através de quatro camadas de gaze. A amostra de esgoto foi coletada na Estação de Tratamento de Água (ETA) enquanto a amostra de dejetos suínos foi obtida do tanque anaeróbio do projeto Sistema Ecológico Integrado para Tratamento de Água Residuária de Suinocultura da Zona da Mata Mineira, do Departamento de Engenharia Agrícola, da Universidade Federal de Viçosa. Os dejetos suínos que abastecem esta planta de tratamento são provenientes do Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia e compostos de fezes, urina e água de limpeza das baias.

Em batelada, o enriquecimento foi realizado por meio de cinco cultivos (72 h cada, 39 °C para o líquido de rúmen e 35 °C para as amostras de solo, esgoto e dejetos suínos) consecutivos. Frascos (90 mL) contendo 50 mL de meio basal adicionado de glicerina bruta foram inoculados com as amostras (líquido ruminal, solo, esgoto ou dejetos suínos), sendo os cultivos subsequentes inoculados com alíquotas (10 %, v/v) do cultivo anterior (72 h). Em cultura contínua, fermentadores (500 mL) contendo 300 mL de meio basal adicionado de glicerina bruta foram inoculados com as amostras (líquido ruminal, solo, esgoto ou dejetos suínos) e permaneceram em regime de batelada (pré-cultivo) durante 24 horas (39 °C para o líquido de rúmen e 35 °C para as amostras de solo, esgoto e dejetos suínos, 150 rpm). Após este período, o fluxo foi iniciado e a taxa de diluição (D) ajustada para 0,1, 0,2 e 0,4 h⁻¹. Incrementos entre as D (0,1 → 0,2 → 0,4 h⁻¹) foram realizados sempre que a cultura atingia o estado permanente, caracterizado por alterações menores que 5 %

na densidade óptica (DO_{600nm}) das alíquotas removidas periodicamente do fermentador. Para manutenção da anaerobiose, o meio de cultivo foi mantido durante todo o experimento sob fluxo de CO_2 .

2.3 Isolamento de Microrganismos Utilizadores de Glicerina Bruta

Alíquotas (10 mL) das culturas resultantes do último cultivo em batelada e do estado permanente nas diferentes taxas de diluição foram transferidas para câmara de anaerobiose (95 % CO_2 , 5 % H_2 , v/v) (COY Laboratory Products Inc., USA) e estriadas (10 μ L) em placas de Petri contendo meio basal sólido (20 mL) adicionado de glicerol. A formação de colônias, nas mesmas temperaturas utilizadas durante o enriquecimento, foi monitorada durante 48 horas após o plaqueamento. Após este período, colônias isoladas foram transferidas com auxílio de palitos estéreis para tubos contendo meio basal (5 mL) adicionado de glicerol. Alíquotas (4 mL) das culturas que apresentaram crescimento nos tubos após 72 horas foram transferidas para meio de estocagem e armazenadas ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) (TEATHER, 1982). O restante da cultura (1 mL) foi utilizado para análise dos produtos da fermentação e identificação dos isolados produtores de 1,3-propanodiol.

2.4 Seleção de Microrganismos Produtores de 1,3-propanodiol

As culturas armazenadas em meio de estocagem ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) foram levadas à câmara de anaerobiose (95 % CO_2 , 5 % H_2 , v/v) (COY Laboratory Products Inc., USA) e alíquotas (0,5 mL) foram transferidas para tubos contendo meio basal (5 mL). Após 48 horas, as culturas foram transferidas para meio basal (5 mL) contendo glicerina bruta e cultivadas por 72 horas. Como controle positivo para as condições de cultivo ($39\text{ }^\circ\text{C}$ para o líquido de rúmen e $35\text{ }^\circ\text{C}$ para as amostras de solo, esgoto e dejetos suínos) e produção de 1,3-propanodiol foi utilizada a bactéria *Klebsiella pneumoniae* U3 (KpU3), obtida da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

Amostras foram removidas dos tubos ao final do tempo de cultivo para determinação do crescimento microbiano (DO_{630nm}) e dos produtos da fermentação. Para seleção dos microrganismos com maior potencial de produção de 1,3-propanodiol foram utilizados como referência os valores de produção e rendimento

de 1,3-propanodiol de 8,37 g/L e rendimento de 0,56 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}, respectivamente. Estes valores foram obtidos pelo cultivo de *C. butyricum* VPI 3266 em batelada sem controle de pH e utilizando glicerina bruta como substrato (GONZALEZ-PAJUELO *et al.*, 2004), condições semelhantes às utilizadas neste trabalho. Ademais, *C. butyricum* VPI 3266 tem sido utilizado em vários estudos de produção fermentativa de 1,3-propanodiol, sendo considerado um microrganismo com alta produção de 1,3-propanodiol (SAINT-AMANS *et al.*, 1994; SAINT-AMANS *et al.*, 2001; GONZALEZ-PAJUELO *et al.*, 2004;2005; GONZALEZ-PAJUELO *et al.*, 2006).

2.5 Identificação dos Microrganismos Produtores de 1,3-propanodiol

Os microrganismos selecionados como os melhores produtores de 1,3-propanodiol em glicerina bruta foram identificados por meio de testes bioquímicos utilizando o Kit API 20A (bioMerieux, França) e caracterização genética por meio de sequenciamento de regiões do gene rRNA 16S. O DNA cromossômico foi extraído utilizando o Kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega, WI, USA) e o rDNA 16S amplificado utilizando os *primers* 16SF (5'-AGAGTTTGATCMTGG-3') e 16SR (5'-TACCTTGTTACTT-3') para Eubacteria (LANE, 1991). A mistura de reação (25 µL) consistiu de dNTP (0,2 mM, cada) (Sigma, MO, USA), *primers* (0,4 µM, cada), Taq DNA Polimerase (1 unidade) e tampão para Taq DNA Polimerase (Promega, WI, USA). A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial (94 °C, 2 min), 35 ciclos de amplificação (94 °C, 1 min; 54 °C, 45 seg; 72 °C, 1 min e 30 seg), extensão final (72 °C, 5 min).

O produto de cada amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % (m/v) e eluído utilizando o Kit Wizard[®] SV Gel e PCR Clean-Up System Purification (Promega, WI, USA). Os fragmentos de DNA (aproximadamente 1.500 pb) foram clonados no vetor pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, WI, USA) e o plasmídeo recombinante foi introduzido em *Escherichia coli* DH5α. Para o sequenciamento (Macrogen, Coréia do Sul), o plasmídeo recombinante foi extraído utilizando o Kit PureYield[™] Miniprep System (Promega, WI, USA). Todos os procedimentos foram realizados conforme as recomendações dos fabricantes.

2.6 Procedimentos Analíticos

O crescimento microbiano foi monitorado por meio da determinação da densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron, MA, USA) ou a 630 nm (DO_{630nm}) em leitora de placa de ELISA TP-Reader (ThermoPlate, China). Amostras (1 mL) das culturas em meio basal contendo glicerol (1,6 %, v/v) ou glicerina bruta (5 %, v/v) foram centrifugadas (8.000 g, 10 minutos) para obtenção do sobrenadante livre de células. Nas amostras em meio basal contendo glicerina bruta o sobrenadante livre de células foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poro de 0,45 μ m de diâmetro (Schleicher & Schuell, Alemanha) para remoção de impurezas. Os sobrenadantes livres de células ou filtrados livres de impurezas (20 μ L) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Hewlett-Pacckard série 1050 acoplado ao detector de índice de refração (IR) Hewlett-Pacckard 1047A (Hewlett-Pacckard Company, DE, USA) mantido a 45 °C, e coluna Bio-Rad HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) mantida a 60 °C. Como fase móvel foi utilizada solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5 mM com fluxo de 0,7 mL/min.

O rendimento de 1,3-propanodiol ($Y_{PD/Glicerol}$) foi calculado como $Y_{PD/Glicerol} = C_{PD}/(C_{Glicerol-i} - C_{Glicerol-f})$, onde, C_{PD} é a concentração de 1,3-propanodiol produzido (mol), $C_{Glicerol-i}$ é a concentração de glicerol (mol) no início do experimento e $C_{Glicerol-f}$ é a concentração de glicerol (mol) ao final do experimento. A porcentagem de carbono recuperado desconsiderando a produção de CO_2 e a biomassa (C_R) foi calculada como $C_R = \{[(C_{Succ.} * 4) + (C_{Lact.} * 3) + (C_{Glicerol-f} * 3) + (C_{Form.}) + (C_{Acet.} * 2) + (C_{Prop.} * 3) + (C_{PD} * 3) + (C_{BD} * 4) + (C_{EtOH.} * 2) + (C_{But.} * 4)] / (C_{Glicerol-i} * 3)\} * 100$, onde, * indicam sinais de multiplicação, $C_{Succ.}$, $C_{Lact.}$, $C_{Form.}$, $C_{Acet.}$, $C_{Prop.}$, C_{PD} , C_{BD} , $C_{EtOH.}$, $C_{But.}$ indicam as concentrações (mol) de succinato, lactato, formato, acetato, propionato, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, etanol e butirato, respectivamente. $C_{Glicerol-i}$ e $C_{Glicerol-f}$ indicam as concentrações (mol) inicial e final de glicerol.

3. RESULTADOS

3.1 Enriquecimento de Microrganismos em Meio Contendo Glicerina Bruta

3.1.1 Líquido de Rúmen

O enriquecimento da amostra de líquido de rúmen por meio de cultivos sucessivos em batelada, resultou em consumo de aproximadamente 50 % do glicerol inicial durante os cultivos, variando entre 15,49 e 13,77 g/L. O crescimento microbiano, por outro lado, foi reduzido em 57 % entre o primeiro e o quinto cultivo. Além disso, o aumento do número de cultivos resultou em alteração no perfil de produtos da fermentação da glicerina bruta, com redução nas concentrações de propionato (79 %) e acetato (49 %) e aumento de aproximadamente 10 vezes na concentração de succinato. O 1,3-propanodiol foi detectado apenas no segundo cultivo, porém, em concentração reduzida, 0,05 g/L (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Enriquecimento de líquido de rúmen em meio basal contendo glicerina bruta (5 %, v/v) por cultivos (72 h, 39 °C) sucessivos em batelada. Os resultados representam os valores absolutos de cada cultivo.

Parâmetros	Cultivo				
	1	2	3	4	5
Glicerol _i	24,67	26,57	27,08	28,80	30,50
Glicerol _f	9,60	12,38	13,31	14,01	15,01
Succinato	1,01	2,59	6,96	8,37	10,31
Lactato	0,20	0,08	n.d.	n.d.	0,15
Formato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetato	2,05	1,55	0,98	0,98	1,05
1,3-Propanodiol	n.d.	0,05	n.d.	n.d.	n.d.
Propionato	7,13	6,49	1,98	1,78	1,49
2,3-Butanodiol	0,46	0,16	n.d.	n.d.	n.d.
Etanol	0,46	0,17	0,29	0,35	0,40
Butirato	0,33	0,49	0,82	1,03	0,43
DO _{600nm}	0,874	0,713	0,404	0,438	0,376
<i>Y</i> _{PD/Glicerol} (mol/mol)	n.d.	0,00	n.d.	n.d.	n.d.
C _R (%)	95,34	97,88	94,37	96,69	98,13

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados ou valores não determinados. *Y*_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido. C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

Em cultura contínua, o aumento de taxa de diluição resultou em redução de 61 % na DO_{600nm} e queda do consumo de glicerol de 14,54 para 8,19 g/L (61 % para 33 % do glicerol inicial). O principal produto da fermentação da glicerina bruta,

nesse cultivo, foi o succinato que, juntamente com o propionato e acetato apresentaram redução das concentrações em 71, 81 e 60 %, respectivamente, com o aumento da taxa de diluição. Por outro lado, a concentração de etanol aumentou 75 % entre $D = 0,1$ e $0,4 \text{ h}^{-1}$. Produtos da fermentação como 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol não foram detectados durante o enriquecimento da amostra de líquido de rúmen em cultura contínua (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 Enriquecimento de líquido de rúmen em cultura contínua ($39 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm) contendo meio basal com glicerina bruta (5 %, v/v). Os resultados representam os valores absolutos de cada cultivo.

Parâmetros	D (h^{-1})			
	Pré-cultivo	0,1	0,2	0,4
Glicero l_i	23,57	24,26	23,83	24,53
Glicero l_f	11,55	9,52	13,09	16,34
Succinato	1,06	5,60	3,44	1,64
Lactato	0,20	n.d.	n.d.	n.d.
Formato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetato	1,93	1,10	0,85	0,44
1,3-Propanodiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Propionato	3,89	3,11	1,14	0,59
2,3-Butanodiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Etanol	0,76	0,91	1,39	1,59
Butirato	0,57	0,69	1,09	0,56
DO $_{600\text{nm}}$	2,75	3,19	2,15	1,25
$Y_{PD/Glicerol}$ (mol/mol)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C_R (%)	91,15	92,83	93,73	90,20

As concentrações de glicero l_i (Glicero l_i), glicero l_f (Glicero l_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados ou valores não determinados. $Y_{PD/Glicerol}$: rendimento de 1,3-propanodiol por glicero l_f consumido. C_R : porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO_2 e biomassa.

3.1.2 Solo

O consumo do glicero l_f durante o enriquecimento da amostra de solo em meio contendo glicerina bruta, por cultivos sucessivos em batelada, variou entre 99 (23,73 g/L) e 67 % (17,35 g/L). Em relação ao crescimento microbiano, a variação entre as DO $_{600\text{nm}}$ máxima e mínima foi inferior a 10 %. O 1,3-propanodiol foi o principal produto da fermentação da glicerina bruta, porém, o aumento no número de cultivos reduziu a concentração desse produto em 34 % e seu rendimento em 25 %. Produtos como propionato e butirato também apresentaram tendência de queda da produção com o aumento do número de cultivos, ao contrário do lactato, formato e etanol (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Enriquecimento de solo em meio basal contendo glicerina bruta (5 %, v/v) por cultivos (72 h, 35 °C) sucessivos em batelada. Os resultados representam os valores absolutos de cada cultivo.

Parâmetros	Cultivo				
	1	2	3	4	5
Glicerol _i	23,95	25,14	26,04	29,72	29,09
Glicerol _f	0,22	4,65	8,69	9,58	8,38
Succinato	n.d.	0,53	0,73	0,51	0,56
Lactato	n.d.	0,88	1,62	2,35	1,95
Formato	0,64	0,73	1,76	1,79	1,82
Acetato	1,48	0,59	0,41	1,19	0,66
1,3-Propanodiol	12,48	9,35	7,32	8,13	8,22
Propionato	1,26	0,35	n.d.	n.d.	n.d.
2,3-Butanodiol	n.d.	n.d.	n.d.	0,76	0,61
Etanol	n.d.	n.d.	0,98	0,92	1,22
Butirato	2,94	3,49	0,89	0,51	1,51
DO _{600nm}	0,731	0,693	0,677	0,662	0,697
$Y_{PD/Glicerol}$ (mol/mol)	0,64	0,55	0,51	0,49	0,48
C _R (%)	95,75	94,70	92,54	93,32	93,99

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. $Y_{PD/Glicerol}$: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido. C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

O glicerol consumido durante o enriquecimento da amostra de solo em cultura contínua variou entre 98 (26,24 g/L) e 36 % (9,59 g/L) do glicerol inicial, entre $D = 0,1$ e $0,4 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. O crescimento microbiano também foi reduzido, em 59 %, como o aumento da taxa de diluição. O 1,3-propanodiol foi novamente o principal produto da fermentação da glicerina bruta, com produção e rendimento máximos na $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ (14,34 g/L e 0,66 mol_{1,3propanodiol}/mol_{glicerol}), e redução de 82 e 50 % nos valores desses parâmetros, respectivamente, na $D = 0,4 \text{ h}^{-1}$. Diferentemente da produção de 1,3-propanodiol, a de lactato e formato aumentaram em aproximadamente três e duas vezes, respectivamente, entre as $D = 0,1$ e $0,4 \text{ h}^{-1}$, enquanto o propionato foi detectado apenas durante o pré-cultivo (Tabela 2.4).

3.1.3 Esgoto

Por meio do enriquecimento da amostra de esgoto por cultivos sucessivos em batelada foram consumidos até 88 % (21,23 g/L) do glicerol inicial, durante o segundo cultivo, o qual apresentou também o maior crescimento microbiano com $DO_{600nm} = 1,30$, valor 35 % superior ao crescimento microbiano observado no último cultivo. O 1,3-propanodiol foi o produto predominante entre o segundo e o quinto cultivos, com produção máxima de 5,82 g/L e variação de 71 e 70 % entre as maiores

e as menores concentrações e rendimentos, respectivamente. O succinato foi o principal produto da fermentação no primeiro cultivo, porém, em relação ao primeiro cultivo sua produção foi reduzida em 64 % no quinto cultivo (Tabela 2.5).

Tabela 2.4 Enriquecimento de solo em cultura contínua (35 °C, 150 rpm) contendo meio basal com glicerina bruta (5 %, v/v). Os resultados representam os valores absolutos de cada cultivo.

Parâmetros	D (h ⁻¹)			
	Pré-cultivo	0,1	0,2	0,4
Glicerol _i	27,17	26,77	27,73	26,90
Glicerol _f	11,60	0,53	12,58	17,31
Succinato	0,11	0,05	0,06	0,02
Lactato	2,14	0,35	2,44	1,04
Formato	1,70	0,53	1,00	1,04
Acetato	1,21	0,45	0,20	0,20
1,3-Propanodiol	4,84	14,34	5,92	2,58
Propionato	0,74	n.d.	n.d.	n.d.
2,3-Butanodiol	1,40	0,55	0,19	0,09
Etanol	0,71	n.d.	0,84	0,58
Butirato	n.d.	4,33	1,43	0,93
DO _{600nm}	2,63	2,78	1,48	1,15
<i>Y</i> _{PD/Glicerol} (mol/mol)	0,38	0,66	0,47	0,33
C _R (%)	95,30	96,68	95,72	91,44

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. *Y*_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido. C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

Tabela 2.5 Enriquecimento de esgoto em meio basal contendo glicerina bruta (5 %, v/v) por cultivos (72 h, 35 °C) sucessivos em batelada. Os resultados representam os valores absolutos de cada cultivo.

Parâmetros	Cultivo				
	1	2	3	4	5
Glicerol _i	23,70	24,03	24,59	25,08	27,69
Glicerol _f	5,44	2,80	5,12	6,21	8,97
Succinato	7,08	3,96	1,94	2,41	2,55
Lactato	1,70	1,72	1,42	1,63	1,89
Formato	0,98	0,76	0,66	0,49	0,53
Acetato	1,77	1,13	1,47	0,99	1,51
1,3-Propanodiol	1,70	4,67	5,82	5,20	4,69
Propionato	1,21	1,51	1,22	1,38	1,67
2,3-Butanodiol	n.d.	1,21	0,56	0,38	0,02
Etanol	0,99	0,78	0,57	0,43	0,42
Butirato	0,89	1,08	1,62	2,06	1,90
DO _{600nm}	1,20	1,30	0,973	0,884	0,839
<i>Y</i> _{PD/Glicerol} (mol/mol)	0,11	0,27	0,36	0,33	0,30
C _R (%)	97,61	91,84	93,02	94,44	95,44

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. *Y*_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido. C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

Em cultura contínua, o consumo do glicerol pela amostra de esgoto variou entre 52 (13,38 g/L) e 31 % (8,45 g/L), de forma inversa à taxa de diluição aplicada. Assim como o consumo de glicerol, o crescimento microbiano também foi reduzido, em 44 %, pelo aumento da taxa de diluição de 0,1 para 0,4 h⁻¹. Principal produto da fermentação da glicerina bruta, o 1,3-propanodiol atingiu a concentração máxima de 4,18 g/L na D = 0,1 h⁻¹, no entanto, o maior rendimento de 1,3-propanodiol, 0,48 mol_{1,3propanodiol}/mol_{glicerol}, foi determinado na D = 0,2 h⁻¹. Produtos como 2,3-butanodiol e butirato também foram detectados em concentrações acima de 1 g/L em todas as taxas de diluição avaliadas (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 Enriquecimento de esgoto em cultura contínua (35 °C, 150 rpm) contendo meio basal com glicerina bruta (5 %, v/v). Os resultados representam os valores absolutos de cada cultivo.

Parâmetros	D (h ⁻¹)			
	Pré-cultivo	0,1	0,2	0,4
Glicerol _i	25,04	25,60	25,97	27,40
Glicerol _f	14,93	12,22	16,99	18,95
Succinato	1,01	0,45	0,79	0,92
Lactato	n.d.	n.d.	0,23	n.d.
Formato	1,00	n.d.	n.d.	n.d.
Acetato	0,33	0,17	0,42	0,37
1,3-Propanodiol	1,98	4,18	3,59	2,52
Propionato	1,29	0,42	0,04	n.d.
2,3-Butanodiol	0,63	4,26	1,03	1,10
Etanol	0,30	n.d.	0,28	0,01
Butirato	0,84	n.d.	n.d.	0,48
DO _{600nm}	1,71	3,19	2,14	1,79
<i>Y</i> _{PD/Glicerol} (mol/mol)	0,24	0,38	0,48	0,36
C _R (%)	93,55	94,71	94,99	93,11

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. *Y*_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido. C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

3.1.4 Dejetos suínos

O consumo do glicerol durante os cultivos sucessivos da amostra de dejetos suínos, em meio contendo glicerina bruta, variou entre 60 (16,36 g/L) e 14 % (3,74 g/L). O aumento do número de cultivos afetou negativamente o crescimento microbiano, a produção de 1,3-propanodiol e seu rendimento, com redução de 61 % nos valores de DO_{600nm}, 95 % na concentração do diol e de 88 % em seu rendimento, entre o primeiro e o quinto cultivo. O formato foi o principal produto da fermentação da glicerina bruta, atingindo a concentração máxima de 4,56 g/L no segundo cultivo.

Produtos como etanol e lactato também foram produzidos, a partir do segundo cultivo, em concentrações acima das observadas para o 1,3-propanodiol. O propionato, por outro lado, não foi detectado em nenhum dos cultivos (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 Enriquecimento de dejetos suínos em meio basal contendo glicerina bruta (5 %, v/v) por cultivos (72 h, 35 °C) sucessivos em batelada. Os resultados representam os valores absolutos de cada cultivo.

Parâmetros	Cultivo				
	1	2	3	4	5
Glicerol _i	26,48	27,14	29,03	26,72	27,12
Glicerol _f	15,81	10,78	21,18	22,69	23,38
Succinato	n.d.	0,74	n.d.	n.d.	n.d.
Lactato	n.d.	3,29	0,76	0,46	0,48
Formato	n.d.	4,56	2,57	1,53	1,61
Acetato	1,03	0,33	0,12	0,10	0,12
1,3-Propanodiol	2,84	2,08	0,56	0,14	0,16
Propionato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,3-Butanodiol	0,22	0,18	0,11	0,02	n.d.
Etanol	2,50	3,01	1,17	0,52	0,65
Butirato	0,49	0,70	0,36	0,26	0,19
DO _{600nm}	1,12	1,41	0,872	0,980	0,544
$Y_{PD/Glicerol}$ (mol/mol)	0,32	0,15	0,09	0,04	0,05
C_R (%)	92,96	95,98	91,88	95,54	97,28

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. $Y_{PD/Glicerol}$: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido. C_R : porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

Em cultura contínua o consumo de glicerol pela amostra de dejetos suínos variou ente 60 (16,21 g/L) e 17 % (4,58 g/L), enquanto o crescimento microbiano teve redução de 39 % nos valores da DO_{600nm} entre a menor e a maior taxa de diluição. A produção máxima de 1,3-propanodiol, 2,04 g/L, foi obtida com $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, no entanto, a elevação da taxa de diluição para $0,4 \text{ h}^{-1}$ resultou em redução superior a 99 % na produção desse diol. Ao invés do formato, em cultura contínua, o principal produto da fermentação por microrganismos de dejetos suínos foi o etanol, com uma produção entre 4,31 e 1,59 g/L, enquanto o propionato não foi detectado em nenhum estágio do cultivo, semelhante ao observado em batelada (Tabela 2.8).

3.2 Seleção e Identificação de Microrganismos Produtores de 1,3-propanodiol

A seleção de microrganismos produtores de 1,3-propanodiol foi realizada a partir de culturas isoladas após o enriquecimento em glicerina bruta de amostras de

rúmen, solo, esgoto e dejetos suínos. O enriquecimento de amostras de líquido de rúmen em batelada e cultura contínua não resultou em culturas produtoras de 1,3-propanodiol, enquanto o enriquecimento de esgoto e dejetos suínos em batelada não resultou em culturas viáveis para a etapa de seleção dos isolados produtores de 1,3-propanodiol.

Tabela 2.8 Enriquecimento de dejetos suínos em cultura contínua (35 °C, 150 rpm) contendo meio basal com glicerina bruta (5 %, v/v). Os resultados representam os valores absolutos de cada cultivo.

Parâmetros	D (h ⁻¹)			
	Pré-cultivo	0,1	0,2	0,4
Glicerol _i	27,24	26,83	27,52	26,64
Glicerol _f	12,56	10,62	15,28	22,06
Succinato	0,67	0,67	0,70	0,59
Lactato	1,79	1,50	1,02	n.d.
Formato	3,57	1,84	2,15	n.d.
Acetato	0,33	0,52	0,58	0,14
1,3-Propanodiol	1,61	2,04	1,86	0,05
Propionato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,3-Butanodiol	0,18	0,25	0,09	n.d.
Etanol	3,26	4,31	3,15	1,59
Butirato	0,60	0,75	0,40	0,44
DO _{600nm}	1,460	1,340	1,240	0,820
<i>Y</i> _{PD/Glicerol} (mol/mol)	0,13	0,15	0,18	0,01
<i>C</i> _R (%)	92,39	90,33	95,21	96,10

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. *Y*_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido. *C*_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

3.2.1 Solo – batelada

Cinco culturas produtoras de 1,3-propanodiol foram isoladas a partir do enriquecimento da amostra do solo em batelada contendo glicerina bruta. O consumo de glicerol variou de 74 (Sb06-20,01 g/L) a 59 % (Sb03-16,02 g/L) da concentração total do substrato. Dois padrões fermentativos podem ser observados entre os isolados. Entre os isolados Sb01, Sb04 e Sb10 não houve produção de butirato, enquanto as concentrações de succinato, lactato e acetato foram pelo menos 70, 35 e 80 % superiores, respectivamente, às concentrações dos mesmos ácidos produzidos pelos isolados Sb03 e Sb06. Por outro lado, os isolados Sb03 e Sb06 não produziram 2,3-butanodiol e etanol. Principal produto da fermentação da glicerina bruta por todos os isolados, o 1,3-propanodiol foi produzido em concentrações 0,1, 19 e 9 % acima da concentração de referência (8,37 g/L) pelos isolados Sb01, Sb06 e Sb10,

respectivamente. Desses três isolados, Sb06 e Sb10, também superaram o valor de referência para o rendimento de 1,3-propanodiol ($0,56 \text{ mol}_{1,3\text{propanodiol}}/\text{mol}_{\text{glicerol}}$), em 11 e 3 %, respectivamente (Tabela 2.9).

Tabela 2.9 Fermentação de glicerina bruta (5 %, v/v) em meio basal (72 h, 35 °C) por bactérias isoladas de amostra de solo enriquecida em cultivos sucessivos por batelada. Os resultados representam médias de dois experimentos.

Parâmetros	Isolados					
	KpU3	Sb01	Sb03	Sb04	Sb06	Sb10
Glicerol _i	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36
Glicerol _f	5,29 ± 2,93	7,53 ± 2,44	11,05 ± 0,85	9,34 ± 0,27	7,06 ± 1,30	7,93 ± 0,75
Succinato	0,50 ± 0,06	0,61 ± 0,07	0,14 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,62 ± 0,05
Lactato	3,96 ± 1,75	2,42 ± 0,44	1,37 ± 0,11	2,17 ± 0,15	0,63 ± 0,12	2,12 ± 0,09
Formato	1,73 ± 1,27	0,82 ± 0,02	1,37 ± 0,02	0,81 ± 0,02	1,19 ± 0,01	1,05 ± 0,05
Acetato	0,36 ± 0,02	1,18 ± 0,15	0,24 ± 0,02	1,34 ± 0,03	0,37 ± 0,01	1,54 ± 0,00
1,3-propanodiol	7,53 ± 1,15	8,38 ± 0,58	8,14 ± 0,45	7,89 ± 0,08	10,34 ± 0,83	9,24 ± 0,46
2,3-butanodiol	1,57 ± 0,84	0,99 ± 0,26	n.d.	0,71 ± 0,01	n.d.	1,25 ± 0,00
Etanol	3,12 ± 0,36	2,68 ± 0,96	n.d.	1,85 ± 0,09	n.d.	2,13 ± 0,14
Butirato	n.d.	n.d.	2,71 ± 0,21	n.d.	3,35 ± 0,27	n.d.
DO _{630nm}	0,589 ± 0,02	0,794 ± 0,00	0,577 ± 0,05	0,739 ± 0,01	0,667 ± 0,00	0,711 ± 0,00
$Y_{PD/Glicerol}$	0,42 ± 0,01	0,52 ± 0,03	0,62 ± 0,00	0,54 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,58 ± 0,01
pH	5,90 ± 0,22	5,81 ± 0,20	5,52 ± 0,04	5,73 ± 0,01	5,66 ± 0,05	5,78 ± 0,01
C _R (%)	98,98 ± 6,85	101,43 ± 0,92	101,23 ± 0,71	99,49 ± 1,38	96,81 ± 0,01	106,16 ± 0,56

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. $Y_{PD/Glicerol}$: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

3.2.2 Solo – cultura contínua

A partir do enriquecimento da amostra de solo, por cultura contínua, em glicerina bruta foram isoladas 26 culturas produtoras de 1,3-propanodiol. Dentre essas, o consumo de glicerol variou de 82 (Sc29 - 22,70 g/L) a 39 % (Sc24 - 10,88 g/L) do substrato inicial, com produção de 1,3-propanodiol como principal produto da fermentação por 15 isolados, e de lactato por 11 isolados. A concentração referência para 1,3-propanodiol foi superada por 10 isolados, Sc04, Sc18, Sc19, Sc20, Sc21, Sc25, Sc26, Sc27, Sc28 e Sc29. Este último foi o isolado com maior produção de 1,3-propanodiol, 11 % superior ao valor de referência. Contudo, nenhuns dos 26 isolados atingiram o valor de referência de rendimento 1,3-propanodiol, sendo o melhor resultado 4 % inferior ao valor de referência, e alcançado pelos isolados Sc18, Sc23 e Sc25. O perfil de produtos da fermentação da glicerina bruta foi semelhante entre os 26 isolados, com produção de 2,3-butanodiol por 77 % dos isolados e sem produção de butirato (Tabela 2.10).

Tabela 2.10 Fermentação de glicerina bruta (5 %, v/v) em meio basal (72 h, 35 °C) por bactérias isoladas de amostra de solo enriquecida em cultura contínua. Os resultados representam médias de dois experimentos.

Parâmetros	Isolados								
	KpU3	Sc01 ^a	Sc04 ^a	Sc06 ^a	Sc07 ^a	Sc08 ^a	Sc09 ^a	Sc10 ^a	Sc11 ^b
Glicerol _i	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57
Glicerol _f	4,96 ± 2,47	8,91 ± 0,42	7,90 ± 1,02	9,44 ± 1,49	15,28 ± 0,94	7,79 ± 0,48	8,73 ± 1,34	13,05 ± 0,01	8,77 ± 1,03
Succinato	0,42 ± 0,06	0,32 ± 0,02	0,44 ± 0,05	0,12 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,17 ± 0,09	0,39 ± 0,01	0,20 ± 0,04
Lactato	3,08 ± 0,52	1,10 ± 0,35	1,18 ± 0,22	6,30 ± 0,30	4,35 ± 0,37	2,24 ± 0,15	5,94 ± 0,53	5,21 ± 0,11	5,90 ± 0,39
Formato	2,23 ± 0,56	1,18 ± 0,04	1,13 ± 0,02	1,43 ± 0,10	2,00 ± 0,23	0,94 ± 0,02	1,36 ± 0,23	1,53 ± 0,07	1,43 ± 0,05
Acetato	0,26 ± 0,17	1,25 ± 0,13	1,35 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,13 ± 0,03	1,11 ± 0,06	0,06 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,00
1,3-propanodiol	7,44 ± 1,28	7,93 ± 0,22	8,48 ± 0,32	5,22 ± 0,49	2,90 ± 0,27	8,30 ± 0,35	5,02 ± 0,40	3,48 ± 0,15	5,16 ± 0,11
2,3-butanodiol	1,88 ± 0,41	1,37 ± 0,23	1,41 ± 0,01	0,70 ± 0,17	n.d.	1,44 ± 0,20	0,77 ± 0,08	n.d.	0,78 ± 0,03
Etanol	2,71 ± 0,22	0,93 ± 0,15	1,34 ± 0,24	2,28 ± 0,21	1,90 ± 0,03	1,00 ± 0,02	2,76 ± 0,46	2,04 ± 0,01	2,94 ± 0,15
Butirato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DO _{630nm}	0,603 ± 0,00	0,581 ± 0,00	0,528 ± 0,01	0,377 ± 0,03	0,505 ± 0,00	0,460 ± 0,02	0,393 ± 0,04	0,544 ± 0,02	0,335 ± 0,01
$Y_{PD/Glicerol}$	0,40 ± 0,03	0,51 ± 0,00	0,52 ± 0,01	0,35 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,33 ± 0,03
pH	5,81 ± 0,35	5,79 ± 0,02	5,80 ± 0,01	5,38 ± 0,01	5,50 ± 0,01	5,75 ± 0,01	5,55 ± 0,18	5,44 ± 0,06	5,59 ± 0,04
C _R (%)	92,47 ± 0,04	91,22 ± 0,49	93,15 ± 0,00	99,14 ± 0,60	100,23 ± 1,45	92,56 ± 0,49	97,08 ± 1,33	97,65 ± 0,93	99,08 ± 5,08

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. $Y_{PD/Glicerol}$: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa; ^{a, b, c} Isolados obtidos durante enriquecimento nas taxas de diluição 0,1, 0,2 e 0,4 h⁻¹, respectivamente.

Tabela 2.10 – Cont. Fermentação de glicerina bruta (5 %, v/v) em meio basal (72 h, 35 °C) por bactérias isoladas de amostra de solo enriquecida em cultura contínua. Os resultados representam médias de dois experimentos.

Parâmetros	Isolados								
	Sc13 ^b	Sc14 ^b	Sc15 ^b	Sc16 ^b	Sc17 ^b	Sc18 ^b	Sc19 ^{b,d}	Sc20 ^b	Sc21 ^c
Glicerol _i	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57
Glicerol _f	8,92 ± 0,05	15,15 ± 0,07	8,04 ± 0,56	16,46 ± 0,42	8,04 ± 1,36	6,58 ± 0,24	7,79 ± 0,00	8,00 ± 0,09	7,44 ± 0,16
Succinato	0,32 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,14 ± 0,00	0,32 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,35 ± 0,00	n.d.	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,02
Lactato	1,16 ± 0,29	4,68, ± 0,22	5,49 ± 0,08	3,30 ± 0,02	4,49 ± 0,18	1,17 ± 0,00	1,08 ± 0,00	0,95 ± 0,01	1,97 ± 0,10
Formato	1,09 ± 0,00	1,92 ± 0,04	1,40 ± 0,01	2,50 ± 0,07	1,83 ± 0,20	1,12 ± 0,13	0,99 ± 0,00	1,09 ± 0,03	0,87 ± 0,07
Acetato	1,38 ± 0,07	0,17 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,08 ± 0,01	1,42 ± 0,14	1,31 ± 0,00	1,19 ± 0,02	1,30 ± 0,01
1,3-propanodiol	8,11 ± 0,05	3,22 ± 0,14	5,03 ± 0,16	2,33 ± 0,08	4,98 ± 0,16	9,27 ± 0,01	8,72 ± 0,00	8,41 ± 0,04	8,39 ± 0,06
2,3-butanodiol	1,24 ± 0,08	n.d.	0,85 ± 0,13	n.d.	1,02 ± 0,02	1,45 ± 0,17	1,78 ± 0,00	1,49 ± 0,02	1,38 ± 0,01
Etanol	1,00 ± 0,04	1,85 ± 0,08	2,91 ± 0,04	1,84 ± 0,12	3,02 ± 0,25	1,24 ± 0,01	1,42 ± 0,00	1,10 ± 0,06	1,15 ± 0,02
Butirato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DO _{630nm}	0,537 ± 0,00	0,544 ± 0,01	0,381 ± 0,07	0,519 ± 0,02	0,422 ± 0,02	0,536 ± 0,01	0,519 ± 0,00	0,543 ± 0,03	0,556 ± 0,03
<i>Y_{PD/Glicerol}</i>	0,53 ± 0,00	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,54 ± 0,00	0,52 ± 0,01	0,50 ± 0,01
pH	5,81 ± 0,05	5,45 ± 0,06	5,58 ± 0,02	5,41 ± 0,01	5,75 ± 0,12	5,91 ± 0,00	6,11 ± 0,00	5,87 ± 0,04	5,81 ± 0,04
C _R (%)	92,24 ± 0,04	102,28 ± 2,21	94,08 ± 0,83	99,20 ± 1,85	92,94 ± 2,74	91,43 ± 0,14	93,51 ± 0,00	90,47 ± 0,27	91,59 ± 1,42

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. *Y_{PD/Glicerol}*: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa; ^{a, b, c} Isolados obtidos durante enriquecimento nas taxas de diluição 0,1, 0,2 e 0,4 h⁻¹, respectivamente.

Tabela 2.10 – Cont. Fermentação de glicerina bruta (5 %, v/v) em meio basal (72 h, 35 °C) por bactérias isoladas de amostra de solo enriquecida em cultura contínua. Os resultados representam médias de dois experimentos.

Parâmetros	Isolados								
	Sc22 ^c	Sc23 ^c	Sc24 ^c	Sc25 ^c	Sc26 ^c	Sc27 ^c	Sc28 ^c	Sc29 ^c	Sc30 ^c
Glicerol _i	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57	27,55 ± 0,57
Glicerol _f	13,10 ± 0,29	8,93 ± 0,99	16,67 ± 0,12	6,71 ± 0,27	7,93 ± 0,28	6,24 ± 1,04	7,17 ± 0,28	4,85 ± 0,46	11,48 ± 0,35
Succinato	0,39 ± 0,03	0,33 ± 0,07	0,31 ± 0,04	0,31 ± 0,13	0,35 ± 0,05	0,37 ± 0,04	0,40 ± 0,05	0,48 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Lactato	5,38 ± 0,03	0,85 ± 0,02	3,90 ± 0,19	2,21 ± 0,14	2,07 ± 0,15	2,10 ± 0,17	2,16 ± 0,03	2,43 ± 0,02	5,79 ± 0,08
Formato	1,48 ± 0,13	1,24 ± 0,04	2,45 ± 0,01	0,95 ± 0,13	1,12 ± 0,01	1,03 ± 0,04	1,05 ± 0,06	0,97 ± 0,07	1,56 ± 0,01
Acetato	0,17 ± 0,02	1,37 ± 0,08	0,05 ± 0,02	1,58 ± 0,15	1,44 ± 0,01	1,41 ± 0,04	1,52 ± 0,03	1,32 ± 0,04	0,05 ± 0,01
1,3-propanodiol	3,69 ± 0,09	8,27 ± 0,18	2,23 ± 0,17	9,35 ± 0,46	8,63 ± 0,27	8,92 ± 0,27	8,96 ± 0,29	9,44 ± 0,12	4,24 ± 0,11
2,3-butanodiol	n.d.	1,40 ± 0,06	n.d.	1,22 ± 0,04	1,11 ± 0,10	1,22 ± 0,02	1,14 ± 0,07	1,29 ± 0,00	0,42 ± 0,05
Etanol	1,84 ± 0,08	0,97 ± 0,05	2,12 ± 0,03	0,74 ± 0,04	0,89 ± 0,11	1,21 ± 0,21	1,07 ± 0,01	1,52 ± 0,05	2,07 ± 0,07
Butirato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DO _{630nm}	0,556 ± 0,01	0,564 ± 0,00	0,494 ± 0,01	0,528 ± 0,02	0,534 ± 0,03	0,522 ± 0,01	0,540 ± 0,01	0,562 ± 0,00	0,452 ± 0,04
<i>Y_{PD/Glicerol}</i>	0,31 ± 0,00	0,54 ± 0,04	0,25 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,53 ± 0,02	0,50 ± 0,00	0,32 ± 0,00
pH	5,53 ± 0,00	6,05 ± 0,01	5,54 ± 0,04	5,74 ± 0,04	5,77 ± 0,03	5,83 ± 0,05	5,79 ± 0,03	5,79 ± 0,09	5,51 ± 0,04
C _R (%)	98,31 ± 1,30	92,79 ± 5,05	102,28 ± 1,99	92,61 ± 2,92	93,58 ± 1,95	90,63 ± 0,67	93,94 ± 3,00	90,93 ± 0,90	98,45 ± 0,42

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. *Y_{PD/Glicerol}*: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa; ^{a, b, c} Isolados obtidos durante enriquecimento nas taxas de diluição 0,1, 0,2 e 0,4 h⁻¹, respectivamente.

3.2.3 Esgoto – cultura contínua

Doze culturas produtoras de 1,3-propanodiol foram isoladas a partir do enriquecimento da amostra de esgoto em cultura contínua com glicerina bruta. Cultivados em meio basal contendo glicerina bruta, esses isolados consumiram de 82 (Ec21 - 22,27 g/L) a 43 % (Ec05 – 11,62 g/L) do glicerol disponível. Dentre os 12 isolados avaliados, 11 isolados (Ec05, Ec07, Ec08, Ec12, Ec14, Ec18, Ec21, Ec23, Ec25, Ec27 e Ec30) apresentaram perfil metabólico semelhante, com produção de succinato, lactato, formato, acetato, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol e etanol, mas sem produção de butirato. Perfil metabólico distinto foi apresentado pelo isolado Ec19, sem produção de 2,3-butanodiol e etanol, mas com produção de butirato, succinato, lactato, formato, acetato e 1,3-propanodiol. Principal produto da fermentação em nove dos 12 isolados, o 1,3-propanodiol foi produzido em concentrações 5, 18 e 10 % superiores à concentração de referência, pelos isolados Ec18, Ec19 e Ec21, respectivamente. Desses três isolados, Ec18 e Ec19, também superaram o valor de referência para o rendimento de 1,3-propanodiol ($0,56 \text{ mol}_{1,3\text{propanodiol}}/\text{mol}_{\text{glicerol}}$), em 7 e 11 %, respectivamente (Tabela 2.11).

3.2.3 Dejetos suínos – cultura contínua

Cinco culturas produtoras de 1,3-propanodiol foram isoladas por meio do enriquecimento de dejetos suínos, em meio contendo glicerina bruta, por cultura contínua. O consumo de glicerol entre os cinco isolados variou de 57 (Fc01 - 15,59 g/L) a 44 % (Fc14 - 11,92 g/L) do glicerol disponível, com produção predominante de lactato pelo isolado Fc10, de 1,3-propanodiol pelos isolados Fc01 e Fc05, e de etanol pelos isolados Fc14 e Fc26. Produtos como 2,3-butanodiol e butirato não foram detectados nos cultivos de nenhum dos cinco isolados, e o formato não foi detectado entre os produtos da fermentação da glicerina bruta dos isolados Fc01 e Fc05. Em relação à concentração de 1,3-propanodiol, nenhum dos isolados alcançou o valor de referência, sendo o melhor resultado, obtido pelo isolado Fc01, 32 % inferior aos 8,37 g/L de 1,3-propanodiol. O valor de referência para o rendimento de 1,3-propanodiol também não foi atingido pelos isolados do enriquecimento de dejetos suínos, os quais obtiveram como melhor rendimento (Fc10) um valor 20 % inferior aos $0,56 \text{ mol}_{1,3\text{propanodiol}}/\text{mol}_{\text{glicerol}}$ objetivados (Tabela 2.12).

Tabela 2.11 Fermentação de glicerina bruta (5 %, v/v) em meio basal (72 h, 35 °C) por bactérias isoladas de amostra de esgoto enriquecida em cultura contínua. Os resultados representam médias de dois experimentos.

Parâmetros	Isolados											
	Ec05 ^a	Ec07 ^a	Ec08 ^a	Ec12 ^b	Ec14 ^b	Ec18 ^b	Ec19 ^b	Ec21 ^c	Ec23 ^c	Ec25 ^c	Ec27 ^c	Ec30 ^c
Glicerol _i	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36	27,07 ± 0,36
Glicerol _f	15,45 ± 1,18	11,68 ± 1,87	10,83 ± 0,95	10,09 ± 1,51	10,96 ± 0,10	9,35 ± 0,15	7,49 ± 0,20	4,77 ± 0,18	10,29 ± 1,43	12,68 ± 1,82	9,82 ± 0,60	10,18 ± 0,32
Succinato	0,20 ± 0,00	0,42 ± 0,00	0,50 ± 0,03	0,54 ± 0,06	0,43 ± 0,03	0,50 ± 0,06	0,12 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,27 ± 0,05	0,43 ± 0,04	0,48 ± 0,03	0,42 ± 0,01
Lactato	1,72 ± 0,01	3,55 ± 0,31	3,30 ± 0,10	4,35 ± 0,55	1,21 ± 0,00	1,46 ± 0,07	0,94 ± 0,24	2,91 ± 0,05	1,49 ± 0,16	2,51 ± 0,28	2,94 ± 0,44	1,46 ± 0,12
Formato	2,54 ± 0,01	1,67 ± 0,29	1,38 ± 0,10	1,03 ± 0,14	0,95 ± 0,02	1,01 ± 0,01	1,11 ± 0,00	1,07 ± 0,02	0,97 ± 0,01	1,82 ± 0,25	0,79 ± 0,14	0,83 ± 0,06
Acetato	0,19 ± 0,04	0,41 ± 0,07	0,42 ± 0,01	0,50 ± 0,04	1,61 ± 0,03	1,22 ± 0,05	0,56 ± 0,10	0,57 ± 0,03	1,77 ± 0,07	0,33 ± 0,03	1,23 ± 0,22	1,49 ± 0,05
1,3-propanodiol	1,60 ± 0,03	6,03 ± 0,73	4,07 ± 0,36	5,90 ± 0,20	7,85 ± 0,05	8,85 ± 0,09	10,09 ± 0,14	9,32 ± 0,21	8,23 ± 0,61	2,40 ± 0,36	6,98 ± 0,72	7,45 ± 0,35
2,3-butanodiol	0,03 ± 0,04	0,35 ± 0,11	0,44 ± 0,08	0,66 ± 0,05	0,99 ± 0,11	1,20 ± 0,02	n.d.	2,64 ± 0,05	1,19 ± 0,28	n.d.	0,33 ± 0,04	0,99 ± 0,05
Etanol	4,67 ± 0,52	2,84 ± 0,34	4,51 ± 0,27	3,10 ± 0,67	1,38 ± 0,09	1,26 ± 0,04	n.d.	2,30 ± 0,10	1,56 ± 0,47	4,81 ± 0,42	2,42 ± 0,31	1,72 ± 0,07
Butirato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,87 ± 0,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DO _{630nm}	0,438 ± 0,020	0,613 ± 0,020	0,536 ± 0,000	0,631 ± 0,040	0,494 ± 0,010	0,603 ± 0,080	0,449 ± 0,050	0,425 ± 0,050	0,525 ± 0,060	0,433 ± 0,050	0,466 ± 0,010	0,570 ± 0,02
<i>Y_{PD/Glicerol}</i>	0,17 ± 0,02	0,47 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,59 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,63 ± 0,00	0,51 ± 0,02	0,59 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,49 ± 0,03	0,53 ± 0,02
pH	5,82 ± 0,06	5,37 ± 0,07	5,70 ± 0,03	5,63 ± 0,16	5,81 ± 0,01	5,55 ± 0,01	5,82 ± 0,07	5,87 ± 0,08	5,84 ± 0,06	5,80 ± 0,01	5,72 ± 0,06	5,90 ± 0,03
C _R (%)	101,63 ± 1,94	106,54 ± 1,21	101,99 ± 0,08	105,18 ± 0,63	102,01 ± 0,63	100,84 ± 1,15	96,90 ± 1,46	100,90 ± 1,48	104,21 ± 1,01	98,09 ± 2,33	100,60 ± 0,49	99,18 ± 0,14

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. *Y_{PD/Glicerol}*: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa; ^{a, b, c} Isolados obtidos durante enriquecimento nas taxas de diluição 0,1, 0,2 e 0,4 h⁻¹, respectivamente.

Tabela 2.12 Fermentação de glicerina bruta (5 %, v/v) em meio basal (72 h, 35 °C) por bactérias isoladas de amostra de dejetos suínos enriquecida em cultura contínua. Os resultados representam médias de dois experimentos.

Parâmetros	Isolados					
	KpU3	Fc01 ^a	Fc05 ^a	Fc10 ^a	Fc14 ^b	Fc26 ^c
Glicerol _i	27,32 ± 0,18	27,32 ± 0,18	27,32 ± 0,18	27,32 ± 0,18	27,32 ± 0,18	27,32 ± 0,18
Glicerol _f	5,14 ± 0,39	11,83 ± 0,15	12,76 ± 0,06	15,29 ± 2,03	15,40 ± 0,74	14,37 ± 0,49
Succinato	0,34 ± 0,21	0,67 ± 0,06	0,66 ± 0,10	0,55 ± 0,24	0,38 ± 0,05	0,66 ± 0,10
Lactato	3,62 ± 0,26	5,20 ± 0,63	4,99 ± 0,23	3,02 ± 2,99	0,86 ± 0,14	1,94 ± 0,02
Formato	1,28 ± 0,02	n.d.	n.d.	1,20 ± 0,07	2,66 ± 0,07	2,22 ± 0,07
Acetato	0,41 ± 0,03	0,81 ± 0,08	0,80 ± 0,01	0,47 ± 0,46	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,01
1,3-propanodiol	7,79 ± 0,33	5,67 ± 0,70	2,82 ± 0,50	2,82 ± 0,50	0,15 ± 0,06	1,02 ± 0,00
2,3-butanodiol	3,04 ± 0,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Etanol	n.d.	1,16 ± 0,14	1,13 ± 0,03	2,55 ± 0,83	4,17 ± 0,43	4,62 ± 0,01
Butirato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DO _{630nm}	0,820 ± 0,02	0,508 ± 0,03	0,493 ± 0,01	0,523 ± 0,02	0,524 ± 0,04	0,555 ± 0,00
<i>Y</i> _{PD/Glicerol}	0,42 ± 0,01	0,44 ± 0,06	0,45 ± 0,03	0,28 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
pH	5,79 ± 0,04	5,71 ± 0,03	5,68 ± 0,01	6,01 ± 0,00	6,09 ± 0,06	5,91 ± 0,06
C _R (%)	90,57 ± 4,36	99,12 ± 7,21	100,31 ± 3,79	99,00 ± 4,70	89,10 ± 0,56	95,41 ± 2,42

As concentrações de glicerol inicial (Glicerol_i), glicerol final (Glicerol_f) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados. *Y*_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa; ^{a, b, c} Isolados obtidos durante enriquecimento nas taxas de diluição 0,1, 0,2 e 0,4 h⁻¹, respectivamente.

Dentre os microrganismos que alcançaram os valores de referência de produção e rendimento de 1,3-propanodiol, os isolados Sb06 e Ec18 foram selecionados para identificação. O isolado Sb06 consistiu de um bacilo gram-positivo, formador de esporos, identificado com 99 % de certeza como *Clostridium butyricum* por meio dos testes bioquímicos utilizando o Kit API 20A (bioMerieux, França). O isolado Ec18 apresentou-se como bacilo gram-negativo, não formador de esporo e com perfil fermentativo não identificável pelo Kit API 20A (bioMerieux, França). Esse isolado foi caracterizado geneticamente como *Klebsiella pneumoniae*, com 99 % de identidade entre a sequência parcial do rDNA 16S do isolado obtido neste estudo e o isolado *K. pneumoniae* MGH 78578, cujo genoma está completamente sequenciado.

4. DISCUSSÃO

O aumento da oferta de glicerina bruta no mercado bem como seus baixos preços tem encorajado a pesquisa por novas aplicações para este co-produto da indústria do biodiesel, como sua bioconversão em 1,3-propanodiol. Neste contexto, a bioprospecção em diferentes habitat pode auxiliar a seleção de microrganismos capazes de utilizar eficientemente a glicerina bruta para produção de 1,3-propanodiol. Estudos com substituição de parte da dieta de ruminantes por glicerina bruta têm demonstrado a capacidade dos microrganismos do ambiente ruminal de tolerar a glicerina bruta (SCHRÖDER e SÜDEKUM, 1999; MACH *et al.*, 2009). Contudo, até o momento, não há relatos na literatura da bioprospecção de microrganismos produtores de 1,3-propanodiol no rúmen.

Nesse estudo, o enriquecimento de amostras de líquido ruminal em meio contendo glicerina bruta não resultou em isolamento de culturas produtoras de 1,3-propanodiol, sendo o succinato o principal produto da fermentação da glicerina bruta durante o enriquecimento (Tabelas 2.1 e 2.2). Segundo Hobson e Mann (1961), o glicerol adicionado ao rúmen é metabolizado principalmente por microrganismos gênero *Selenomonas*, em especial *S. ruminantium*, cujos principais produtos da fermentação são, normalmente, propionato e acetato. No entanto, estudos realizados no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios da Universidade Federal de Viçosa com o isolado ruminal *S. ruminantium* 22A, mostraram que a composição dos produtos da fermentação pode variar de acordo com o substrato. Utilizando concentrações equivalentes de glicerol e glicerina bruta, Lopes e colaboradores (2008) obtiveram como principal produto da fermentação o propionato e o succinato, respectivamente.

Com produção de 1,3-propanodiol entre os produtos da fermentação da glicerina bruta, o enriquecimento de amostras de solo, esgoto e dejetos suínos resultou na seleção de 48 culturas produtoras de 1,3-propanodiol. Destas, 45 apresentaram coloração gram-negativa e perfil fermentativo comum às enterobactérias, com produção de succinato, lactato, formato, acetato, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol e etanol (HOMANN *et al.*, 1990). Os isolados Sb03, Sb06 e Ec19, por outro lado, apresentaram coloração gram-positiva e perfil fermentativo semelhante aos clostrídios, com produção de succinato, lactato, formato, acetato, 1,3-propanodiol e butirato (FORSBERG, 1987).

A predominância de bactérias gram-negativas em relação às gram-positivas entre culturas produtoras de 1,3-propanodiol isoladas pode ser explicada, em parte, por características como maior velocidade de crescimento e maior tolerância à glicerina bruta (PETITDEMANGE *et al.*, 1995; BIEBL *et al.*, 1999; WILLKE e VORLOP, 2008). O isolamento de culturas produtoras de 1,3-propanodiol realizado por Homann e colaboradores (1990) resultou somente em bactérias gram-negativas, identificadas como *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae* e *Citrobacter freundii*. Do gênero *Citrobacter* foram também as bactérias isoladas por Werkman e Gillen (1932) a partir de solo, dejetos de cavalo, ovelhas, vacas e ratos. Além disso, a presença de O₂ nas amostras coletadas de ambientes não-anaeróbios, como o solo e o esgoto, pode inibir o crescimento de microrganismos anaeróbios estritos, como os clostrídios produtores de 1,3-propanodiol (WILLKE e VORLOP, 2008).

Em relação aos parâmetros de referência, 16 culturas atingiram ou superaram o valor de 8,37 g/L de 1,3-propanodiol, sendo 14 (87 %) culturas gram-negativas e duas (13 %) culturas gram-positivas. Considerando as 16 culturas anteriores, apenas quatro (Sb06, Sb10, Ec18 e Ec19) atingiram ou superaram o valor de referência para o rendimento de 1,3-propanodiol (0,56 mol_{1,3propanodiol}/mol_{glicérol}), sendo duas (13 %_{total}, 14 %_{gram-negativas}) gram-negativas e duas (13 %_{total}, 100 %_{gram-positivas}). O maior êxito das culturas gram-positivas em atingir o valor de referência para rendimento de 1,3-propanodiol pode ser explicado em parte pela característica metabólica desses microrganismos, que produzem principalmente acetato e butirato como co-produtos da fermentação do glicérol, apresentando, em geral maior rendimento de 1,3-propanodiol do que as enterobactérias (BIEBL *et al.*, 1999; WILLKE e VORLOP, 2008).

Desta forma, considerando os quatro isolados que superaram os valores de referência para produção e rendimento de 1,3-propanodiol e seus resultados nos experimentos de seleção, dois foram selecionados para estudos posteriores, um gram-positivo (Sb06) e um gram-negativo (Ec18) os quais representam dois modelos distintos de estudo para a produção de 1,3-propanodiol. Por meio de caracterização bioquímica e sequenciamento parcial do gene do rRNA 16S os isolados selecionados, Sb06 e Ec18, foram identificados como *C.butyricum* e *K. pneumoniae*, respectivamente.

5. CONCLUSÕES

As amostras de líquido de rúmen, solo, esgoto e dejetos suínos apresentaram microrganismos capazes fermentar parcialmente a glicerina bruta nas condições avaliadas.

O principal produto da fermentação da glicerina bruta pela amostra de líquido de rúmen foi o succinato, não havendo produção de 1,3-propanodiol.

O principal produto da fermentação da glicerina bruta pelas amostras de solo e esgoto foi o 1,3-propanodiol.

O principal produto da fermentação da glicerina bruta pela amostra de dejetos suínos foram o formato e o etanol, em cultivos sucessivos em batelada e em cultura contínua, respectivamente.

O enriquecimento de amostras de solo, esgoto e dejetos suínos nas condições avaliadas permitiu o isolamento de culturas produtoras de 1,3-propanodiol a partir de glicerina bruta.

O enriquecimento de amostras de solo, esgoto e dejetos suínos em meio contendo glicerina bruta, nas condições avaliadas, favoreceu o isolamento de culturas produtoras de 1,3-propanodiol gram-negativas.

O enriquecimento de amostras de solo e esgoto em meio contendo glicerina bruta resultaram no isolamento de culturas mais eficientes na produção de 1,3-propanodiol.

Os parâmetros de produção e rendimento mínimos de 1,3-propanodiol adotados como referência favoreceram a seleção de culturas gram-positivas.

Referências

- ANP (2010) Produção de biodiesel - B100 por produtor - 2005-2010 (m³). **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. <http://www.anp.gov.br/SITE/acao/download/?id=8740&cachebust=1290686590289>. Accessed 20/10/2010 2010
- ATHALYE SK, GARCIA RA, WEN Z (2009) Use of biodiesel-derived crude glycerol for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregulare*. **J Agric Food Chem** 57 (7):2739-2744.
- BIEBL H, MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. **Appl Microbiol Biotechnol** 52 (3):289-297.
- FORSBERG CW (1987) Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. **Appl Environ Microbiol** 53 (4):639-643.
- GONZALEZ-PAJUELO M, ANDRADE JC, VASCONCELOS I (2004) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. **J Ind Microbiol Biotechnol** 31 (9):442-446.
- GONZALEZ-PAJUELO M, ANDRADE JC, VASCONCELOS I (2005) Production of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. **J Ind Microbiol Biotechnol** 32 (9):391-396.
- GONZALEZ-PAJUELO M, MEYNIAL-SALLES I, MENDES F, SOUCAILLE P, VASCONCELOS I (2006) Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). **Appl Environ Microbiol** 72 (1):96-101.
- HIREMATH A, KANNABIRAN M, RANGASWAMY V (2011) 1,3-Propanediol production from crude glycerol from jatropha biodiesel process. **N Biotechnol** 28 (1):19-23.
- HOBSON PN, MANN SO (1961) The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. **J Gen Microbiol** 25 (2):227-240.
- HOMANN T, TAG C, BIEBL H, DECKWER W-D, SCHINK B (1990) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Appl Microbiol Biotechnol** 33 (2):121-126.
- JOHNSON DT, TACONI KA (2007) The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production **Environ Prog** 26 (4):338-348.

KOUTINAS AA, WANG RH, WEBB C (2007) The biochemurgist -Bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. **Biofuels Bioprod Bioref** 1 (1):24-38.

KRAUS GA (2008) Synthetic methods for the preparation of 1,3-propanediol. **CLEAN – Soil, Air, Water** 36 (8):648-651.

LANE DJ (1991) **16S/23S rRNA Sequencing**. In: STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M (eds) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, pp 115-175.

LOPES DRG, MELO MR, MANTOVANI HC (2008) Produção de ácido propiônico em glicerina de biodiesel por *Selenomonas ruminantium* 22A. In: **XVIII Simpósio de Iniciação Científica, VIII Simpós - Mostra Científica da Pós-Graduação, VI Simpósio de Extensão Universitária e II Sen – Simpósio de Ensino**, Viçosa-MG, Brasil, 2008. UFV, Viçosa-MG, Brasil.

MACH N, BACH A, DEVANT M (2009) Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **J Anim Sci** 87 (2):632-638.

MU Y, TENG H, ZHANG DJ, WANG W, XIU ZL (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnol Lett** 28 (21):1755-1759.

PAGLIARO M, ROSSI M (2008) **The Future of Glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

PETITDEMANGE E, DÜRR C, ABBAD-ANDALOUSSI S, RAVAL G (1995) Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 15 (6):498-502.

PYLE DJ, GARCIA RA, WEN Z (2008) Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. **J Agric Food Chem** 56 (11):3933-3939.

SAINT-AMANS S, GIRBAL L, ANDRADE J, AHRENS K, SOUCAILLE P (2001) Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. **J Bacteriol** 183 (5):1748-1754.

SAINT-AMANS S, PERLOT P, GOMA G, SOUCAILLE P (1994) High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. **Biotechnol Lett** 16 (8):831-836.

SCHRÖDER A, SÜDEKUM KH (1999) Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: **Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants**, Canberra, 1999. The Regional Institute, Ltd.

TEATHER RM (1982) Maintenance of laboratory strains of obligately anaerobic rumen bacteria. **Appl Environ Microbiol** 44 (2):499-501.

THOMPSON JC, HE BB (2006) Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Appl Eng Agric** 22 (2):261-265.

WERKMAN CH, GILLEN GF (1932) Bacteria producing trimethylene glycol. **J Bacteriol** 23 (2):167-182.

WILLKE T, VORLOP K (2008) Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. **Eur J Lipid Sci Technol** 110 (9):831-840.

YAZDANI SS, GONZALEZ R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Curr Opin Biotechnol** 18 (3):213-219.

ZENG AP, BIEBL H (2002) Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. **Adv Biochem Eng Biotechnol** 74:239-259.

CAPÍTULO III

Fatores que Afetam o Crescimento e a Produção de 1,3-Propanodiol por Bactérias Isoladas por Enriquecimento em Glicerina Bruta

RESUMO

O crescimento e produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum* Sb06 e *Klebsiella pneumoniae* Ec18, isolados por enriquecimento de amostras de solo e esgoto, respectivamente, em meio contendo glicerina bruta da indústria do biodiesel, foram avaliados sob diferentes condições de cultivo (temperatura, pH), diferentes concentrações iniciais de substrato (glicerol puro ou glicerina bruta da indústria do biodiesel) e diferentes concentrações iniciais de produtos da fermentação (1,3-propanodiol, acetato, butirato, lactato e etanol). O crescimento de *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 foi máximo na temperatura de 40 °C e pH 7,0. A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max}) de *C. butyricum* Sb06 foi 0,782 e 0,837 h⁻¹, em glicerol e glicerina bruta, respectivamente. Para *K. pneumoniae* Ec18 a μ_{\max} em glicerol e glicerina bruta foi de 0,806 e 0,805, respectivamente. Concentrações de substrato e de 1,3-propanodiol a partir de 160 e 40 g/L inibiram completamente o crescimento de *C. butyricum* Sb06. Para *K. pneumoniae* Ec18, as concentrações de substrato e 1,3-propanodiol capazes de inibir totalmente o crescimento foram superiores a 200 e 80 g/L, respectivamente. Dentre os produtos da fermentação do glicerol ou glicerina bruta, o butirato e o acetato foram os mais inibitórios ao crescimento de *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias produtoras de 1,3-propanodiol como *Clostridium butyricum* e *Klebsiella pneumoniae* metabolizam o glicerol anaerobicamente por meio de reações de dismutação. Neste processo, parte do glicerol é oxidado gerando energia, por meio de reações de fosforilação em nível do substrato, e coenzimas reduzidas (NADH+H⁺) (1994; DANIEL *et al.*, 1999). A oxidação do glicerol também gera produtos como acetato e butirato em *C. butyricum*, e acetato, lactato, etanol, 2,3-butanodiol e succinato em *K. pneumoniae*. Paralelamente, para que o metabolismo e crescimento celulares sejam mantidos parte do glicerol é reduzido a 1,3-propanodiol, permitindo assim a reoxidação de parte das coenzimas reduzidas formadas durante a oxidação do glicerol (ZENG *et al.*, 1994; DANIEL *et al.*, 1999).

Esta distribuição do glicerol entre as vias oxidativa e redutiva é influenciada tanto pelas características genéticas e metabólicas do microrganismo como pelas condições de cultivo, determinando desta forma o rendimento de 1,3-propanodiol (CELINSKA, 2010). A oxidação do glicerol exclusivamente à acetil-CoA e seu metabolismo através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), sem fosforilação oxidativa dos equivalentes redutores, é a condição necessária para o rendimento teórico máximo de 0,85 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} (CHEN *et al.*, 2003). A formação de qualquer outro produto da fermentação do glicerol tem como consequência a diminuição do rendimento de 1,3-propanodiol em relação à formação de acetato, uma vez que altera a disponibilidade de NADH+H⁺ e a distribuição do carbono oriundo do glicerol (SOLOMON *et al.*, 1995; ZENG e BIEBL, 2002).

Em cultura contínua, a formação de produtos como butirato e etanol é favorecida pelas condições de limitação de glicerol em *C. butyricum* e *K. pneumoniae*, respectivamente (ZENG *et al.*, 1993; ZENG *et al.*, 1994). Em condições de disponibilidade de glicerol, a velocidade de crescimento de *C. butyricum* influencia a produção de butirato, a qual é reduzida com o aumento da velocidade específica de crescimento. Para o etanol, a limitação de nutrientes, outros que não o glicerol, diminuem sua produção por *K. pneumoniae* (STREEKSTRA *et al.*, 1987; ZENG *et al.*, 1994; BIEBL *et al.*, 1999). A produção de produtos como acetato, 1,3-propanodiol, lactato, 2,3-butanodiol e succinato é favorecida por condições de excesso de glicerol, tanto em *C. butyricum* quanto em *K. pneumoniae* (ZENG *et al.*, 1994; MENZEL *et al.*, 1997).

A formação dos diferentes produtos da fermentação do glicerol resulta não apenas na perda de carbono e equivalentes redutores que poderiam ser dirigidos à produção de 1,3-propanodiol, mas também inibem o crescimento microbiano, afetando novamente a distribuição do carbono e das coenzimas reduzidas (SOLOMON *et al.*, 1995; CELINSKA, 2010). A produção de ácidos, por exemplo, reduz o pH do meio de cultivo, favorecendo em *C. butyricum* a produção de butirato, que é menos inibitório que o acetato em condições acídicas. Por outro lado, em condições de neutralidade, a produção de acetato é favorecida em relação ao butirato (ZENG *et al.*, 1994). Em *K. pneumoniae*, a acidificação do meio de cultivo favorece a formação de etanol, 1,3-propanodiol e em especial 2,3-butanodiol em pH inferiores a 6,5 (BIEBL *et al.*, 1998). Álcoois como o etanol, 2,3-butanodiol, 1,3-propanodiol e glicerol, também podem afetar o crescimento dos microrganismos dependendo da concentração. Concentrações em torno de 80 g/L de 1,3-propanodiol e 200 g/L de glicerol costumam ser as máximas toleradas pelos microrganismos produtores de 1,3-propanodiol (BIEBL, 1991; COLIN *et al.*, 2000).

Neste estudo, os isolados *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18, obtidos por enriquecimento de amostras de solo e esgoto, respectivamente, em meio contendo glicerina bruta da indústria do biodiesel, foram avaliados quanto ao crescimento e produção de 1,3-propanodiol sob diferentes condições de cultivo (temperatura, pH), diferentes concentrações de glicerol (adicionado na forma de glicerol puro ou glicerina bruta da indústria do biodiesel), e diferentes concentrações de produtos da fermentação (1,3-propanodiol, acetato, butirato, lactato e etanol).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e Meios de Cultivo

Clostridium butyricum Sb06 e *Klebsiella pneumoniae* EC18 foram mantidos a -20 °C em meio de estocagem contendo (por litro): 292 mg de K₂HPO₄, 240 mg de KH₂PO₄, 480 mg de (NH₄)₂SO₄, 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO₄·7H₂O, 64 mg de CaCl₂, 800 mg de hidrocloreto de cisteína, 460 mL de glicerol e armazenadas a -20 °C (TEATHER, 1982). Para o cultivo, os microrganismos foram transferidos para meio basal contendo (por litro): 292 mg de K₂HPO₄, 240 mg de KH₂PO₄, 480 mg de (NH₄)₂SO₄, 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO₄·7H₂O, 64 mg de CaCl₂, 600 mg de hidrocloreto de cisteína, 500 mg de extrato de levedura, 1 g de Trypticase e 4 g de Na₂CO₃. Soluções anaeróbias de glicerol e glicerina bruta, ambas contendo 25 % (m/m) de glicerol, foram preparadas a partir de glicerol puro (Amresco) e glicerina bruta (60 %, m/m de glicerol, 1,25 %, m/m de etanol, pH 10) para serem adicionadas ao meio basal. Nos experimentos, as concentrações de glicerol e glicerina bruta são expressas em termos de concentração final de glicerol (g/L).

Os meios de cultivo e soluções de glicerol ou glicerina bruta, com pH ajustado em 6,5 pela adição de NaOH 4 M ou HCl 2 M, foram aquecidos à temperatura de ebulição para remoção do O₂ dissolvido. Após o aquecimento os meios de cultivo e soluções foram mantidos sob fluxo de CO₂ até o momento de sua transferência para frascos ou tubos previamente purgados com CO₂. Os frascos ou tubos contendo meios de cultivo e soluções livres de O₂ foram vedados com rolhas de borracha, lacrados com lacres de alumínio e esterilizados em autoclave (121 °C, 15 min). Os meios de cultivo e soluções anaeróbias estéreis foram manipulados com auxílio de seringas e agulhas estéreis.

2.2 Condições de Cultivo

As culturas de *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* EC18 foram reativadas a partir do meio de estocagem (-20 °C) por meio da transferência de alíquotas (0,3 mL) das culturas para frascos (15 mL) contendo 10 mL meio basal adicionado de glicerol ou glicerina bruta (20 g/L) (37 °C, 24 h). Para a realização dos experimentos, alíquotas (0,5 mL) das culturas reativadas foram transferidas para frascos (30 mL)

contendo 20 mL de meio basal adicionado de glicerol ou glicerina bruta (20 g/L) e cultivados (2 cultivos, 37 °C, 8 a 10 h cada) em meio basal adicionado de glicerol ou glicerina bruta (20 g/L). Após este período, as culturas foram centrifugadas (6.000 g/10 min) para remoção do meio de cultivo e as células ressuspensas em meio basal (10 mL).

Os experimentos com diferentes temperaturas, diferentes concentrações de substrato (glicerol ou glicerina bruta) e diferentes concentrações de produtos da fermentação (1,3-propanodiol, acetato, lactato, butirato, etanol) foram realizados em tubos (18 × 150 mm; Bellco Glass Inc., NJ, USA) contendo 15 mL de meio basal adicionado de glicerol ou glicerina bruta (20 g/L – exceto no experimento com diferentes concentrações de substrato). Os tubos foram inoculados com 0,25 mL de células ressuspensas em meio basal e mantidos a 37 °C (exceto no experimento com diferentes temperaturas) durante 24 horas.

Os experimentos de tolerância a diferentes valores de pH foram realizados em cultura contínua com taxa de diluição (D) de 0,1 h⁻¹. Fermentadores (500 mL) contendo 300 mL de meio basal adicionado de glicerol (20 g/L) foram inoculados com 5 mL de células ressuspensas em meio basal e permaneceram em regime de batelada (pré-cultivo) durante 24 horas (37 °C, 150 rpm). Após este período, o fluxo foi ligado, e o pH do meio basal contido no reservatório ajustado por meio da adição de HCl concentrado, sempre que a cultura atingia o estado permanente. O estado permanente foi caracterizado por alterações menores que 5 % na densidade óptica (DO_{600nm}) das alíquotas removidas periodicamente do fermentador. Para manutenção da anaerobiose, o meio de cultivo foi mantido durante todo o experimento sob fluxo de CO₂ livre de oxigênio.

2.3 Procedimentos Analíticos

O crescimento microbiano foi monitorado por meio da determinação da densidade óptica a 600nm em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron, MA, USA) e a velocidade específica de crescimento (μ) determinada a partir da regressão linear dos valores obtidos pelo logaritmo neperiano (ln) da DO_{600nm} durante a fase de crescimento exponencial, onde o valor μ corresponde ao coeficiente

angular da relação do $\ln DO_{600nm}$, pelo tempo expresso na equação de regressão linear. A porcentagem da μ_{max} foi calculada como:

$$\% \mu (h^{-1}) = (1 - \mu_i/\mu_0) \times 100$$

Onde: μ_i é a máxima velocidade específica de crescimento no experimento e μ_0 a máxima velocidade específica de crescimento do tratamento controle. A biomassa foi calculada a partir da relação entre os valores obtidos da DO_{600nm} durante a fase de crescimento exponencial pela massa seca da cultura, sendo 1 unidade de DO_{600nm} equivalente a 0,505 g/L de *C. butyricum* Sb06 e a 0,51 g/L de *K. pneumoniae* EC18.

Amostras (1 mL) das culturas em meio basal contendo glicerol ou glicerina bruta foram centrifugadas (8.000 rpm, 10 minutos) para obtenção do sobrenadante livre de células. Nas amostras em meio basal contendo glicerina bruta o sobrenadante livre de células foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poro de 0,45 μm de diâmetro (Schleicher & Schuell, Alemanha) para remoção de impurezas. Os sobrenadantes livres de células ou filtrados livres de impurezas (20 μL) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Dionex UltiMate 3000 Dual (Dionex, Alemanha) acoplado ao detector de índice de refração (IR) Shodex RI-101 (Showa Denko K.K., Japão) mantido a 40 °C, e coluna Phenomenex Rezex-ROA, 300 x 7,8 mm (Phenomenex, CA, USA) mantida a 40 °C. Como fase móvel foi utilizada solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5 mM com fluxo de 0,5 mL/min.

O rendimento de 1,3-propanodiol ($Y_{PD/Glicerol}$) foi calculado como $Y_{PD/Glicerol} = C_{PD}/(C_{Glicerol-i} - C_{Glicerol-f})$, onde, C_{PD} é a concentração de 1,3-propanodiol produzido (mol), $C_{Glicerol-i}$ é a concentração de glicerol (mol) no início do experimento e $C_{Glicerol-f}$ é a concentração de glicerol (mol) ao final do experimento. A porcentagem de carbono recuperado desconsiderando a produção de CO_2 e a biomassa (C_R) foi calculada como $C_R = \{[(C_{Succ.} * 4) + (C_{Lact.} * 3) + (C_{Glicerol-f} * 3) + (C_{Form.}) + (C_{Acet.} * 2) + (C_{Prop.} * 3) + (C_{PD} * 3) + (C_{BD} * 4) + (C_{EtOH.} * 2) + (C_{But.} * 4)] / (C_{Glicerol-i} * 3)\} * 100$, onde, * indicam sinais de multiplicação, $C_{Succ.}$, $C_{Lact.}$, $C_{Form.}$, $C_{Acet.}$, $C_{Prop.}$, C_{PD} , C_{BD} , $C_{EtOH.}$, $C_{But.}$ indicam as concentrações (mol) de succinato, lactato, formato, acetato, propionato, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, etanol e butirato, respectivamente. $C_{Glicerol-i}$ e $C_{Glicerol-f}$ indicam as concentrações (mol) inicial e final de glicerol.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito da Temperatura de Cultivo sobre o Crescimento

O cultivo de *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 foi realizado nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C em meio basal contendo glicerol ou glicerina bruta (20 g/L, 24 h). A elevação da temperatura de cultivo a partir de 20 até 40 °C resultou em aumento nas velocidades específicas de crescimento máximas (μ_{\max}) para cada temperatura, tanto para *C. butyricum* Sb06 quanto para *K. pneumoniae* Ec18. Por outro lado, o aumento de 40 para 45 °C reduziu consideravelmente a velocidade específica de crescimento das culturas, sendo que, em ambos os casos, praticamente não houve diferença entre o cultivo em glicerol ou glicerina bruta (Figura 3.1). Para *C. butyricum* Sb06 o valor de μ variou de 0,078 (45 °C) a 0,675 h⁻¹ (40 °C) em glicerol e, de 0,075 (45 °C) a 0,678 h⁻¹ (40 °C), em glicerina bruta. Para *K. pneumoniae* Ec18 o valor de μ variou de 0,158 (20 °C) a 0,744 h⁻¹ (40 °C), em glicerol e, de 0,147 (20 °C) a 0,684 h⁻¹ (40 °C).

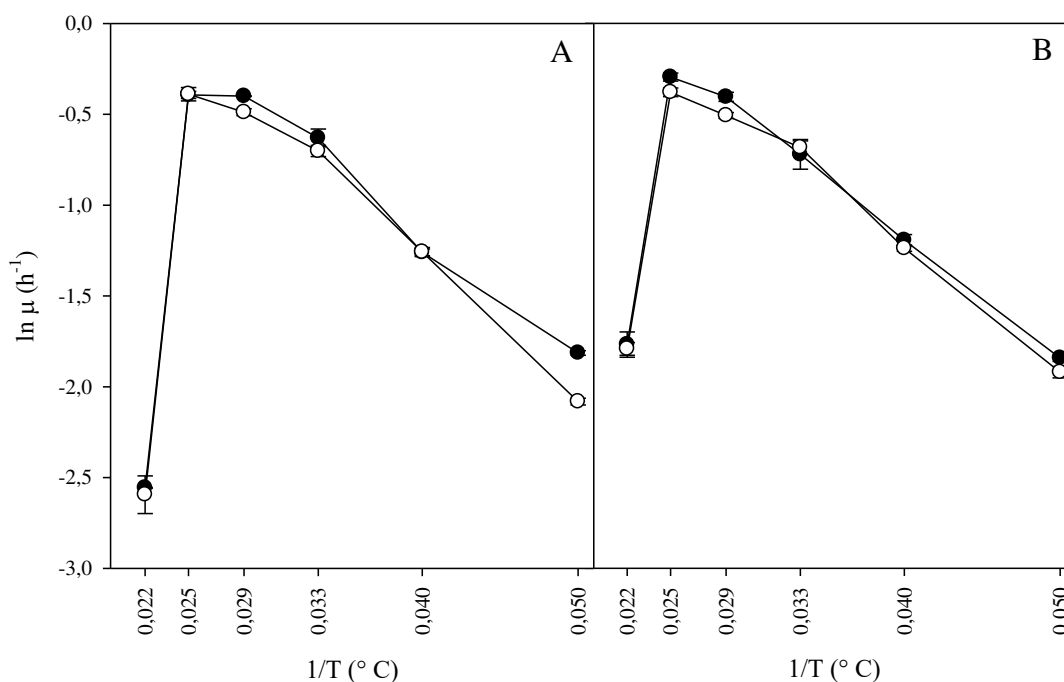


Figura 3.1 Plot de Arrhenius para *C. butyricum* Sb06 (A) e *K. pneumoniae* Ec18 (B) cultivados em meio basal contendo glicerol (●) ou glicerina bruta (○) (20 g/L, 24 h) nas temperaturas de 20 (0,050), 25 (0,040), 30 (0,033), 35 (0,029), 40 (0,025) e 45 °C (0,022). Os resultados representam médias de dois experimentos.

3.2 Efeito do pH Inicial de Cultivo sobre o Crescimento e a Fermentação

C. butyricum Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 foram cultivados em cultura contínua ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm), com meio basal contendo glicerol (20 g/L) e pH inicial 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0 e 4,5. O crescimento de *C. butyricum* Sb06 ocorreu entre os pH iniciais 7,0 e 5,5, com redução de 54 % da biomassa entre o maior e o menor pH inicial. A redução do pH inicial de 5,5 para 5,0 resultou na lavagem do microrganismo do fermentador (Figura 3.2A). A diminuição do pH inicial de cultivo de 7,0 para 5,5 também diminuiu a produção de 1,3-propanodiol, em 49 %, e o rendimento de 0,53 para $0,49 \text{ mol}_{1,3\text{-propanodiol}}/\text{mol}_{\text{glicerol}}$ (Tabela 3.1). *K. pneumoniae* Ec18 apresentou crescimento na faixa de pH inicial entre 7,0 e 5,0, com redução da biomassa de 85 % entre o maior e o menor pH inicial, e lavagem do microrganismo do fermentador em pH inicial de 4,5 (Figura 3.2B). A produção de 1,3-propanodiol foi reduzida em 60 % com a diminuição do pH inicial de 7,0 para 5,0, e o rendimento caiu de 0,41 para $0,38 \text{ mol}_{1,3\text{-propanodiol}}/\text{mol}_{\text{glicerol}}$. Por outro lado, acidificação do meio de cultivo favoreceu a produção de lactato e butirato (Tabela 3.2).

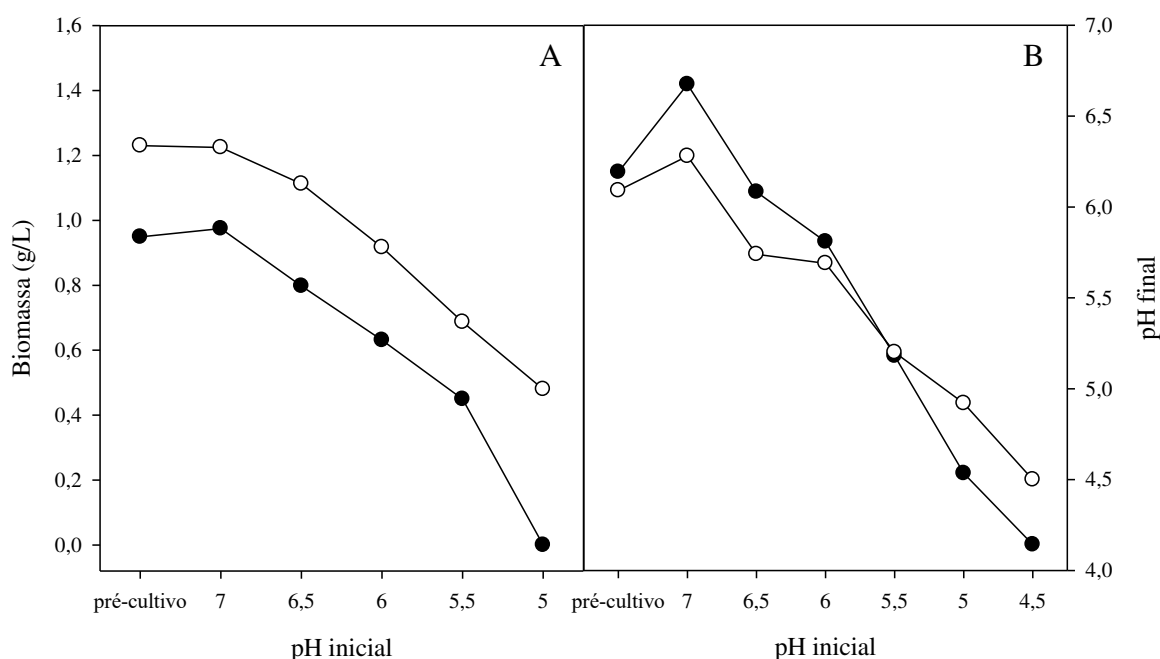


Figura 3.2 Cultivo de *C. butyricum* Sb06 (A) e *K. pneumoniae* Ec18 (B) em meio basal com pH inicial 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,0. A biomassa (●) e o pH final (○) foram determinados a partir da amostra da cultura em estado permanente e o cultivo realizado por cultura contínua ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm) em meio basal contendo glicerol (20 g/L). Os resultados representam os valores absolutos de cada cultivo.

Tabela 3.1 Fermentação de glicerol (20 g/L) por *C. butyricum* Sb06 cultivado em pH inicial 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,0. Os resultados representam os valores absolutos do cultivo realizado por cultura contínua ($D=0,1 \text{ h}^{-1}$, 37 °C, 150 rpm) em meio basal.

Parâmetros	pH inicial					
	Pré-cultivo	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0
Glicerol _C	12,50	11,11	10,20	10,05	6,09	0,74
Lactato	0,74	1,33	1,12	1,09	0,74	0,22
Formato	0,82	0,94	0,68	0,46	0,27	0,01
Acetato	0,78	0,51	0,52	0,38	0,10	0,02
1,3-propanodiol	5,72	4,88	4,40	4,12	2,48	0,02
Butirato	1,98	1,61	1,43	1,28	0,85	0,32
$Y_{PD/Glicerol}$	0,55	0,53	0,52	0,50	0,49	0,03
C_R (%)	94,21	95,95	92,60	85,40	85,82	96,82

As concentrações de glicerol consumido (Glicerol_C) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. $Y_{PD/Glicerol}$: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R : porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

Tabela 3.2 Fermentação de glicerol (20 g/L) por *K. pneumoniae* Ec18 cultivada em pH inicial 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0 e 4,5. Os resultados representam os valores absolutos do cultivo realizado por cultura contínua ($D=0,1 \text{ h}^{-1}$, 37 °C, 150 rpm) em meio basal.

Parâmetros	pH						
	Pré-cultivo	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5
Glicerol _C	16,96	20,52	19,12	18,44	16,47	8,84	0,06
Succinato	0,36	0,45	0,34	0,34	0,19	0,08	n.d.
Lactato	1,18	1,53	2,39	2,87	2,61	1,43	0,02
Formato	1,31	2,60	0,90	0,50	0,25	n.d.	n.d.
Acetato	1,51	1,59	1,01	0,65	0,32	0,03	n.d.
1,3-propanodiol	7,46	7,01	6,52	5,71	5,25	2,80	0,01
2,3-butanodiol	1,71	0,91	1,34	1,45	2,07	1,32	n.d.
Etanol	0,66	3,29	2,77	2,37	1,42	0,83	0,02
$Y_{PD/Glicerol}$	0,53	0,41	0,41	0,37	0,39	0,38	0,21
C_R (%)	95,77	94,98	93,22	88,46	87,63	89,06	94,66

As concentrações de glicerol consumido (Glicerol_C) e dos demais produtos da fermentação estão expressos em g/L. n.d.: produtos não detectados ou valores não determinados. $Y_{PD/Glicerol}$: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R : porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

3.3 Efeito da Concentração Inicial de Glicerol ou Glicerina Bruta sobre o Crescimento e a Fermentação

C. butyricum Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 foram cultivados (37 °C, 24 h) em meio basal contendo glicerol ou glicerina bruta nas concentrações iniciais de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 e 200 g/L. Nos tratamentos com glicerol entre 0 e 0,01 g/L e, com glicerina bruta entre 0 e 0,05 g/L não houve crescimento de *C. butyricum* Sb06. O aumento das concentrações iniciais de glicerol para até 10 g/L

e, de glicerina bruta para até 5 g/L resultou em aumentos nos valores de μ de *C. butyricum* Sb06 para até 0,782 e 0,837 h⁻¹, respectivamente. Novos aumentos das concentrações iniciais de glicerol e de glicerina bruta para valores até 120 g/L reduziram a velocidade específica de crescimento em 88 e 92 %, respectivamente, com inibição total do crescimento em concentrações a partir de 160 g/L de glicerol ou glicerina bruta (Figura 3.3).

O consumo de glicerol e glicerina bruta por *C. butyricum* Sb06 foi máximo nas concentrações iniciais de 20 g/L do substrato, atingindo 15,51 e 16,96 g/L de glicerol ou glicerina bruta, respectivamente. O 1,3-propanodiol foi o principal produto da fermentação dos substratos, com rendimento máximo de 0,58 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}, nas concentrações de 5 g/L de glicerol e glicerina bruta. Em concentrações iniciais entre 1 e 80 g/L de glicerol ou glicerina bruta o rendimento de 1,3-propanodiol permaneceu estável, em torno de 0,55 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}. Diferentemente dos demais produtos da fermentação, produzidos em todas as concentrações de substrato nas quais houve crescimento, o lactato foi produzido somente em concentrações de glicerol e glicerina bruta a partir de 5 e 1 g/L, respectivamente (Tabela 3.3).

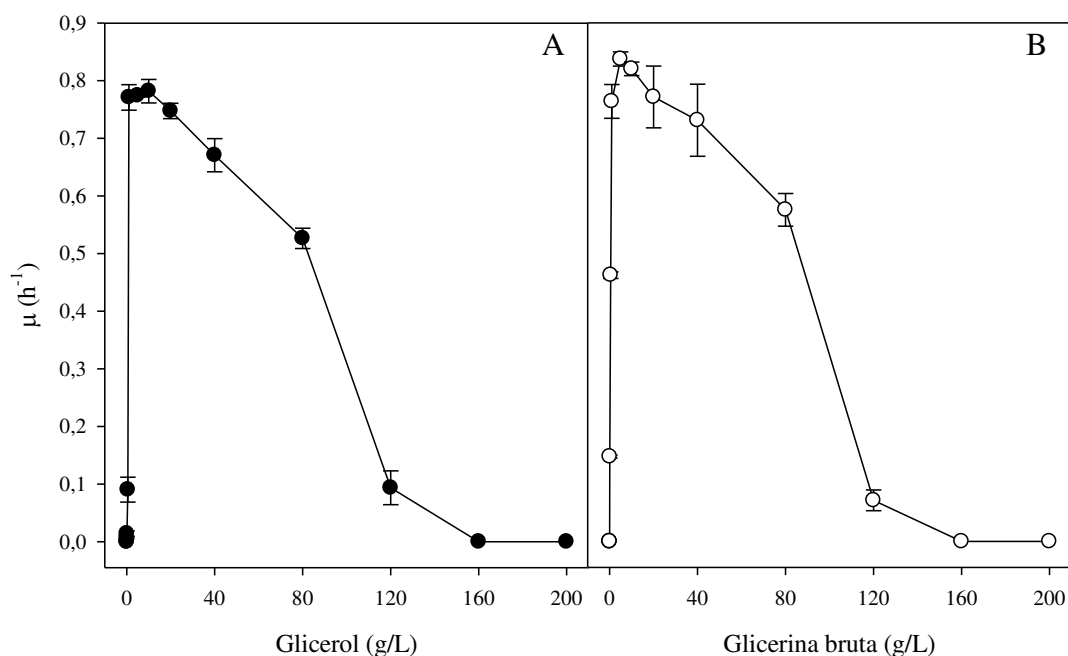


Figura 3.3 Crescimento de *C. butyricum* Sb06 cultivado em meio basal (37 °C, 24 h) contendo glicerol (A) ou glicerina bruta (B) nas concentrações iniciais de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 e 200 g/L. Os resultados representam médias de dois experimentos.

Tabela 3.3 Fermentação de glicerol ou glicerina bruta nas concentrações iniciais de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 e 200 g/L, por *C. butyricum* Sb06 cultivado (37 °C, 24 h) em meio basal. Os resultados representam médias de dois experimentos.

Substrato	g/L	Parâmetros (g/L)								C _R (%)	
		Glicerol _C	Lactato	Formato	Acetato	1,3-PD	Butirato	<i>Y</i> _{PD/Glicerol}	Biomassa		
Glicerol	0	0,00 ± 0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	0,01	0,01 ± 0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	0,05	0,05 ± 0,00	n.d.	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,29 ± 0,01	<0,01 ± 0,00	>100
	0,1	0,11 ± 0,01	n.d.	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,24 ± 0,02	<0,01 ± 0,00	89,26
	0,5	0,50 ± 0,01	n.d.	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,46 ± 0,00	<0,01 ± 0,00	75,82
	1	1,21 ± 0,01	n.d.	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,54 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,54 ± 0,00	0,59 ± 0,08	77,88
	5	5,45 ± 0,14	0,01 ± 0,00	0,26 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,33 ± 0,02	2,60 ± 0,05	0,53 ± 0,04	0,58 ± 0,03	1,07 ± 0,03	80,91
	10	10,69 ± 0,18	0,03 ± 0,00	0,93 ± 0,06	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01	5,05 ± 0,05	1,63 ± 0,01	0,57 ± 0,00	0,91 ± 0,02	87,90
	20	15,51 ± 0,69	0,49 ± 0,06	1,47 ± 0,06	0,45 ± 0,20	0,45 ± 0,20	7,08 ± 0,17	2,24 ± 0,32	0,55 ± 0,01	1,39 ± 0,07	91,39
	40	14,92 ± 0,88	0,88 ± 0,02	1,66 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01	6,80 ± 0,26	1,96 ± 0,02	0,55 ± 0,05	1,43 ± 0,15	96,18
	80	14,22 ± 0,39	0,31 ± 0,02	1,20 ± 0,06	0,51 ± 0,03	0,51 ± 0,03	6,52 ± 0,23	1,72 ± 0,17	0,56 ± 0,03	1,35 ± 0,18	97,15
	120	6,79 ± 0,54	0,03 ± 0,00	0,60 ± 0,01	0,14 ± 0,14	0,14 ± 0,14	2,94 ± 0,18	0,44 ± 0,01	0,53 ± 0,09	0,49 ± 0,02	98,31
	160	1,31 ± 0,45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	200	1,78 ± 0,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glicerina Bruta	0	0,00 ± 0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	0,01	0,01 ± 0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	0,05	0,05 ± 0,00	n.d.	0,01 ± 0,00	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,30 ± 0,00	<0,01 ± 0,00	88,22
	0,1	0,11 ± 0,00	n.d.	0,01 ± 0,00	n.d.	n.d.	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,48 ± 0,05	0,01 ± 0,00	88,82
	0,5	0,50 ± 0,01	n.d.	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,49 ± 0,00	0,08 ± 0,07	81,76
	1	1,10 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,48 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,53 ± 0,03	0,15 ± 0,01	79,22
	5	5,54 ± 0,14	0,01 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,35 ± 0,03	0,35 ± 0,03	2,66 ± 0,18	0,55 ± 0,00	0,58 ± 0,02	0,50 ± 0,03	83,15
	10	11,10 ± 0,32	n.d.	0,98 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,37 ± 0,03	5,14 ± 0,23	1,65 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,94 ± 0,07	86,86
	20	16,96 ± 1,07	1,02 ± 0,10	1,61 ± 0,13	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,01	7,72 ± 0,15	2,72 ± 0,14	0,55 ± 0,02	1,40 ± 0,03	94,87
	40	12,68 ± 0,64	1,11 ± 0,54	1,82 ± 0,22	0,41 ± 0,02	0,41 ± 0,02	5,70 ± 0,11	1,61 ± 0,14	0,55 ± 0,04	1,30 ± 0,05	98,77
	80	13,47 ± 0,27	0,45 ± 0,05	1,62 ± 0,07	0,65 ± 0,04	0,65 ± 0,04	5,69 ± 0,18	2,48 ± 0,27	0,51 ± 0,01	1,26 ± 0,25	99,62
	120	2,21 ± 0,20	0,08 ± 0,03	n.d.	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,02 ± 0,01	99,54
	160	1,74 ± 0,41	0,08 ± 0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	200	1,82 ± 0,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Glicerol_C: glicerol consumido. n.d.: produtos não detectados ou valores não determinados. *Y*_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

Para *K. pneumoniae* Ec18 nenhuma concentração inicial de substrato foi impeditiva ao crescimento, o qual ocorreu inclusive nos tratamentos controles sem adição de glicerol ou glicerina bruta. A adição dos substratos até 10 g/L aumentou os valores de μ de *K. pneumoniae* Ec18 para até 0,806 e 0,805 h⁻¹, em glicerol e glicerina bruta, respectivamente. Aumentos nas concentrações dos substratos para até 200 g/L resultaram em reduções da velocidade específica de crescimento em 78 e 97 % em relação ao cultivo na concentração de 10 g/L de glicerol e glicerina bruta, respectivamente (Figura 3.4).

O consumo máximo de glicerol ou glicerina bruta por *K. pneumoniae* Ec18 foi de 20,03 e 18,63 g/L nas concentrações iniciais de 20 g/L dos substratos, respectivamente. O 1,3-propanodiol foi o principal produto da fermentação, com rendimento máximo de 0,52 e 0,53 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}, nas concentrações de 10 g/L de glicerol e glicerina bruta, respectivamente. Em concentrações iniciais de glicerol entre 5 e 200 g/L e, de glicerina bruta entre 5 e 120 g/L o rendimento de 1,3-propanodiol manteve-se em torno de 0,50 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}. A formação de 1,3-propanodiol não foi observada em concentrações iniciais de glicerol ou glicerina bruta abaixo de 0,05 g/L, enquanto o lactato e o 2,3-butanodiol não foram detectados em concentrações iniciais de substrato inferiores a 5 g/L (Tabela 3.4).

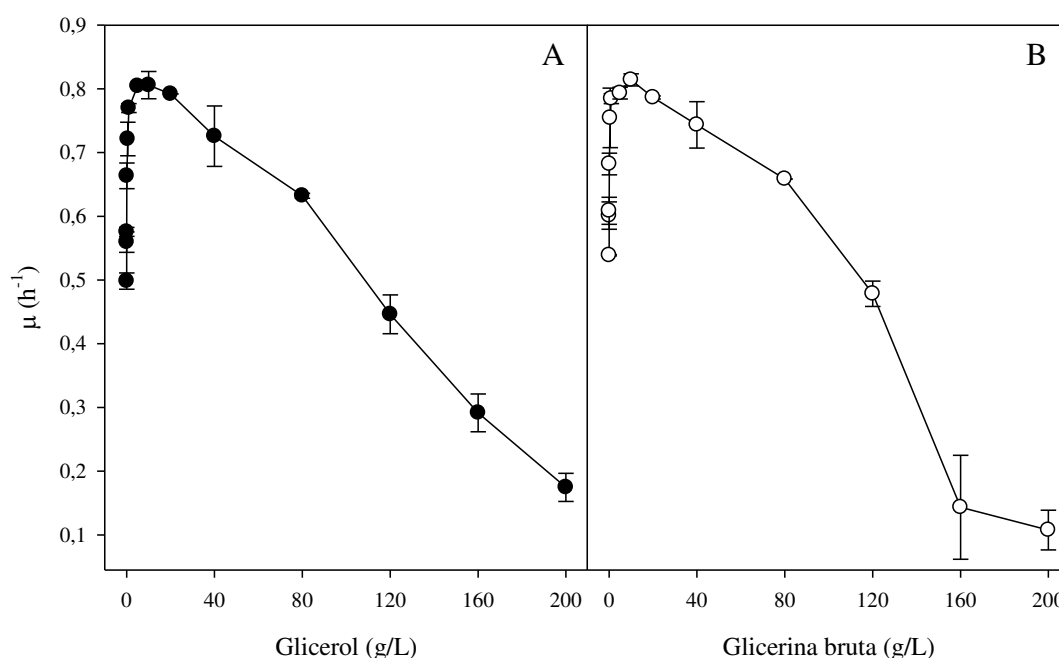


Figura 3.4 Crescimento de *K. pneumoniae* Ec18 cultivada em meio basal (37 °C, 24 h) contendo glicerol (A) ou glicerina bruta (B) nas concentrações iniciais de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 e 200 g/L. Os resultados representam médias de dois experimentos.

Tabela 3.4 Fermentação de glicerol ou glicerina bruta nas concentrações iniciais de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 e 200 g/L, por *K. pneumoniae* Ec18 cultivada (37 °C, 24 h) em meio basal. Os resultados representam médias de dois experimentos.

Substrato	g/L	Parâmetros (g/L)										C _R (%)
		Glicerol _C	Succinato	Lactato	Formato	Acetato	1,3-PD	2,3-BD	Etanol	Y _{PD/Glicerol}	Biomassa	
Glicerol	0	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,08 ± 0,01	>100
	0,01	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	0,13 ± 0,01	0,20 ± 0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,09 ± 0,01	>100
	0,05	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,01	n.d.	n.d.	0,01 ± 0,00	n.d.	0,09 ± 0,00	>100
	0,1	0,14 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,03 ± 0,00	n.d.	0,01 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,10 ± 0,02	>100
	0,5	0,54 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	0,20 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,18 ± 0,02	n.d.	0,03 ± 0,00	0,40 ± 0,04	0,17 ± 0,01	>100
	1	1,21 ± 0,06	0,03 ± 0,00	n.d.	0,26 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,42 ± 0,02	n.d.	0,10 ± 0,01	0,42 ± 0,04	0,31 ± 0,02	93,97
	5	5,43 ± 0,24	0,09 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,74 ± 0,05	0,87 ± 0,01	2,34 ± 0,08	0,04 ± 0,05	0,23 ± 0,00	0,52 ± 0,01	0,74 ± 0,02	86,81
	10	11,24 ± 0,52	0,28 ± 0,01	0,33 ± 0,05	1,33 ± 0,10	1,49 ± 0,06	4,84 ± 0,28	0,52 ± 0,04	0,50 ± 0,02	0,52 ± 0,01	1,10 ± 0,10	91,49
	20	20,03 ± 0,86	0,60 ± 0,07	1,41 ± 0,09	1,46 ± 0,04	0,96 ± 0,04	8,29 ± 0,70	2,74 ± 0,22	1,30 ± 0,07	0,50 ± 0,02	1,23 ± 0,08	97,61
	40	18,76 ± 0,88	0,51 ± 0,01	1,67 ± 0,12	1,93 ± 0,05	1,28 ± 0,07	7,94 ± 0,54	1,96 ± 0,22	0,45 ± 0,08	0,51 ± 0,01	1,00 ± 0,23	97,42
	80	10,07 ± 0,37	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,01	1,83 ± 0,06	0,93 ± 0,08	4,18 ± 0,31	0,40 ± 0,04	0,06 ± 0,01	0,50 ± 0,06	0,61 ± 0,06	97,58
	120	7,84 ± 0,67	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01	1,31 ± 0,03	0,58 ± 0,04	3,29 ± 0,05	0,18 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,51 ± 0,05	0,40 ± 0,13	98,45
	160	6,95 ± 0,08	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00	1,04 ± 0,01	0,62 ± 0,02	2,90 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,51 ± 0,00	0,21 ± 0,01	98,88
200	5,76 ± 0,67	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,89 ± 0,02	0,52 ± 0,08	2,27 ± 0,06	n.d.	0,02 ± 0,00	0,48 ± 0,04	0,14 ± 0,01	99,10	
Glicerina Bruta	0	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	0,10 ± 0,02	0,16 ± 0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,06 ± 0,01	>100
	0,01	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,00	n.d.	0,16 ± 0,00	0,23 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,07 ± 0,00	>100
	0,05	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00	n.d.	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,01 ± 0,00	n.d.	n.d.	0,16 ± 0,01	0,09 ± 0,01	>100
	0,1	0,11 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	0,11 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,03 ± 0,00	n.d.	n.d.	0,38 ± 0,04	0,07 ± 0,00	>100
	0,5	0,55 ± 0,02	0,02 ± 0,00	n.d.	0,14 ± 0,05	0,18 ± 0,00	0,19 ± 0,01	n.d.	0,03 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,15 ± 0,00	98,72
	1	1,22 ± 0,03	0,02 ± 0,00	n.d.	0,26 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,46 ± 0,02	0,22 ± 0,00	97,84
	5	5,48 ± 0,17	0,03 ± 0,04	0,05 ± 0,01	0,70 ± 0,09	0,84 ± 0,09	2,32 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,51 ± 0,02	0,67 ± 0,04	84,31
	10	10,89 ± 0,10	0,33 ± 0,01	0,35 ± 0,07	1,25 ± 0,03	1,33 ± 0,01	4,81 ± 0,10	0,76 ± 0,04	0,51 ± 0,04	0,53 ± 0,02	0,89 ± 0,08	95,97
	20	18,63 ± 0,02	0,41 ± 0,04	1,41 ± 0,03	1,64 ± 0,06	1,03 ± 0,02	7,60 ± 0,28	2,61 ± 0,25	1,12 ± 0,07	0,49 ± 0,02	1,12 ± 0,17	98,39
	40	15,50 ± 1,64	0,51 ± 0,08	1,25 ± 0,04	2,36 ± 0,03	1,37 ± 0,13	6,31 ± 0,33	1,46 ± 0,08	0,22 ± 0,03	0,49 ± 0,03	0,76 ± 0,15	98,32
	80	14,50 ± 1,02	0,54 ± 0,02	0,40 ± 0,04	1,73 ± 0,01	1,17 ± 0,02	5,76 ± 0,09	1,19 ± 0,03	0,04 ± 0,09	0,48 ± 0,04	0,60 ± 0,04	97,26
	120	10,78 ± 1,85	0,19 ± 0,13	0,11 ± 0,03	1,67 ± 0,02	0,88 ± 0,05	4,24 ± 0,07	0,25 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,48 ± 0,09	0,41 ± 0,07	97,93
	160	2,21 ± 0,08	0,26 ± 0,06	0,09 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,16 ± 0,01	n.d.	0,25 ± 0,12	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	99,54
200	1,59 ± 0,02	0,52 ± 0,06	0,10 ± 0,01	n.d.	0,02 ± 0,00	n.d.	n.d.	0,04 ± 0,01	n.d.	<0,01 ± 0,00	99,59	

Glicerol_C: glicerol consumido. n.d.: produtos não detectados ou valores não determinados. Y_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

3.4 Efeito dos Produtos da Fermentação do Glicerol ou Glicerina Bruta sobre o Crescimento e a Fermentação

C. butyricum Sb06 foi cultivado (37 °C, 24 h) em meio basal contendo glicerol ou glicerina bruta (20 g/L) e diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol (0, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 g/L), acetato (0, 2, 4, 8, 12, 16 e 25 g/L) ou butirato (0, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 30 g/L). A adição de 1,3-propanodiol ao meio de cultivo em concentrações a partir de 40 g/L inibiu totalmente o crescimento de *C. butyricum* Sb06, tanto em glicerol como em glicerina bruta. Por outro lado, concentrações iniciais de acetato de 4 e 8 g/L aumentaram a velocidade específica de crescimento de *C. butyricum* Sb06 em 10 e 9 %, em meios contendo glicerol ou glicerina bruta, respectivamente. Concentrações iniciais de acetato a partir desses valores até 25 g/L reduziram a velocidade específica de crescimento em até 61 e 59 %, em glicerol e glicerina bruta, respectivamente. Para o butirato, concentrações iniciais de 30 g/L, em meio contendo glicerol ou glicerina bruta, resultaram em reduções de 85 e 90 % no valor de μ , respectivamente (Figura 3.5).

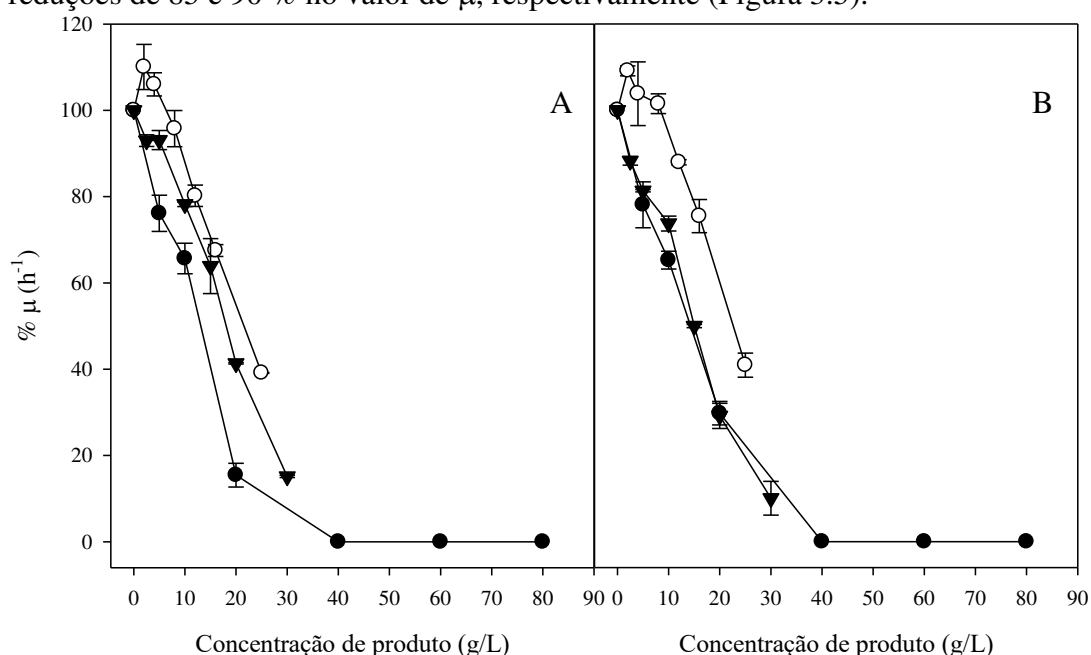


Figura 3.5 Efeito de 1,3-propanodiol (●), acetato (○) e butirato (▼) sobre a μ_{\max} de *C. butyricum* Sb06 cultivado em meio basal (37 °C, 24 h) contendo glicerol (A) ou glicerina bruta (B) (20 g/L). Os resultados representam médias de dois experimentos com diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol (0, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 g/L), acetato (0, 2, 4, 8, 12, 16 e 25 g/L) ou butirato (0, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 30 g/L).

Apesar de praticamente não alterar o consumo de glicerol ou glicerina bruta por *C. butyricum* Sb06, concentrações iniciais de até 10 g/L de 1,3-propanodiol reduziram a produção deste produto em até 32 e 9 %, respectivamente. Com o aumento da concentração inicial de 1,3-propanodiol para 20 g/L, a produção deste diol caiu 89 % em meio contendo glicerol e 70 % em glicerina bruta. O rendimento de 1,3-propanodiol também foi reduzido na presença de 20 g/L de 1,3-propanodiol, em 61 e 55 % nos meios contendo glicerol ou glicerina bruta, respectivamente. Em relação aos demais produtos da fermentação, concentrações iniciais de até 10 g/L de 1,3-propanodiol resultaram em aumento da produção de acetato, tanto em meio contendo glicerol como em meio contendo glicerina bruta (Tabelas 3.5 e 3.6).

A adição de acetato ao meio de cultivo de *C. butyricum* Sb06, em concentrações iniciais de até 25 g/L, reduziu o consumo de glicerol em até 59 % na presença de glicerol e 75 % em glicerina bruta. Além disso, parte do acetato adicionado foi consumido por *C. butyricum* Sb06, em todas as concentrações avaliadas. Em relação ao 1,3-propanodiol, a concentração inicial de acetato de 25 g/L reduziu em 81 e 90 %, em glicerol e glicerina bruta, respectivamente, a produção do diol. Para o rendimento de 1,3-propanodiol em meio contendo glicerol, a redução do foi de 53 % entre as concentrações de 0 e 16 g/L de acetato, enquanto em meio contendo glicerina bruta, a redução do rendimento foi de 66 % entre as mesmas concentrações de acetato. Produtos como formato e butirato tiveram sua produção aumentada, em até 73 e 164 % em meio contendo glicerol e, em até 110 e 216 % em meio contendo glicerina bruta, respectivamente (Tabelas 3.5 e 3.6).

A adição de butirato ao meio de cultivo, em concentrações de até 30 g/L, reduziu o consumo de glicerol e glicerina bruta por *C. butyricum* Sb06 em até 83 e 88 %, e a produção de 1,3-propanodiol em até 93 e 97 %, respectivamente. O rendimento de 1,3-propanodiol praticamente não foi afetado pela presença de até 20 g/L de butirato no meio de cultivo, mantendo-se entre 0,57 e 0,63 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} nos cultivos em glicerol e glicerina bruta. Além disso, as concentrações iniciais de butirato de até 20 g/L aumentaram os rendimentos de 1,3-propanodiol em relação aos tratamentos controles com adição de 1,3-propanodiol, acetato e do próprio butirato. A adição de butirato também estimulou a produção de acetato, quase triplicando sua produção nos meios contendo glicerol ou glicerina bruta (Tabelas 3.5 e 3.6).

Tabela 3.5 Efeito de diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol, acetato ou butirato sobre a fermentação do glicerol por *C. butyricum* Sb06 cultivado (37 °C, 24 h) em meio basal adicionado de glicerol (20 g/L). Os resultados representam médias de dois experimentos.

Produtos Adicionados	g/L	Parâmetros (g/L)								C _R (%)
		Glicerol _C	Lactato	Formato	Acetato	1,3-PD	Butirato	$Y_{PD/Glicerol}$	Biomassa	
1,3-propanodiol	0	15,39 ± 0,59	0,61 ± 0,30	1,27 ± 0,04	0,40 ± 0,11	7,24 ± 0,24	2,36 ± 0,26	0,57 ± 0,00	1,52 ± 0,17	92,81
	5	15,67 ± 0,09	0,25 ± 0,02	1,26 ± 0,03	0,59 ± 0,10	6,65 ± 0,12	1,98 ± 0,09	0,51 ± 0,01	1,44 ± 0,05	87,97
	10	15,80 ± 3,49	0,10 ± 0,03	0,48 ± 0,68	0,62 ± 0,08	4,93 ± 0,43	1,50 ± 0,16	0,39 ± 0,12	1,52 ± 0,14	79,65
	20	4,32 ± 0,14	n.d.	n.d.	n.d.	0,80 ± 0,23	0,02 ± 0,03	0,22 ± 0,06	0,04 ± 0,03	92,55
	40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetato	0	14,87 ± 1,22	0,88 ± 0,30	1,28 ± 0,04	0,32 ± 0,03	7,18 ± 0,47	2,07 ± 0,26	0,58 ± 0,01	1,20 ± 0,14	93,91
	2	11,05 ± 0,45	0,89 ± 0,27	1,80 ± 0,02	-0,97 ± 0,22	4,14 ± 0,62	2,96 ± 0,26	0,46 ± 0,09	1,29 ± 0,02	96,57
	4	10,18 ± 0,16	0,86 ± 0,21	1,99 ± 0,10	-1,24 ± 0,22	3,34 ± 0,11	3,35 ± 0,17	0,40 ± 0,01	1,19 ± 0,11	97,84
	8	11,93 ± 0,63	1,56 ± 0,12	2,17 ± 0,18	-3,12 ± 0,29	2,86 ± 0,06	5,46 ± 0,28	0,29 ± 0,01	1,04 ± 0,10	96,52
	12	9,75 ± 0,62	0,84 ± 0,02	2,07 ± 0,03	-3,52 ± 0,29	2,25 ± 0,08	5,37 ± 0,29	0,28 ± 0,01	0,86 ± 0,08	97,27
	16	9,61 ± 0,52	0,68 ± 0,27	2,16 ± 0,13	-3,26 ± 0,28	1,99 ± 0,27	5,31 ± 0,52	0,25 ± 0,02	0,59 ± 0,10	97,82
	25	6,09 ± 0,54	0,22 ± 0,03	2,21 ± 0,18	-2,42 ± 0,21	1,37 ± 0,11	3,39 ± 0,17	0,27 ± 0,01	0,20 ± 0,02	98,99
Butirato	0	13,09 ± 1,98	0,53 ± 0,00	1,21 ± 0,03	0,34 ± 0,11	6,36 ± 1,40	2,04 ± 0,33	0,58 ± 0,04	1,38 ± 0,10	95,87
	2,5	14,04 ± 0,10	1,08 ± 0,11	1,15 ± 0,04	0,74 ± 0,05	7,07 ± 0,50	1,70 ± 0,44	0,61 ± 0,04	1,32 ± 0,06	98,06
	5	14,72 ± 1,65	0,97 ± 0,10	1,09 ± 0,03	0,88 ± 0,02	7,39 ± 0,04	1,81 ± 0,04	0,61 ± 0,07	1,36 ± 0,06	97,70
	10	11,26 ± 0,83	0,53 ± 0,07	0,87 ± 0,14	0,86 ± 0,04	5,79 ± 0,44	0,75 ± 0,06	0,63 ± 0,09	1,22 ± 0,06	96,48
	15	10,27 ± 0,76	0,25 ± 0,09	0,72 ± 0,05	0,85 ± 0,04	5,10 ± 0,22	0,32 ± 0,12	0,60 ± 0,02	1,07 ± 0,03	94,94
	20	7,97 ± 0,83	0,06 ± 0,03	n.d.	0,79 ± 0,04	3,91 ± 0,11	0,60 ± 0,07	0,60 ± 0,08	0,75 ± 0,11	96,80
	30	2,25 ± 0,73	n.d.	n.d.	0,11 ± 0,01	0,47 ± 0,42	0,29 ± 0,08	0,23 ± 0,05	0,13 ± 0,03	98,11

Glicerol_C: glicerol consumido. n.d.: produtos não detectados ou valores não determinados. $Y_{PD/Glicerol}$: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

Tabela 3.6 Efeito de diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol, acetato ou butirato sobre a fermentação de glicerina bruta por *C. butyricum* Sb06 cultivado (37 °C, 24 h) em meio basal adicionado de glicerol (20 g/L). Os resultados representam médias de dois experimentos.

Produtos Adicionados	g/L	Parâmetros (g/L)								C _R (%)
		Glicerol _C	Lactato	Formato	Acetato	1,3-PD	Butirato	<i>Y</i> _{PD/Glicerol}	Biomassa	
1,3-propanodiol	0	15,08 ± 0,12	0,54 ± 0,00	1,29 ± 0,06	0,42 ± 0,03	7,01 ± 0,45	2,24 ± 0,21	0,56 ± 0,03	1,45 ± 0,09	92,37
	5	16,67 ± 0,06	0,19 ± 0,03	1,05 ± 0,04	0,56 ± 0,07	7,10 ± 0,67	2,06 ± 0,15	0,52 ± 0,05	1,28 ± 0,01	86,07
	10	16,50 ± 0,79	0,06 ± 0,03	0,76 ± 0,04	0,58 ± 0,02	6,37 ± 0,86	1,64 ± 0,23	0,47 ± 0,04	1,38 ± 0,09	81,34
	20	8,83 ± 1,34	0,05 ± 0,02	n.d.	0,31 ± 0,03	2,07 ± 0,24	0,52 ± 0,06	0,25 ± 0,10	0,76 ± 0,08	88,66
	40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetato	0	16,16 ± 0,47	0,15 ± 0,02	1,36 ± 0,01	0,52 ± 0,07	8,10 ± 0,60	2,62 ± 0,18	0,61 ± 0,03	1,11 ± 0,04	95,17
	2	14,00 ± 0,32	0,52 ± 0,04	2,43 ± 0,21	-1,23 ± 0,17	6,61 ± 0,73	5,03 ± 0,71	0,50 ± 0,07	1,28 ± 0,02	95,59
	4	14,30 ± 1,15	0,79 ± 0,06	2,55 ± 0,01	-1,88 ± 0,40	4,99 ± 0,63	5,66 ± 0,60	0,37 ± 0,02	1,20 ± 0,02	92,91
	8	12,41 ± 2,06	1,06 ± 0,23	2,85 ± 0,24	-3,36 ± 0,68	4,70 ± 1,09	8,28 ± 0,56	0,31 ± 0,04	1,12 ± 0,08	94,62
	12	10,17 ± 1,24	0,95 ± 0,39	2,52 ± 0,21	-4,03 ± 0,98	2,93 ± 0,34	7,38 ± 0,85	0,23 ± 0,01	0,97 ± 0,05	91,56
	16	10,47 ± 0,09	0,74 ± 0,15	2,60 ± 0,13	-1,98 ± 0,89	2,54 ± 0,24	6,93 ± 0,36	0,20 ± 0,02	0,55 ± 0,03	94,31
	25	4,29 ± 0,76	0,13 ± 0,09	0,70 ± 0,09	-0,57 ± 0,06	0,78 ± 0,40	1,59 ± 1,32	0,21 ± 0,03	0,23 ± 0,06	97,82
Butirato	0	13,75 ± 1,04	1,11 ± 0,85	1,12 ± 0,33	0,35 ± 0,16	6,86 ± 0,74	2,05 ± 0,11	0,60 ± 0,02	1,38 ± 0,04	98,38
	2,5	12,61 ± 0,64	0,65 ± 0,06	1,14 ± 0,05	0,83 ± 0,03	6,59 ± 0,72	1,43 ± 0,60	0,63 ± 0,10	1,31 ± 0,02	98,59
	5	11,65 ± 1,16	0,30 ± 0,06	0,93 ± 0,05	0,82 ± 0,07	6,00 ± 0,15	0,98 ± 0,45	0,63 ± 0,08	1,13 ± 0,07	95,46
	10	10,76 ± 1,49	0,40 ± 0,06	0,88 ± 0,10	0,95 ± 0,05	5,38 ± 0,38	1,03 ± 0,34	0,62 ± 0,10	0,97 ± 0,08	97,82
	15	9,70 ± 0,40	0,11 ± 0,01	0,48 ± 0,08	0,82 ± 0,16	4,60 ± 1,28	0,68 ± 0,23	0,57 ± 0,08	0,77 ± 0,05	95,82
	20	4,42 ± 0,49	0,02 ± 0,01	n.d.	0,43 ± 0,01	2,11 ± 0,03	0,60 ± 0,09	0,58 ± 0,07	0,36 ± 0,07	98,85
	30	1,64 ± 0,05	n.d.	n.d.	0,03 ± 0,01	0,19 ± 0,09	0,80 ± 0,17	0,14 ± 0,05	0,05 ± 0,00	99,45

Glicerol_C: glicerol consumido. n.d.: produtos não detectados ou valores não determinados. *Y*_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

K. pneumoniae Ec18 foi cultivada (37 °C, 24 h) em meio basal contendo glicerol ou glicerina bruta (20 g/L) e diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol (0, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 g/L), acetato (0, 2, 4, 8, 12, 16 e 25 g/L), lactato (0, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 30 g/L) ou etanol (0, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 30 g/L). O crescimento de *K. pneumoniae* Ec18 não foi totalmente inibido em nenhuma das concentrações de 1,3-propanodiol testadas, tanto em glicerol como em glicerina bruta. Nesses substratos, com concentração inicial de 1,3-propanodiol de 80 g/L, a inibição da velocidade específica de crescimento foi de 72 e 78 %, respectivamente. Para o cultivo em diferentes concentrações iniciais de acetato, a inibição do μ foi de 87 e 86 % em meio contendo glicerol e glicerina bruta, respectivamente (Figura 3.6). Efeitos inibitórios das concentrações iniciais de lactato e etanol sobre o μ de *K. pneumoniae* Ec18 foram observadas apenas em concentrações superiores a 15 g/L, tanto em meio contendo glicerol como glicerina bruta. Nas maiores concentrações de lactato e etanol, a inibição de μ alcançou 25 e 58 % em meio contendo glicerol e, 33 e 61 % em glicerina bruta, respectivamente (Figura 3.6).

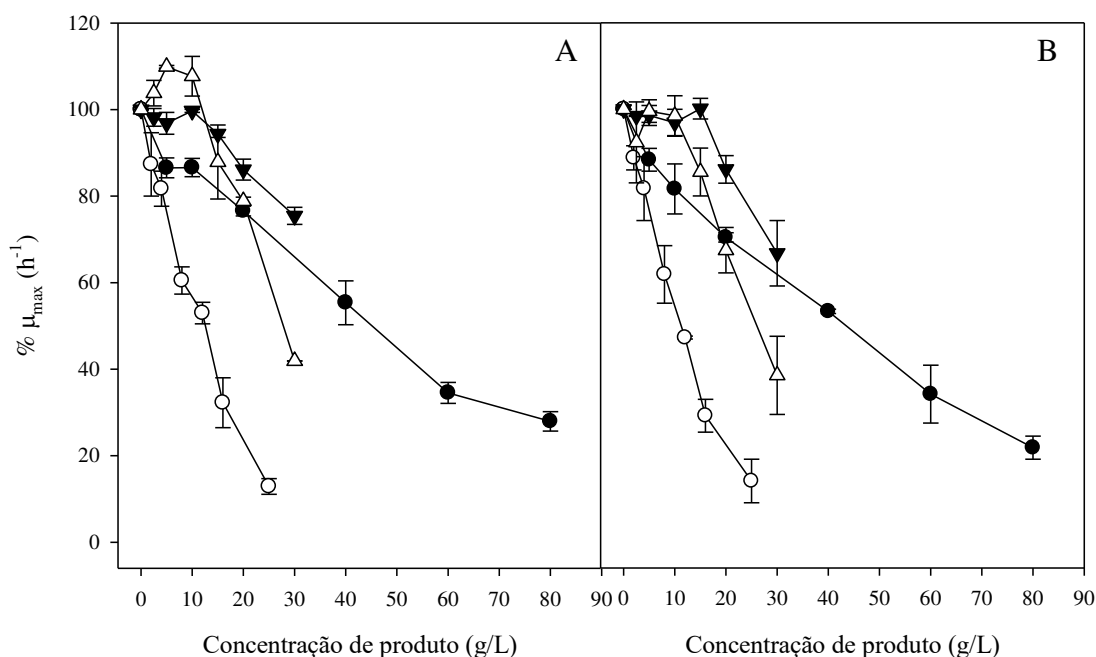


Figura 3.6 Efeito de 1,3-propanodiol (●), acetato (○), lactato (▼) e etanol (Δ) sobre a μ_{max} de *K. pneumoniae* Ec18 cultivada em meio basal (37 °C, 24 h) adicionado de glicerol (A) ou glicerina bruta (B) (20 g/L). Os resultados representam médias de dois experimentos com diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol (0, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 g/L), acetato (0, 2, 4, 8, 12, 16 e 25 g/L), lactato (0, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 30 g/L) ou etanol (0, 2,5, 5, 10, 15, 20 e 30 g/L).

A adição de 1,3-propanodiol ao meio de cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 em concentrações de até 40 g/L não afetaram o consumo de glicerol ou glicerina bruta, com consumo de mais de 90 % do substrato disponível. Contudo, mesmo na faixa de concentração inicial de 0 a 40 g/L de 1,3-propanodiol, tanto a produção quanto o rendimento de 1,3-propanodiol foram reduzidos, em 52 e 33 % em meio contendo glicerol e, em 50 e 46 % em glicerina bruta, respectivamente. O cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 em meio contendo 1,3-propanodiol resultou também em aumento da produção de lactato e etanol, de até 61 e 122 % em glicerol e, de até 114 e 78 % em glicerina bruta. Diferentemente dos demais produtos o 2,3-butanodiol apresentou comportamento distinto, apresentando aumento na produção em meio contendo glicerol e diminuição em meio contendo glicerina bruta, porém, em ambos os casos este produto da fermentação deixou de ser detectado nos tratamentos com adição de 1,3-propanodiol a partir de 40 g/L (Tabelas 3.7 e 3.8).

O cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 em meio com concentração inicial de acetato de até 12 g/L não afetou o consumo de glicerol ou glicerina bruta, os quais foram reduzidos em 91 e 89 %, respectivamente, em concentração inicial de acetato de 25 g/L. Nesta mesma concentração inicial de acetato, a produção de 1,3-propanodiol foi inibida em 99 %, tanto em glicerol como em glicerina bruta, e o rendimento inibido em 93 e 91 %, respectivamente. Nas concentrações iniciais a partir de 8 g/L de acetato houve consumo parcial do ácido adicionado, independentemente do substrato utilizado. A produção de álcoois, por outro lado, foi estimulada pelo aumento da concentração de acetato adicionado ao meio de cultivo. A produção de 2,3-butanodiol aumentou até 126 e 130 % e, a de etanol 293 e 245 % nos meios contendo glicerol ou glicerina bruta, respectivamente (Tabelas 3.7 e 3.8).

A adição de concentrações crescentes de lactato ao meio de cultivo contendo glicerol ou glicerina bruta resultou em redução gradual do consumo dos substratos, atingindo 46 e 43 %, respectivamente. A produção de 1,3-propanodiol também foi reduzida na presença de lactato, em até 48 e 46 % em meio contendo glicerol e glicerina bruta, respectivamente. Por outro lado, o rendimento de 1,3-propanodiol aumentou com a adição de lactato nas concentrações até 10 g/L em glicerol e, até 20 g/L em glicerina bruta. Dentre os produtos da fermentação, o formato e o acetato apresentaram aumento da produção na presença de lactato produção, em meio contendo glicerol ou glicerina bruta (Tabelas 3.7 e 3.8).

Tabela 3.7 Efeito de diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol, acetato, lactato ou etanol sobre a fermentação do glicerol por *K. pneumoniae* Ec18 cultivada (37 °C, 24 h) em meio basal adicionado de glicerol (20 g/L). Os resultados representam médias de dois experimentos.

Produtos Adicionados	g/L	Parâmetros (g/L)										C _R (%)
		Glicerol _C	Succinato	Lactato	Formato	Acetato	1,3-PD	2,3-BD	Etanol	Y _{PD/Glicerol}	Biomassa	
1,3-propanodiol	0	18,74 ± 1,10	0,59 ± 0,02	1,80 ± 0,13	1,60 ± 0,02	1,09 ± 0,11	8,06 ± 0,30	1,81 ± 0,01	1,22 ± 0,10	0,52 ± 0,05	1,01 ± 0,00	98,70
	5	20,10 ± 0,37	0,64 ± 0,00	2,76 ± 0,47	1,60 ± 0,14	0,82 ± 0,32	7,32 ± 0,31	1,89 ± 0,39	2,71 ± 0,50	0,44 ± 0,06	1,17 ± 0,08	99,01
	10	19,12 ± 0,13	0,57 ± 0,12	1,48 ± 0,50	1,33 ± 0,08	1,25 ± 0,25	6,39 ± 0,61	1,91 ± 0,22	1,42 ± 0,29	0,40 ± 0,10	1,18 ± 0,02	91,84
	20	20,46 ± 0,32	0,62 ± 0,02	2,39 ± 0,31	1,17 ± 0,12	0,94 ± 0,06	5,91 ± 0,16	2,44 ± 0,17	2,19 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,98 ± 0,07	95,08
	40	19,53 ± 1,33	0,51 ± 0,04	2,89 ± 0,23	1,25 ± 0,04	0,86 ± 0,01	3,86 ± 0,44	n.d.	2,07 ± 0,14	0,24 ± 0,04	0,99 ± 0,08	89,97
	60	16,53 ± 1,45	0,34 ± 0,03	2,61 ± 0,18	1,54 ± 0,01	0,79 ± 0,04	1,57 ± 0,07	n.d.	1,93 ± 0,16	0,13 ± 0,01	0,69 ± 0,05	92,35
	80	8,84 ± 2,48	0,11 ± 0,05	1,08 ± 0,13	1,30 ± 0,16	0,29 ± 0,04	-0,29 ± 0,02	n.d.	1,12 ± 0,22	n.d.	0,29 ± 0,07	96,28
Acetato	0	18,44 ± 0,38	0,41 ± 0,04	1,03 ± 0,17	1,38 ± 0,04	0,98 ± 0,05	8,54 ± 0,23	2,24 ± 0,13	0,70 ± 0,07	0,56 ± 0,00	0,90 ± 0,12	96,54
	2	18,53 ± 0,43	0,45 ± 0,04	0,79 ± 0,01	1,26 ± 0,05	0,50 ± 0,08	7,87 ± 0,09	3,32 ± 0,46	1,09 ± 0,20	0,51 ± 0,02	1,15 ± 0,03	98,15
	4	18,93 ± 0,37	0,40 ± 0,03	0,56 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,13 ± 0,03	7,70 ± 0,26	3,77 ± 0,12	1,33 ± 0,33	0,49 ± 0,01	1,21 ± 0,09	96,24
	8	19,71 ± 0,15	0,30 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,88 ± 0,03	-0,78 ± 0,09	7,03 ± 0,09	4,51 ± 0,09	1,95 ± 0,16	0,43 ± 0,01	1,06 ± 0,13	93,25
	12	16,68 ± 0,54	0,18 ± 0,04	0,33 ± 0,03	0,86 ± 0,05	-1,59 ± 0,10	4,58 ± 0,00	5,07 ± 0,08	2,75 ± 0,15	0,33 ± 0,00	0,87 ± 0,09	97,25
	16	9,38 ± 1,87	0,04 ± 0,02	0,27 ± 0,07	1,06 ± 0,08	-1,24 ± 0,15	2,48 ± 0,61	3,16 ± 0,63	1,65 ± 0,34	0,31 ± 0,01	0,46 ± 0,02	98,44
	25	1,58 ± 0,33	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,00	n.d.	-1,31 ± 0,24	0,06 ± 0,04	0,24 ± 0,10	0,22 ± 0,04	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01	95,26
Lactato	0	16,26 ± 0,53	0,46 ± 0,02	1,02 ± 0,01	1,32 ± 0,33	0,83 ± 0,08	6,99 ± 0,07	2,34 ± 0,08	0,93 ± 0,05	0,52 ± 0,01	1,11 ± 0,02	99,32
	2,5	13,29 ± 0,20	0,28 ± 0,02	0,95 ± 0,04	1,40 ± 0,15	1,36 ± 0,14	6,54 ± 0,20	1,64 ± 0,11	0,53 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,93 ± 0,11	99,67
	5	14,20 ± 0,55	0,25 ± 0,00	0,61 ± 0,06	1,40 ± 0,16	1,36 ± 0,07	6,54 ± 0,07	0,64 ± 0,09	0,66 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,99 ± 0,03	97,79
	10	10,58 ± 1,14	0,08 ± 0,01	0,68 ± 0,09	1,21 ± 0,28	1,18 ± 0,27	4,95 ± 0,71	0,71 ± 0,27	0,38 ± 0,14	0,57 ± 0,03	0,80 ± 0,09	98,89
	15	10,97 ± 0,13	0,06 ± 0,01	0,46 ± 0,00	1,36 ± 0,00	1,25 ± 0,15	4,73 ± 0,12	0,54 ± 0,01	0,31 ± 0,10	0,52 ± 0,01	0,71 ± 0,01	96,16
	20	11,42 ± 1,44	0,10 ± 0,01	0,99 ± 0,07	1,39 ± 0,02	1,44 ± 0,14	4,83 ± 0,56	0,43 ± 0,04	0,51 ± 0,16	0,51 ± 0,01	0,68 ± 0,07	98,09
	30	8,72 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,30 ± 0,02	1,63 ± 0,39	1,11 ± 0,29	3,75 ± 0,53	n.d.	0,44 ± 0,05	0,47 ± 0,09	0,49 ± 0,07	97,14
Etanol	0	15,58 ± 0,17	0,41 ± 0,01	1,55 ± 0,06	1,40 ± 0,14	0,90 ± 0,08	6,77 ± 0,02	1,41 ± 0,45	0,95 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,96 ± 0,00	98,39
	2,5	15,49 ± 0,68	0,49 ± 0,05	1,67 ± 0,24	1,34 ± 0,14	1,22 ± 0,12	7,02 ± 0,29	1,15 ± 0,15	0,57 ± 0,05	0,55 ± 0,05	0,98 ± 0,08	98,75
	5	15,00 ± 0,15	0,49 ± 0,02	1,71 ± 0,21	1,29 ± 0,11	1,33 ± 0,14	6,95 ± 0,18	1,25 ± 0,06	0,27 ± 0,02	0,56 ± 0,01	0,94 ± 0,08	99,80
	10	13,75 ± 0,66	0,43 ± 0,04	1,69 ± 0,53	0,93 ± 0,12	1,30 ± 0,01	6,54 ± 0,62	0,79 ± 0,07	0,31 ± 0,05	0,58 ± 0,03	0,79 ± 0,09	99,31
	15	12,74 ± 1,09	0,41 ± 0,05	1,85 ± 0,07	1,13 ± 0,08	1,28 ± 0,15	5,66 ± 0,61	0,65 ± 0,06	0,21 ± 0,07	0,54 ± 0,01	0,72 ± 0,09	99,14
	20	12,19 ± 1,01	0,38 ± 0,02	2,36 ± 0,06	1,18 ± 0,09	1,18 ± 0,10	5,09 ± 0,34	0,24 ± 0,03	0,51 ± 0,08	0,51 ± 0,01	0,66 ± 0,10	99,59
	30	9,13 ± 1,11	0,23 ± 0,00	2,27 ± 0,18	1,35 ± 0,16	0,63 ± 0,06	3,13 ± 0,03	n.d.	0,07 ± 0,01	0,42 ± 0,05	0,45 ± 0,05	98,12

Glicerol_C: glicerol consumido. n.d.: produtos não detectados ou valores não determinados. Y_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

Tabela 3.8 Efeito de diferentes concentrações iniciais de 1,3-propanodiol, acetato, lactato ou etanol sobre a fermentação de glicerina bruta por *K. pneumoniae* Ec18 cultivada (37 °C, 24 h) em meio basal adicionado de glicerol (20 g/L). Os resultados representam médias de dois experimentos.

Produtos Adicionados	g/L	Parâmetros (g/L)										C _R (%)
		Glicerol _C	Succinato	Lactato	Formato	Acetato	1,3-PD	2,3-BD	Etanol	<i>Y</i> _{PD/Glicerol}	Biomassa	
1,3-propanodiol	0	20,68 ± 0,35	0,22 ± 0,11	1,35 ± 0,21	1,65 ± 0,02	1,30 ± 0,01	9,29 ± 0,76	2,59 ± 0,43	1,09 ± 0,03	0,54 ± 0,04	1,14 ± 0,07	98,09
	5	20,03 ± 1,44	0,26 ± 0,05	1,66 ± 0,16	1,36 ± 0,06	1,41 ± 0,30	8,70 ± 0,64	2,43 ± 0,04	1,16 ± 0,04	0,52 ± 0,03	1,07 ± 0,08	98,88
	10	19,64 ± 0,34	0,21 ± 0,08	1,86 ± 0,13	1,23 ± 0,05	1,17 ± 0,21	7,42 ± 0,45	2,10 ± 0,15	1,56 ± 0,09	0,46 ± 0,02	1,13 ± 0,22	95,40
	20	20,60 ± 0,45	0,16 ± 0,06	1,93 ± 0,21	1,46 ± 0,18	1,13 ± 0,00	6,70 ± 0,26	2,31 ± 0,03	1,85 ± 0,21	0,39 ± 0,01	1,08 ± 0,05	94,36
	40	19,63 ± 0,29	0,15 ± 0,06	2,89 ± 0,21	1,10 ± 0,01	0,93 ± 0,07	4,64 ± 0,43	n.d.	1,94 ± 0,05	0,29 ± 0,06	0,94 ± 0,10	90,54
	60	14,65 ± 0,48	0,03 ± 0,00	2,37 ± 0,09	1,48 ± 0,09	0,76 ± 0,01	1,42 ± 0,53	n.d.	1,62 ± 0,22	0,11 ± 0,01	0,71 ± 0,16	93,06
	80	5,40 ± 0,49	0,01 ± 0,00	0,76 ± 0,10	1,16 ± 0,06	0,21 ± 0,08	-0,06 ± 0,03	n.d.	0,92 ± 0,03	n.d.	0,26 ± 0,01	97,91
Acetato	0	17,57 ± 0,86	0,14 ± 0,02	0,80 ± 0,18	1,65 ± 0,32	1,03 ± 0,28	7,92 ± 0,00	2,08 ± 0,08	0,89 ± 0,02	0,55 ± 0,03	1,00 ± 0,03	96,27
	2	18,52 ± 0,88	0,14 ± 0,02	0,63 ± 0,02	1,12 ± 0,00	0,98 ± 0,09	7,77 ± 0,11	3,06 ± 0,26	0,95 ± 0,16	0,51 ± 0,02	1,04 ± 0,09	95,16
	4	17,82 ± 0,37	0,11 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,99 ± 0,12	0,57 ± 0,07	7,36 ± 0,53	3,16 ± 0,05	1,17 ± 0,09	0,50 ± 0,03	1,00 ± 0,04	93,45
	8	16,76 ± 0,82	0,07 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,96 ± 0,16	-0,81 ± 0,08	5,83 ± 0,37	4,36 ± 0,38	1,86 ± 0,33	0,42 ± 0,04	0,92 ± 0,03	96,67
	12	16,25 ± 0,25	0,08 ± 0,03	0,54 ± 0,03	1,11 ± 0,09	-1,63 ± 0,49	4,25 ± 0,24	4,78 ± 0,72	3,07 ± 0,55	0,32 ± 0,00	0,84 ± 0,06	97,64
	16	13,39 ± 0,95	0,15 ± 0,09	0,39 ± 0,07	1,25 ± 0,04	-1,20 ± 0,25	2,54 ± 0,49	4,10 ± 0,74	2,01 ± 0,08	0,23 ± 0,03	0,47 ± 0,06	95,23
	25	1,78 ± 0,47	n.d.	0,10 ± 0,02	n.d.	-0,60 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,57 ± 0,21	0,47 ± 0,09	0,05 ± 0,07	0,08 ± 0,01	98,32
Lactato	0	16,02 ± 0,70	0,02 ± 0,01	1,30 ± 0,15	1,41 ± 0,10	0,91 ± 0,03	6,75 ± 0,09	2,32 ± 0,01	0,76 ± 0,08	0,51 ± 0,03	1,03 ± 0,16	97,96
	2,5	15,69 ± 2,44	0,10 ± 0,06	1,32 ± 0,29	1,32 ± 0,01	1,30 ± 0,04	7,51 ± 0,54	1,71 ± 0,20	0,36 ± 0,13	0,58 ± 0,05	1,09 ± 0,17	99,37
	5	13,48 ± 0,83	0,08 ± 0,02	0,88 ± 0,28	1,33 ± 0,07	1,40 ± 0,03	6,84 ± 0,75	0,96 ± 0,39	0,38 ± 0,07	0,61 ± 0,03	0,97 ± 0,07	99,67
	10	10,60 ± 0,56	0,01 ± 0,00	0,48 ± 0,09	1,31 ± 0,28	1,38 ± 0,38	5,16 ± 0,28	0,69 ± 0,10	0,40 ± 0,16	0,59 ± 0,12	0,76 ± 0,03	99,72
	15	12,45 ± 0,10	0,01 ± 0,01	0,94 ± 0,10	1,49 ± 0,04	1,64 ± 0,23	5,73 ± 0,50	0,68 ± 0,08	0,46 ± 0,12	0,56 ± 0,04	0,85 ± 0,14	99,08
	20	12,32 ± 0,22	0,04 ± 0,02	1,78 ± 0,60	1,64 ± 0,09	1,48 ± 0,21	5,42 ± 0,03	0,47 ± 0,12	0,37 ± 0,05	0,53 ± 0,01	0,71 ± 0,00	99,60
	30	9,20 ± 0,68	0,04 ± 0,02	1,11 ± 0,09	1,83 ± 0,01	1,11 ± 0,04	3,51 ± 0,20	0,21 ± 0,03	0,55 ± 0,14	0,46 ± 0,01	0,48 ± 0,00	99,22
Etanol	0	16,95 ± 0,07	0,04 ± 0,02	1,84 ± 0,19	1,48 ± 0,01	1,08 ± 0,00	7,37 ± 0,21	2,23 ± 0,10	0,91 ± 0,02	0,53 ± 0,02	1,00 ± 0,01	99,04
	2,5	16,58 ± 1,86	0,06 ± 0,01	2,20 ± 0,20	1,32 ± 0,34	1,27 ± 0,11	7,63 ± 0,52	1,67 ± 0,39	0,62 ± 0,05	0,56 ± 0,02	0,96 ± 0,18	98,88
	5	15,98 ± 0,34	0,03 ± 0,00	2,15 ± 0,13	1,19 ± 0,03	1,42 ± 0,11	7,45 ± 0,58	1,83 ± 0,15	0,21 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,99 ± 0,02	99,11
	10	16,95 ± 1,37	0,08 ± 0,02	2,27 ± 0,25	1,24 ± 0,05	1,55 ± 0,03	7,98 ± 0,62	1,69 ± 0,43	0,40 ± 0,04	0,57 ± 0,00	1,04 ± 0,09	99,45
	15	14,89 ± 0,62	0,07 ± 0,00	2,47 ± 0,10	1,16 ± 0,13	1,49 ± 0,07	6,82 ± 0,17	1,05 ± 0,09	0,46 ± 0,04	0,55 ± 0,01	0,85 ± 0,07	99,30
	20	13,88 ± 2,40	n.d.	3,01 ± 0,23	1,02 ± 0,02	1,18 ± 0,03	5,56 ± 0,48	0,41 ± 0,01	0,53 ± 0,07	0,49 ± 0,04	0,70 ± 0,08	99,30
	30	10,48 ± 0,13	0,04 ± 0,02	3,25 ± 0,08	1,55 ± 0,09	0,70 ± 0,07	3,56 ± 0,16	n.d.	0,41 ± 0,05	0,41 ± 0,01	0,48 ± 0,03	97,90

Glicerol_C: glicerol consumido. n.d.: produtos não detectados ou valores não determinados. *Y*_{PD/Glicerol}: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido (mol/mol). C_R: porcentagem de carbono recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e biomassa.

A adição de etanol ao meio de cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 em concentrações de até 10 g/L não reduziu o consumo de glicerol ou glicerina bruta, e resultou em aumento da produção de 1,3-propanodiol. Além disso, em concentrações de até 15 g/L de etanol houve aumento do rendimento de 1,3-propanodiol. Na concentração máxima de etanol, ocorreu redução tanto da produção como do rendimento de 1,3-propanodiol, de 54 e 21 % em meio com glicerol e, de 52 e 23 % em glicerina bruta, respectivamente. Dentre os demais produtos da fermentação, o lactato e o acetato tiveram a produção aumentada pela adição de etanol ao meio de cultivo, em detrimento da formação de 2,3-butanodiol e do próprio etanol (Tabelas 3.7 e 3.8).

4. DISCUSSÃO

O 1,3-propanodiol é um produto da fermentação do glicerol, formado normalmente durante o crescimento microbiano, o qual pode ser afetado pelas condições de temperatura e pH de cultivo (GÜNZEL *et al.*, 1991; SOLOMON *et al.*, 1995). Para *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18, assim como para a maioria dos microrganismos produtores de 1,3-propanodiol, a temperatura ótima de crescimento está entre 35 e 40 °C (GUNGORMUSLER *et al.*, 2010). *K. pneumoniae* Ec18 apresentou maior tolerância à queda do pH do que *C. butyricum* Sb06, sendo o crescimento totalmente inibido nos pH 4,5 e 5,0 respectivamente. A diminuição do pH inicial também reduziu a produção da maioria dos produtos da fermentação, incluindo o 1,3-propanodiol, o qual é normalmente produzido em associação com o crescimento (SOLOMON *et al.*, 1995). Por outro lado, a produção de lactato e 2,3-butanodiol por *K. pneumoniae* Ec18 aumentou com a redução do pH. O acúmulo desses produtos é favorecido em condições de excesso de substrato e inibição do crescimento, como observado com a diminuição do pH (ZENG *et al.*, 1994; MENZEL *et al.*, 1997), em especial a formação do 2,3-butanodiol, cuja produção é estimulada em pH inferior a 6,5 (BIEBL *et al.*, 1998).

Considerando a concentração dos substratos, o aumento de 0 até 5 g/L resultou em rápido aumento da velocidade específica de crescimento, tanto para *C. butyricum* Sb06 como para *K. pneumoniae* Ec18. No entanto, concentrações dos substratos abaixo de 0,5 g/L afetaram consideravelmente o crescimento de *C. butyricum* Sb06, diferentemente do observado para *K. pneumoniae* Ec18. A entrada do glicerol na célula ocorre primordialmente por difusão simples através da membrana plasmática (DA SILVA *et al.*, 2009), porém, bactérias como *K. pneumoniae* podem apresentar uma proteína facilitadora da entrada de glicerol na célula, GlpF. Esta proteína favorece a captação de glicerol pelas células em concentrações de glicerol abaixo de 8 mM (0,74 g/L), favorecendo seu crescimento (RICHEY e LIN, 1972; SUN *et al.*, 2003). Além disso, *K. pneumoniae* Ec18 apresentou μ em torno de 0,5 h⁻¹ nos tratamentos sem adição de glicerol ou glicerina bruta. Este crescimento pode ter sido suportado pelo acúmulo de glicogênio durante os cultivos que precederam o experimento. Segundo Wilkinson (1963) e Preiss (1984), o acúmulo de glicogênio por enterobactérias pode ocorrer em condições de limitação do crescimento na presença de excesso de carbono.

Os efeitos do aumento da concentração de glicerol ou glicerina bruta, acima de 5 g/L, foram mais pronunciados em *C. butyricum* Sb06, cujo crescimento foi totalmente inibido nas concentrações de substrato a partir de 160 g/L, enquanto *K. pneumoniae* Ec18 cresceu em todas as concentrações de substrato testadas. Em ambos os casos, a tolerância ao glicerol está dentro do intervalo descrito na literatura para outras linhagens de *C. butyricum* e *K. pneumoniae*, entre 120 até mais de 200 g/L (BIEBL, 1991; ZENG *et al.*, 1994; ABBAD-ANDALOUSSI *et al.*, 1995; PETITDEMANGE *et al.*, 1995; COLIN *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2005). Ademais, *C. butyricum* Sb06 parece não ter sido afetado pela utilização de glicerina bruta, diferentemente de *K. pneumoniae* Ec18, que apresentou rápido declínio de μ a partir de 160 g/L de glicerina bruta. Considerando o perfil linear da inibição do crescimento de *K. pneumoniae* Ec18 pela concentração de substrato, as concentrações de glicerol e glicerina bruta capazes de inibir totalmente seu crescimento podem ser estimadas em torno de 250 e 200 g/L, respectivamente.

A concentração de substrato afetou também o rendimento de 1,3-propanodiol, o qual apresentou aumento a medida que o crescimento microbiano aumentou, nas concentrações de substrato limitantes ao crescimento (0 a 1 g/L), e se estabilizou nas condições de excesso de substrato (20 a 200 g/L) e inibição do crescimento. Segundo Zhang e colaboradores (2008), em concentrações limitantes de glicerol a formação de biomassa é favorecida em relação à produção de 1,3-propanodiol, ocorrendo o inverso em condições de excesso de substrato, o que explica, em parte, o aumento do rendimento de 1,3-propanodiol concomitantemente com o aumento da concentração de substrato. Além disso, em condições de excesso de glicerol a distribuição do glicerol entre as vias redutiva e oxidativa é alterada apenas em relação ao fluxo absoluto pelas vias, mantendo constante sua distribuição relativa, o que explica a estabilidade do rendimento de 1,3-propanodiol observada (ZHANG *et al.*, 2008).

Principal produto da fermentação do glicerol e da glicerina bruta pelos isolados avaliados neste estudo, o 1,3-propanodiol inibiu totalmente o crescimento de *C. butyricum* Sb06 em concentrações iniciais a partir de 40 g/L. Contudo, este resultado pode não corresponder à tolerância máxima de *C. butyricum* Sb06 ao 1,3-propanodiol. Estudos realizados com *C. butyricum* CNCM 1211 demonstraram um maior potencial inibitório do 1,3-propanodiol sobre o crescimento do que sobre a fermentação, de forma que concentrações iniciais de 65 g/L de 1,3-propanodiol inibiram totalmente o crescimento do clostrídio, enquanto o crescimento em

concentrações de 1,3-propanodiol inferiores a 65 g/L levaram a um acúmulo de 1,3-propanodiol (1,3-propanodiol inicial + produzido) de até 83,7 g/L (COLIN *et al.*, 2000). Para *K. pneumoniae* Ec18, nenhuma das concentrações de 1,3-propanodiol avaliadas foi capaz de inibir totalmente o crescimento. No entanto, a adição de quantidades crescentes de 1,3-propanodiol ao meio de cultivo reduziu linearmente os valores de μ . Desta forma, a concentração de 1,3-propanodiol capaz de inibir totalmente o crescimento de *K. pneumoniae* Ec18 foi estimada em 103,5 g/L em meio contendo glicerol e, em 98,5 g/L em glicerina bruta. Estes valores são semelhantes ao maior valor de 1,3-propanodiol produzido de forma fermentativa a partir do glicerol, 102,1 g/L (XU *et al.*, 2009).

Os efeitos inibitórios do 1,3-propanodiol sobre as células podem ser devidos a diferentes fatores, como a alteração da membrana plasmática em resposta ao aumento da fluidez (JAIN *et al.*, 1978), o efeito inibitório de álcoois sobre mecanismos de transporte e sobre a atividade de ATPase de membrana (SHIMIZU e KATSURA, 1988) ou ainda a supressão do gradiente de pH transmembrana (Δ pH) e consequente desacoplamento energético (BOWLES e ELLEFSON, 1985; GOTTWALD e GOTTSCHALK, 1985). Esses efeitos inibitórios também podem ser aplicados à inibição causada por outros álcoois, como o etanol. As concentrações de etanol necessárias para inibir totalmente o crescimento de *K. pneumoniae* Ec18 foram estimadas em 43,4 e 42,3 g/L em meio contendo glicerol ou glicerina bruta, respectivamente. Estes valores são superiores às concentrações inibitórias de etanol determinadas para *K. pneumoniae*, de 16,6 e 26 g/L, por Zeng e colaboradores (1994) e Cheng e colaboradores (2005), respectivamente.

As concentrações de butirato e lactato estimadas como totalmente inibitórias ao crescimento de *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18, respectivamente, foram superiores aos previamente determinados para *C. butyricum* e *K. pneumoniae* na literatura (BIEBL, 1991; ZENG *et al.*, 1994; COLIN *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2005). Para *C. butyricum* Sb06, as concentrações de butirato capazes de inibir totalmente seu crescimento foram estimadas em 35,6 e 31,9 g/L em meio contendo glicerol ou glicerina bruta, respectivamente. As concentrações de lactato capazes de inibir completamente o crescimento de *K. pneumoniae* Ec18 foram estimadas em 90,2 g/L em glicerol e 60,3 g/L em glicerina bruta. Os efeitos inibitórios causados por ácidos orgânicos como lactato, butirato e acetato são devidos principalmente às suas formas não-dissociadas, as quais atravessam a membrana plasmática

dissociando-se dentro do citosol, com conseqüente diminuição do ΔpH . Para a manutenção do ΔpH e da homeostasia celular, os microrganismos utilizam uma H^+ -ATPase para transportar ativamente os prótons para fora da célula, reduzindo a energia disponível para as demais atividades metabólicas (BEALES, 2004).

Este tipo de inibição é dependente também do pH do meio de cultivo, sendo que nas condições avaliadas o acetato foi o produto da fermentação mais inibitório ao crescimento de *K. pneumoniae* Ec18. Para este ácido, as concentrações capazes de inibir totalmente o crescimento de *K. pneumoniae* Ec18 foram de 26,8 e 26,6 g/L em meio contendo glicerol e glicerina bruta, respectivamente, valores estes acima dos 19 g/L de acetato determinados por Cheng *et al.* (CHENG *et al.*, 2005). A adição de acetato ao meio de cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 estimulou a produção de 2,3-butanodiol. Em sua forma não-dissociada o acetato pode servir como indutor das enzimas acetolactato descarboxilase e diacetil redutase, as quais fazem parte da via de produção de 2,3-butanodiol (STORMER, 1968; LARSEN e STORMER, 1973). Além disso, o acetato pode ser utilizado por *K. pneumoniae* como intermediário para a produção de 2,3-butanodiol, respondendo desta forma, por parte do consumo de acetato observado a partir da concentração de 8 g/L (YU e SADDLER, 1982).

O consumo do acetato adicionado também pode ser observado no cultivo de *C. butyricum* Sb06, em todas as concentrações de acetato testadas. Este comportamento também foi observado por Colin *et al.* (2001), porém apenas a partir da adição de 12,2 g/L de acetato. Tanto neste trabalho, como no trabalho realizado com *C. butyricum* CNCM 1211 (COLIN *et al.*, 2001), a adição de acetato ao meio de cultivo favoreceu principalmente a formação de butirato, o qual, assim como o 2,3-butanodiol, também depende da condensação de moléculas de acetil-CoA para sua produção. Outra consequência da adição de acetato ao meio de cultivo de *C. butyricum* Sb06 foi o estímulo do crescimento em concentrações de acetato de até 8 g/L. Este efeito estimulatório tem sido atribuído à ação do acetato como acceptor indireto de prótons e elétrons durante os estágios iniciais da fermentação, porém, sem atuar como fonte de energia para o crescimento (HEYNDRICKX *et al.*, 1991). A partir da adição de 12 g/L de acetato, observou-se a inibição do crescimento de *C. butyricum* Sb06, sendo as concentrações de 37,6 e 40,6 g/L de acetato capazes de inibir totalmente o crescimento de *C. butyricum* Sb06 em meio contendo glicerol ou glicerina bruta, respectivamente.

5. CONCLUSÕES

O crescimento de *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 é favorecido pelo cultivo em temperaturas entre 35 e 40 °C e pH 7,0.

Concentrações iniciais de glicerol ou glicerina bruta e de 1,3-propanodiol a partir de 160 e 40 g/L, respectivamente, inibem o crescimento de *C. butyricum* Sb06 em meio basal.

O butirato é o produto da fermentação do glicerol ou da glicerina bruta mais inibitório ao crescimento de *C. butyricum* Sb06.

K. pneumoniae Ec18 tolera concentrações iniciais de glicerol ou glicerina bruta e de 1,3-propanodiol de 200 e 80 g/L, respectivamente.

Concentrações a partir de 160 g/L de glicerina bruta apresentam efeitos inibitórios ao crescimento de *K. pneumoniae* Ec18 maiores que a mesma concentração de glicerol.

O acetato é o produto da fermentação do glicerol ou da glicerina bruta mais inibitório ao crescimento de *K. pneumoniae* Ec18.

A adição de acetato ao meio de cultivo estimula a formação de produtos da condensação do acetil-CoA como butirato e 2,3-butanodiol por *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18, respectivamente.

A adição de butirato, lactato e etanol, ao meio de cultivo, favorece a produção de acetato e 1,3-propanodiol por *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18.

A adição de acetato e 1,3-propanodiol ao meio de cultivo de inibe a formação destes produtos por *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18.

Referências

ABBAD-ANDALOUSSI S, MANGINOT-DURR C, AMINE J, PETITDEMANGE E, PETITDEMANGE H (1995) Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. **Appl Environ Microbiol** 61 (12):4413-4417.

BEALES N (2004) Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. **Compr Rev Food Sci F** 3 (1):1-20.

BIEBL H (1991) Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. **Appl Microbiol Biotechnol** 35 (6):701-705.

BIEBL H, MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. **Appl Microbiol Biotechnol** 52 (3):289-297.

BIEBL H, ZENG AP, MENZEL K, DECKWER WD (1998) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Appl Microbiol Biotechnol** 50 (1):24-29.

BOWLES LK, ELLEFSON WL (1985) Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. **Appl Environ Microbiol** 50 (5):1165-1170.

CELINSKA E (2010) Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. **Biotechnol Adv** 28 (4):519-530.

CHEN X, XIU Z, WANG J, ZHANG D, XU P (2003) Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. **Enzyme Microb Technol** 33 (4):386-394.

CHENG KK, LIU HJ, LIU DH (2005) Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation. **Biotechnol Lett** 27 (1):19-22.

COLIN T, BORIES A, LAVIGNE C, MOULIN G (2001) Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Curr Microbiol** 43 (4):238-243.

COLIN T, BORIES A, MOULIN G (2000) Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol** 54 (2):201-205.

DA SILVA GP, MACK M, CONTIERO J (2009) Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnol Adv** 27 (1):30-39.

DANIEL R, BOBIK TA, GOTTSCHALK G (1999) Biochemistry of coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes **FEMS Microbiol Rev** 22 (5):553-566.

GOTTWALD M, GOTTSCHALK G (1985) The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. **Arch Microbiol** 143 (1):42-46.

GÜNZEL B, YONSEL S, DECKWER W-D (1991) Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m³. **Appl Microbiol Biotechnol** 36 (3):289-294.

GUNGORMUSLER M, GONEN C, OZDEMIR G, AZBAR N (2010) 1,3-Propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. **N Biotechnol**.

HEYNDRIKX M, DE VOS P, VANCANNEYT M, DE LEY J (1991) The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t2 and 1213 t1 and *C. pasteurianum* LMG 3285. **Appl Microbiol Biotechnol** 34:637-642.

JAIN MK, GLEESON J, UPRETI A, UPRETI GC (1978) Intrinsic perturbing ability of alkanols in lipid bilayers. **Biochim Biophys Acta, Biomembr** 509 (1):1-8.

LARSEN SH, STORMER FC (1973) Diacetyl (acetoin) reductase from *Aerobacter aerogenes* kinetic mechanism and regulation by acetate of the reversible reduction of acetoin to 2,3-butanediol. **Eur J Biochem** 34:100-106.

MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD (1997) High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae* **Enzyme Microb Technol** 20 (2):82-86.

PETITDEMANGE E, DÜRR C, ABBAD-ANDALOUSSI S, RAVAL G (1995) Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 15 (6):498-502.

PREISS J (1984) Bacterial glycogen synthesis and its regulation. **Annu Rev Microbiol** 38 (1):419-458.

RICHEY DP, LIN ECC (1972) Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 112 (2):784-790.

SHIMIZU T, KATSURA T (1988) Steady-state kinetic study on the inhibition of the adenosinetriphosphatase activity of dynein from *Tetrahymena cilia* by glycerol. **J Biochem** 103 (1):99-105.

SOLOMON BO, ZENG AP, BIEBL H, SCHLIEKER H, POSTEN C, DECKWER WD (1995) Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. **J Biotechnol** 39 (2):107-117.

STORMER FC (1968) Evidence for induction of the 2,3-butanediol-forming enzymes in *Aerobacter aerogenes*. **FEBS Lett** 2:36-38.

STREEKSTRA H, TEIXEIRA DE MATTOS MJ, NEIJSEL OM, TEMPEST DW (1987) Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. **Arch Microbiol** 147 (3):268-275.

SUN J, VAN DEN HEUVEL J, SOUCAILLE P, QU Y, ZENG AP (2003) Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. **Biotechnol Prog** 19 (2):263-272.

TEATHER RM (1982) Maintenance of laboratory strains of obligately anaerobic rumen bacteria. **Appl Environ Microbiol** 44 (2):499-501.

WILKINSON JF (1963) Carbon and energy storage in bacteria. **J Gen Microbiol** 32 (2):171-176.

XU YZ, GUO NN, ZHENG ZM, OU XJ, LIU HJ, LIU DH (2009) Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnol Bioeng**.

YU EKC, SADDLER JN (1982) Enhanced production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. **Appl Environ Microbiol** 44 (4):777-784.

ZENG AP, BIEBL H (2002) Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. **Adv Biochem Eng Biotechnol** 74:239-259.

ZENG AP, BIEBL H, SCHLIEKER H, DECKWER WD (1993) Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: regulation of reducing equivalent balance and product formation. **Enzyme Microb Technol** 15 (9):770-779.

ZENG AP, ROSS A, BIEBL H, TAG C, GÜNZEL B, DECKWER WD (1994) Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. **Biotechnol Bioeng** 44 (8):902-911.

ZHANG Q, TENG H, SUN Y, XIU Z, ZENG A (2008) Metabolic flux and robustness analysis of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. **Bioprocess Biosyst Eng** 31 (2):127-135.

CAPÍTULO IV

Bioconversão de Glicerina Bruta em 1,3-Propanodiol por Bactérias Isoladas por Enriquecimento em Glicerina Bruta

RESUMO

A bioconversão de concentrações iniciais de 40 e 80 g/L de glicerina bruta em 1,3-propanodiol pelos isolados *Clostridium butyricum* Sb06 e *Klebsiella pneumoniae* Ec18 foi avaliada em sistema de batelada com controle do pH do meio de cultivo. *C. butyricum* Sb06 fermentou parcialmente a glicerina bruta em ambas as concentrações testadas, com produção de 10,23 e 8,21 g/L de 1,3-propanodiol e rendimento de 0,59 e 0,56 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicérol}, respectivamente. *K. pneumoniae* Ec18 fermentou totalmente a glicerina bruta na concentração inicial de 40 g/L e parcialmente na concentração inicial de 80 g/L, com produção de 13,96 e 21,43 g/L de 1,3-propanodiol e rendimento de 0,43 e 0,42 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicérol}, respectivamente. O isolado *K. pneumoniae* Ec18 foi selecionado para os experimentos de maximização da concentração final e do rendimento de 1,3-propanodiol por meio do emprego da metodologia de superfície de resposta. Modelos matemáticos descrevendo o comportamento da concentração final e do rendimento de 1,3-propanodiol em função da variação do pH, da concentração de extrato de levedura e de fosfato foram gerados, e o cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 nas condições ótimas descritas por estes modelos aumentaram a concentração final e o rendimento de 1,3-propanodiol em 56 e 22 %, respectivamente, em relação ao cultivo em condições não-otimizadas.

1. INTRODUÇÃO

O 1,3-propanodiol é um composto com diversas aplicações industriais, como a produção de poliésteres, poliéteres, poliuretanos, solventes, adesivos, laminados, resinas, detergentes, anticongelantes e cosméticos (ZENG e BIEBL, 2002; SAXENA *et al.*, 2009). A produção do poliéster politrimetileno tereftalato (PTT) representa o principal mercado consumidor do 1,3-propanodiol, sendo também responsável pelo aumento na demanda por este diol nos últimos anos (ZENG e BIEBL, 2002; KRAUS, 2008). Esta demanda tem sido suprida por meio da síntese química de 1,3-propanodiol a partir de derivados de petróleo (LAWRENCE e SULLIVAN, 1972; CHUAH *et al.*, 1999), e mais recentemente pela bioconversão de carboidratos por uma linhagem geneticamente modificada de *E. coli* (Genencor International and DuPont expand R&D collaboration to make key biobased polymer, 2001; FRAZZETTO, 2003).

O 1,3-propanodiol também pode ser obtido a partir da bioconversão do glicerol por microrganismos como *Clostridium butyricum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans* entre outros (MICKELSON e WERKMAN, 1940; FORSBERG, 1987; HOMANN *et al.*, 1990; BARBIRATO *et al.*, 1995). Nos últimos anos o glicerol teve seus preços reduzidos, em razão do aumento da produção mundial de biodiesel, cujo principal co-produto é a glicerina bruta (YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Com preços até 10 vezes inferiores ao do glicerol puro, a glicerina bruta pode ser utilizada como substrato para produção fermentativa de 1,3-propanodiol, aumentando a competitividade do 1,3-propanodiol bioproduzido frente ao petroquímico (HIREMATH *et al.*, 2011).

Segundo Biebl *et al.* (1999) o substrato é o fator que mais impacta sobre os custos da produção microbiana de 1,3-propanodiol. A competitividade do processo também está ligada à concentração final de 1,3-propanodiol, ao rendimento de 1,3-propanodiol e ao tempo de fermentação (ZENG e BIEBL, 2002; SAUER *et al.*, 2008). A concentração final de 1,3-propanodiol influencia diretamente a separação e purificação do 1,3-propanodiol, o qual deve alcançar entre 95 a 99 % de pureza para as aplicações industriais. A demanda de substrato pelo processo de bioconversão está ligada ao rendimento de 1,3-propanodiol, sendo tanto menor quanto maior o rendimento de 1,3-propanodiol. Além disso, o tempo de fermentação influencia a infraestrutura necessária ao processo, sendo que, longos tempos de fermentação

implicam em maior quantidade de fermentadores para manutenção da produção constante do 1,3-propanodiol (HAO *et al.*, 2006; WILLKE e VORLOP, 2008).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para otimizar a produção de 1,3-propanodiol, dentre elas, metodologias matemáticas e estatísticas que permitem a análise simultânea do efeito de vários fatores e suas interações sobre as respostas desejadas (OH *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2008). Delineamentos fatoriais e a metodologia de superfície de resposta podem ser utilizados de forma sequencial para identificação de fatores que influenciam uma dada resposta e para maximizar esta resposta (BOX *et al.*, 1978; RODRIGUES e IEMMA, 2005). Em relação à bioconversão de glicerol em 1,3-propanodiol, essas metodologias para maximização de respostas podem ser aplicadas às condições de cultivo, uma vez que podem limitar a formação do 1,3-propanodiol pelos microrganismos produtores (ZENG e BIEBL, 2002; CELINSKA, 2010).

Neste trabalho, os isolados *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18, obtidos por enriquecimento de amostras de solo e esgoto, respectivamente, em meio contendo glicerina bruta da indústria do biodiesel, foram avaliados quanto a bioconversão da glicerina bruta em 1,3-propanodiol em cultivo com controle de pH. Além disso, a identificação de fatores que afetam a produção de 1,3-propanodiol com posterior descrição da natureza da superfície de resposta na região ótima de produção de 1,3-propanodiol foi realizada por meio da utilização de delineamentos fatoriais e da metodologia de superfície de resposta.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e Meios de Cultivo

Clostridium butyricum Sb06 e *Klebsiella pneumoniae* EC18 foram mantidos a -20 °C em meio de estocagem contendo (por litro): 292 mg de K₂HPO₄, 240 mg de KH₂PO₄, 480 mg de (NH₄)₂SO₄, 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO₄·7H₂O, 64 mg de CaCl₂, 800 mg de hidrocloreto de cisteína, 460 mL de glicerol e armazenadas a -20 °C (TEATHER, 1982). Para o cultivo, os microrganismos foram transferidos para meio basal contendo (por litro): 292 mg de K₂HPO₄, 240 mg de KH₂PO₄, 480 mg de (NH₄)₂SO₄, 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO₄·7H₂O, 64 mg de CaCl₂, 600 mg de hidrocloreto de cisteína, 500 mg de extrato de levedura, 1 g de Trypticase e 4 g de Na₂CO₃. Solução anaeróbia de glicerina bruta contendo 25 % (m/m) de glicerol foi preparada a partir de glicerina bruta (60 %, m/m de glicerol, 1,25 %, m/m de etanol, pH 10) para ser adicionada ao meio basal. Nos experimentos, as concentrações de glicerina bruta são expressas em termos de concentração final de glicerol (g/L).

Os meios de cultivo e soluções, com pH ajustado em 6,5 pela adição de NaOH 4 M ou HCl 2 M, foram aquecidos à temperatura de ebulição para remoção do O₂ dissolvido. Após o aquecimento os meios de cultivo e soluções foram mantidos sob fluxo de CO₂ até o momento de sua transferência para frascos ou tubos previamente purgados com CO₂. Os frascos ou tubos contendo meios de cultivo e soluções livres de O₂ foram vedados com rolhas de borracha, lacrados com lacres de alumínio e esterilizados em autoclave (121 °C, 15 min). Os meios de cultivo e soluções anaeróbias estéreis foram manipulados com auxílio de seringas e agulhas estéreis.

2.2 Condições de Cultivo

As culturas de *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* EC18 foram reativadas a partir do meio de estocagem (-20 °C) por meio da transferência de alíquotas (0,3 mL) das culturas para frascos (15 mL) contendo 10 mL meio basal adicionado de glicerina bruta (20 g/L) (37 °C, 24 h). Para a realização dos experimentos, alíquotas (0,5 mL) das culturas reativadas foram transferidas para frascos (30 mL) contendo 20 mL de meio basal adicionado de glicerina bruta (20 g/L) e cultivados (2 cultivos, 37

°C, 8 a 10 h cada) em meio basal adicionado de glicerina bruta (20 g/L). Após este período, as culturas foram centrifugadas (6.000 g/10 min) para remoção do meio de cultivo e as células ressuspensas em solução salina anaeróbia (10 mL - NaCl 0,85%, m/v).

Os experimentos foram realizados em frascos (500 mL) (Flaskes, Corning Incorporated, USA) contendo 200 mL de meio de cultivo, mantidos sob agitação (150 rpm) (Multipoint HP 6, Variomag-Electronicrührer, Alemanha) e fluxo constante de CO₂ para manutenção da anaerobiose. O pH de cada fermentador foi controlado por conjuntos individuais de eletrodos (5990-45, Cole-Parmer, IL, USA) e controladores de pH (05656-00, Cole-Parmer, IL, USA) por meio da adição de NaOH (4 M). Os frascos foram inoculados com 5 mL de células ressuspensas em meio basal e, nos experimentos de produção de 1,3-propanodiol por *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 em meio basal contendo 40 ou 80 g/L de glicerina bruta, mantidos a 37°C, pH 6,8 por 48 horas. Nos demais experimentos, as condições de cultivo foram determinadas pelos delineamentos experimentais descritos a seguir.

2.3 Delineamento Fatorial Fracionado

O delineamento em fatorial fracionado foi utilizado para a seleção dos fatores que afetam a concentração final e o rendimento de 1,3-propanodiol em meio contendo glicerina bruta. Seis fatores (k) (pH, temperatura, extrato de levedura, Trypticase, amônia e fosfato) foram analisados em um delineamento fatorial fracionado 2^{k-2} com quatro repetições no ponto central (0), totalizando 20 tratamentos (Tabela 4.1). Os experimentos foram realizados utilizando meio basal para fatorial fracionado (FF), contendo (por litro): 29,2 a 292 mg de K₂HPO₄ (X_5), 24 a 240 mg de KH₂PO₄ (X_5), 0,48 a 4 g de (NH₄)₂SO₄ (X_6), 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO₄·7H₂O, 64 mg de CaCl₂, 600 mg de hidrocloreto de cisteína, 0 a 10 g de extrato de levedura (X_3), 0 a 10 g de Trypticase (X_4) e 4 g de Na₂CO₃. O meio basal FF foi adicionado de 80 g/L de glicerina bruta e o cultivo foi realizado em temperatura de 30 a 40 °C (X_2), pH controlado em 5,5 a 7,0 (X_1), sob agitação (150 rpm) durante 48 horas (Tabela 4.1). A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o *software* Minitab 16 (versão 16.1.0.0, Minitab Inc., USA) ao nível de 5 % de significância.

Tabela 4.1 Valores reais dos níveis de cada fator avaliado no delineamento fatorial fracionado em meio basal FF contendo 80 g/L de glicerina bruta.

Fatores	Código	Níveis			
		-1	0 ^a	+1	
pH	X ₁	7,0	6,3	5,5	
Temperatura (°C)	X ₂	40	35	30	
Extrato de Levedura (g/L)	X ₃	0	5	10	
Trypticase (g/L)	X ₄	0	5	10	
Fosfato ^b	X ₅	K ₂ HPO ₄ (mg/L)	29,2	160,1	292
		KH ₂ PO ₄ (mg/L)	24	132	240
Amônia (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	X ₆	0,48	2,24	4	

^a0 (zero) corresponde aos níveis dos fatores no ponto central, os quais correspondem a média aritmética entre os níveis -1 e +1; ^bOs valores de fosfato, em mg/L, correspondem à concentração de 0,16 a 1,6 mM de cada sal

2.4 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Para descrever a natureza da superfície de resposta na região ótima de concentração final e rendimento de 1,3-propanodiol, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, em delineamento composto central rotacional (DCCR) utilizando os fatores significativos identificados no delineamento fatorial fracionado. Três fatores (k) (pH, extrato de levedura e fosfato) foram analisados em delineamento fatorial completo (2^k) com pontos axiais (2k) e seis repetições no ponto central, totalizando 20 tratamentos (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Valores reais dos níveis de cada fator avaliado no delineamento composto central rotacional em meio basal RS contendo 80 g/L de glicerina bruta.

Fatores	Código	Níveis					
		-1,68 ^b	-1	0 ^a	+1	+1,68 ^b	
pH	Z ₁	5,5	5,8	6,3	6,7	7,0	
Extrato de Levedura (g/L)	Z ₂	0	2,03	5	7,97	10	
Fosfato ^b	Z ₃	K ₂ HPO ₄ (mg/L)	29,2	82,5	160,1	238,7	292
		KH ₂ PO ₄ (mg/L)	24	67,8	132	196,2	240

^a0 (zero) corresponde aos níveis dos fatores no ponto central, os quais correspondem à média aritmética entre os níveis axiais -1,68 e +1,68. ^bNíveis dos fatores nos pontos axiais, determinados como F^{1/4}, onde F é igual ao número de pontos fatoriais (2^k). ^bOs valores de fosfato, em mg/L, correspondem à concentração de 0,16 a 1,6 mM de cada sal.

Os experimentos foram realizados utilizando meio basal para o DCCR (RS) contendo (por litro): 29,2 a 292 mg de K₂HPO₄ (Z₃), 24 a 240 mg de KH₂PO₄ (Z₃), 480 mg de (NH₄)₂SO₄, 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO₄·7H₂O, 64 mg de CaCl₂, 600 mg de hidrócloro de cisteína, 0 a 10 g de extrato de levedura (Z₂) e 4 g de Na₂CO₃ (Tabela 4.2). O meio basal RS foi adicionado de 80 g/L glicerina bruta e o

cultivo foi realizado a 35 °C, com pH controlado em 5,5 a 7,0 (Z_I), sob agitação (150 rpm) durante 48 horas. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o *software* Minitab 16 (versão 16.1.0.0, Minitab Inc., USA) ao nível de 5 % de significância.

2.5 Procedimentos Analíticos

O crescimento microbiano foi monitorado por meio da determinação da densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron, MA, USA) e a biomassa calculada a partir da relação entre os valores obtidos da DO_{600nm} durante a fase de crescimento exponencial pela massa seca da cultura, sendo 1 unidade de DO_{600nm} equivalente a 0,505 g/L de *C. butyricum* Sb06 e a 0,51 g/L de *K. pneumoniae* EC18. Amostras (3 mL) das culturas em meio basal contendo glicerol ou glicerina bruta foram centrifugadas (8.000 g, 10 minutos) para obtenção do sobrenadante livre de células. Nas amostras em meio basal contendo glicerina bruta o sobrenadante livre de células foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poro de 0,45 μm de diâmetro (Schleicher & Schuell, Alemanha) para remoção de impurezas.

Os sobrenadantes livres de células ou filtrados livres de impurezas (20 μL) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Dionex UltiMate 3000 Dual (Dionex, Alemanha) acoplado ao detector de índice de refração (IR) Shodex RI-101 (Showa Denko K.K., Japão) mantido a 40 °C, e coluna Phenomenex Rezex-ROA, 300 x 7,8 mm (Phenomenex, CA, USA) mantida a 40 °C. Como fase móvel foi utilizada solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5 mM com fluxo de 0,5 mL/min. O rendimento de 1,3-propanodiol ($Y_{PD/Glicerol}$) foi calculado como $Y_{PD/Glicerol} = C_{PD} / (C_{Glicerol-i} - C_{Glicerol-f})$, onde, C_{PD} é a concentração de 1,3-propanodiol produzido (mol), $C_{Glicerol-i}$ é a concentração de glicerol (mol) no início do experimento e $C_{Glicerol-f}$ é a concentração de glicerol (mol) ao final do experimento.

3. RESULTADOS

3.1 Produção de 1,3-propanodiol por *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18

C. butyricum Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 foram cultivados (37 °C, 150 rpm, pH 6,8 por 48 h) em meio basal contendo 40 ou 80 g/L de glicerina bruta. *C. butyricum* Sb06 apresentou fase lag de 8 e 16 horas quando cultivado em meio contendo 40 e 80 g/L de glicerina bruta, respectivamente, com o crescimento ocorrendo nas 8 a 12 horas subsequentes. A glicerina bruta adicionada ao meio foi parcialmente consumida por *C. butyricum* Sb06, nas proporções de 54,44 e 21,89 % nos cultivos contendo 40 e 80 g/L de substrato, respectivamente. O principal produto da fermentação da glicerina bruta foi o 1,3-propanodiol, produzido nas concentrações de 10,23 e 8,21 g/L em meio contendo 40 e 80 g/L de glicerina bruta, respectivamente (Figura 4.1A e B). Em ambas as concentrações de substrato testadas, o rendimento de 1,3-propanodiol foi de 0,56 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}.

A fermentação da glicerina bruta por *C. butyricum* Sb06 também produziu acetato, butirato, formato e lactato. Dentre esses, o formato foi detectado produzido de forma tardia, após pelo menos 16 horas de cultivo em meio contendo 40 g/L de glicerina bruta. No cultivo contendo 80 g/L de substrato não foi detectada produção de formato. A produção de acetato, butirato e lactato iniciou-se com o crescimento de *C. butyricum* Sb06, após 8 horas de cultivo, e manteve-se mesmo após a cultura cessar o crescimento. A produção de acetato e lactato no cultivo com 80 g/L de glicerina bruta foi 16 e 67 % superior, respectivamente, à produção em meio contendo 40 g/L de substrato. Por outro lado, a produção de butirato foi 41 % maior no cultivo em 40 g/L de glicerina bruta (Figura 4.1C e D).

K. pneumoniae Ec18 apresentou fase lag de 4 horas no tratamento contendo 80 g/L de glicerina bruta. Em ambas as concentrações de substrato testadas, a fase de crescimento durou em torno de 16 horas. O consumo da glicerina bruta por *K. pneumoniae* Ec18 após as 48 horas de cultivo foi superior a 99 % no tratamento contendo 40 g/L do substrato. No cultivo com concentração inicial de 80 g/L de glicerina bruta, 76,45 % do substrato foi consumido. A produção e rendimento de 1,3-propanodiol foram de 13,96 g/L e 0,41 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} em meio contendo 40 g/L de glicerina bruta e de 21,43 g/L e 0,42 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} em meio contendo 80 g/L glicerina bruta, respectivamente (Figura 4.2A e B).

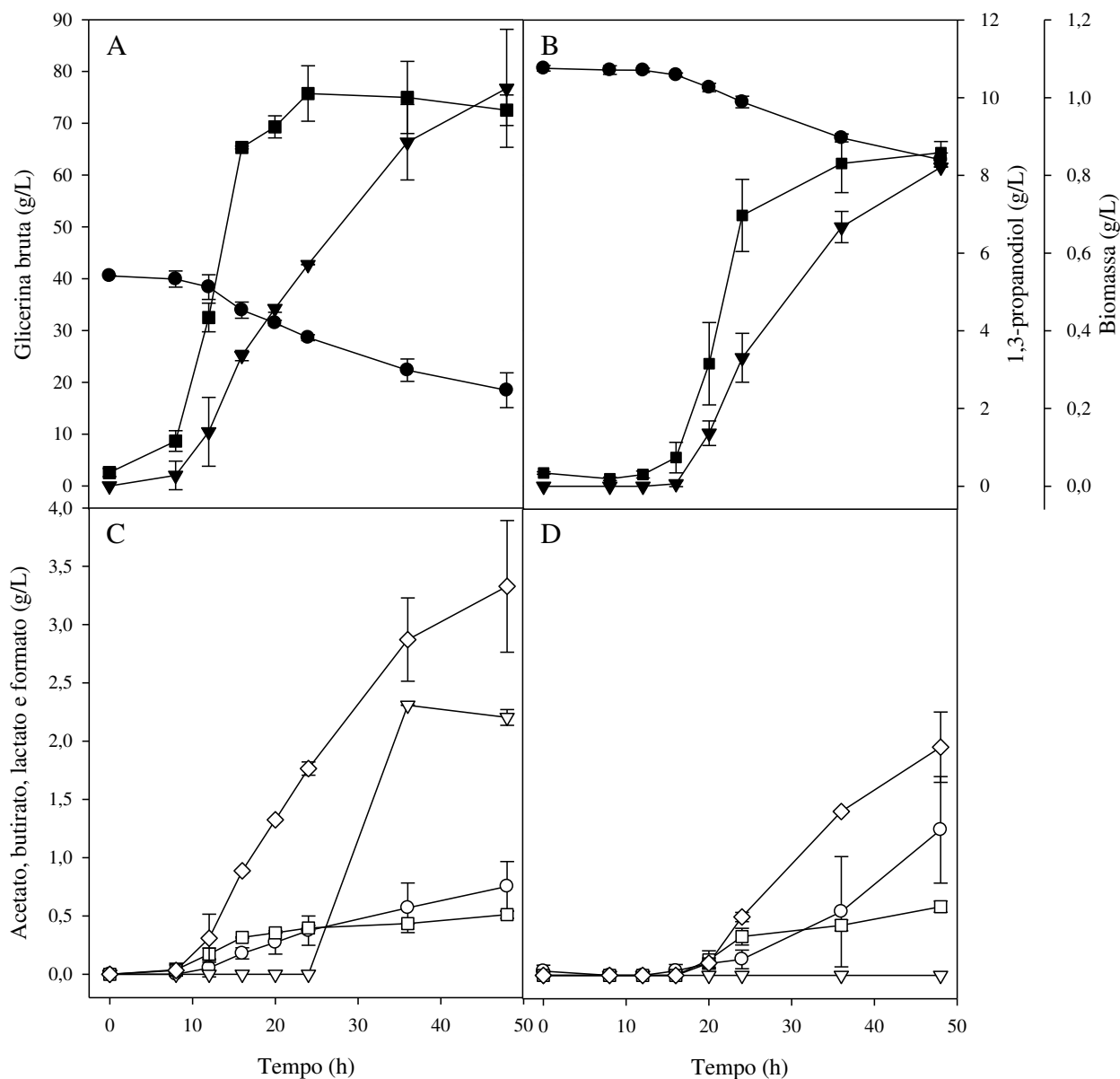


Figura 4.1 Cultivo de *C. butyricum* Sb06 (37 °C, 150 rpm por 48 h) em meio basal com pH controlado em 6,8 contendo 40 (A e C) ou 80 g/L (B e D) de glicerina bruta. A e B: consumo de glicerina bruta (●), produção de 1,3-propanodiol (▼) e de biomassa (■). C e D: produção de acetato (□), butirato (◇), formato (▽) e lactato (○). Os resultados representam médias de dois experimentos.

O 1,3-propanodiol foi o principal produto da fermentação da glicerina bruta por *K. pneumoniae* Ec18, em ambas as concentrações de substrato avaliadas. Contudo, considerando-se os demais produtos da fermentação, houve alteração do perfil de produtos formados com o aumento da concentração de 40 para 80 g/L de glicerina bruta. Na concentração inicial de 40 g/L de substrato, o segundo principal

produto da fermentação foi o etanol, com concentração final de 4,53 g/L. Por outro lado, no cultivo em 80 g/L de glicerina bruta o lactato foi o segundo principal produto da fermentação, com 12,15 g/L de concentração final. Essa alteração resultou do aumento de 3,7 vezes na produção de lactato entre as concentrações de 40 e 80 g/L, contra aumento de 1,5 vez na produção de etanol (Figura 4.2C e D).

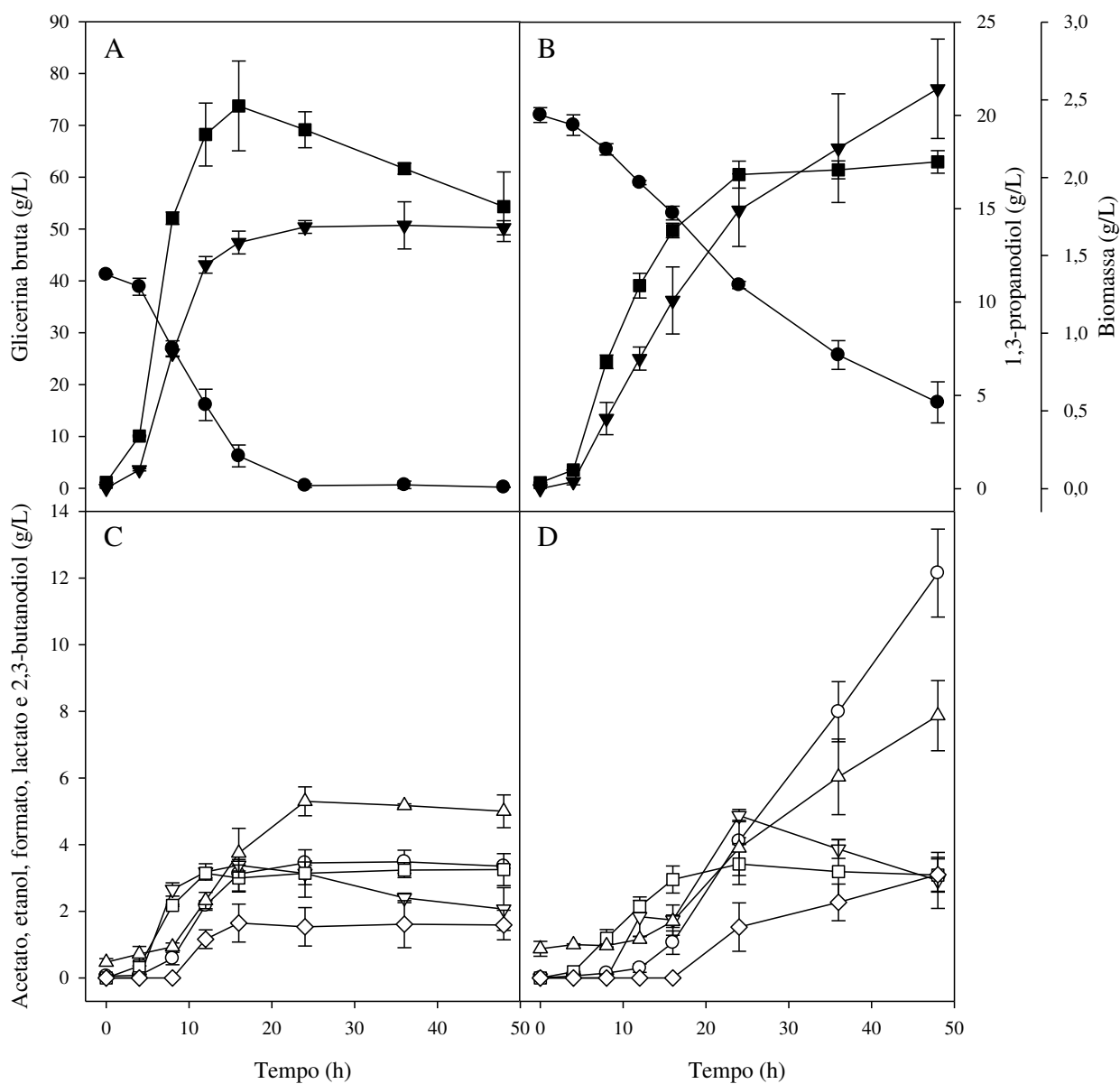


Figura 4.2 Cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 (37 °C, 150 rpm por 48 h) em meio basal com pH controlado em 6,8 contendo 40 (A e C) ou 80 g/L (B e D) de glicerina bruta. A e B: consumo de glicerina bruta (●), produção de 1,3-propanodiol (▼) e de biomassa (■). C e D: produção de acetato (□), etanol (△), formato (▽), lactato (○) e 2,3-butanodiol (◇). Os resultados representam médias de dois experimentos.

3.2 Delineamento Fatorial Fracionado

Considerando-se o desempenho obtido no experimento de produção de 1,3-propanodiol em batelada com controle de pH, a cultura de *K. pneumoniae* Ec18 foi selecionada para os experimentos de otimização da produção de 1,3-propanodiol. A seleção dos fatores que afetam a produção e o rendimento de 1,3-propanodiol foi realizada utilizando-se o delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} , com quatro repetições no ponto central (Tabela 4.3). A análise de variância para os valores reais da concentração final de 1,3-propanodiol, ao nível de 5 % de significância, apresentou o extrato de levedura (X_3 , $p < 0,01$) e a Trypticase (X_4 , $p = 0,029$) como fatores significativos para a concentração final de 1,3-propanodiol (Tabela 4.4). Desses dois fatores, o extrato de levedura foi o que apresentou maior efeito sobre a concentração final de 1,3-propanodiol nas condições avaliadas (dados não mostrados).

Tabela 4.3 Seleção dos fatores que influenciam a concentração final e o rendimento de 1,3-propanodiol do isolado *K. pneumoniae* Ec18. Os cultivos (150 rpm, 48 h) foram realizados em meio basal FF contendo 80 g/L de glicerina bruta de acordo com o delineamento fatorial fracionado (2^{6-2}) com quatro repetições no ponto central.

Tratamento	Fatores						Respostas	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	1,3-propanodiol (g/L)	$Y_{PD/Glicerol}$ (mol/mol)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,57	0,53
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0,77	0,12
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1	3,70	0,31
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1	0,61	0,18
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	20,34	0,56
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	34,89	0,57
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1	14,05	0,60
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	27,56	0,42
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	22,09	0,61
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1	10,06	0,29
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	10,12	0,25
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	7,66	0,28
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1	33,91	0,54
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	26,03	0,42
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1	25,31	0,57
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	31,24	0,46
17	0	0	0	0	0	0	35,67	0,55
18	0	0	0	0	0	0	36,74	0,56
19	0	0	0	0	0	0	36,24	0,57
20	0	0	0	0	0	0	33,72	0,52

X_1 : pH; X_2 : temperatura; X_3 : extrato de levedura; X_4 : Trypticase; X_5 : fosfato – K_2HPO_4 e KH_2PO_4 ; X_6 : amônia – $(NH_4)_2SO_4$. $Y_{PD/Glicerol}$: rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol consumido.

Tabela 4.4 Análise de variância para os valores reais da concentração final de 1,3-propanodiol de *K. pneumoniae* Ec18 no delineamento fatorial fracionado.

Origem	GL	SQ	QM	F	p
Efeitos principais	6	1703,92	283,99	8,99	0,001
Temperatura	1	0,03	0,03	0,00	0,974
pH	1	82,78	82,78	2,62	0,131
Extrato de levedura	1	1401,39	1401,39	44,35	0,000
Trypticase	1	195,67	195,67	6,19	0,029
Fosfato	1	0,14	0,14	0,00	0,947
Amônia	1	23,90	23,90	0,76	0,401
Resíduo	12	1069,98	31,60		
Falta de ajuste	9	379,14	41,54	23,73	0,012
Erro puro	3	373,89	1,75		
Total	19	3153,05			

$R^2 = 0,8096$; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; $\alpha = 0,05$.

Segundo a análise de variância para os valores reais de rendimento de 1,3-propanodiol, ao nível de 5 % de significância, os fatores significativos são o pH (X_1 , $p < 0,001$), o extrato de levedura (X_3 , $p < 0,001$) e o fosfato (X_5 , $p = 0,018$) (Tabela 4.5). Dentre os fatores analisados, a temperatura (X_2) e a concentração de amônia (X_6) não foram significativos em relação à concentração final e ao rendimento de 1,3-propanodiol de *K. pneumoniae* Ec18 (Tabelas 4.4 e 4.5).

Tabela 4.5 Análise de variância para os valores reais de rendimento de 1,3-propanodiol de *K. pneumoniae* Ec18 no delineamento fatorial fracionado.

Origem	GL	SQ	QM	F	p
Efeitos principais	6	0,3234	0,0538	9,77	0,000
Temperatura	1	0,0972	0,0972	17,62	0,001
pH	1	0,0203	0,0203	3,68	0,079
Extrato de levedura	1	0,1537	0,1537	28,87	0,000
Trypticase	1	0,0009	0,0009	0,17	0,687
Fosfato	1	0,0411	0,0411	7,46	0,018
Amônia	1	0,0100	0,0100	1,83	0,201
Resíduo	12	0,0662	0,0055		
Falta de ajuste	9	0,0649	0,0072	16,34	0,021
Erro puro	3	0,0013	0,0004		
Total	19	0,4454			

$R^2 = 0,7647$; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; $\alpha = 0,05$.

3.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Com base nos resultados obtidos no delineamento fatorial fracionado, os fatores selecionados para descrever a natureza da superfície de resposta na região ótima de concentração final e rendimento de 1,3-propanodiol foram o pH (Z_1), o extrato de levedura (Z_2) e o fosfato (Z_3). Além disso, o tempo de cultivo foi reduzido

de 48 para 36 horas, uma vez que apenas pequenos aumentos na concentração final de 1,3-propanodiol foram observados nas últimas 12 horas de cultivo durante os experimentos no delineamento fatorial fracionado. O DCCR consistiu de um fatorial completo 2^3 com seis pontos axiais e seis repetições no ponto central (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 Descrição da natureza da superfície de resposta na região ótima de concentração e rendimento de 1,3-propanodiol de *K. pneumoniae* Ec18. Os cultivos (150 rpm, 36 h) foram realizados em meio basal RS de acordo com o DCCR com seis repetições no ponto central.

Tratamento	Fatores			Respostas	
	Z_1	Z_2	Z_3	1,3-propanodiol (g/L)	$Y_{PD/Glicerol}$ (mol/mol)
1	-1	-1	-1	21,96	0,50
2	+1	-1	-1	27,89	0,46
3	-1	+1	-1	36,26	0,56
4	+1	+1	-1	32,94	0,50
5	-1	-1	+1	12,15	0,62
6	+1	-1	+1	19,37	0,38
7	-1	+1	+1	32,51	0,50
8	+1	+1	+1	26,09	0,40
9	-1,68	0	0	29,88	0,49
10	+1,68	0	0	23,13	0,39
11	0	-1,68	0	7,78	0,62
12	0	+1,68	0	34,35	0,53
13	0	0	-1,68	34,59	0,49
14	0	0	+1,68	33,79	0,48
15	0	0	0	33,37	0,51
16	0	0	0	32,82	0,47
17	0	0	0	34,88	0,48
18	0	0	0	31,95	0,46
19	0	0	0	32,17	0,46
20	0	0	0	32,62	0,47

Z_1 : pH; Z_2 : extrato de levedura; Z_3 : fosfato – K_2HPO_4 e KH_2PO_4 .

Os modelos matemáticos, baseados nos valores reais, que melhor representam a concentração final e o rendimento de 1,3-propanodiol de *K. pneumoniae* Ec18 são dados pelas Equações 1 e 2, respectivamente:

$$\text{Equação 1: } PD = - 535,61 + 164,97*Z_1 + 20,71*Z_2 - 12,44*Z_1^2 - 0,50*Z_2^2 - 2,16*Z_1*Z_2$$

$$\text{Equação 2: } Y_{PD/Glicerol} = - 2,318 + 0,936*Z_1 - 0,100*Z_2 + 0,939*Z_3 - 0,077*Z_1^2 + 0,004*Z_2^2 + 0,012*Z_1*Z_2 - 0,139*Z_1*Z_3 - 0,018*Z_2*Z_3$$

onde: PD – concentração final de 1,3-propanodiol (g/L); $Y_{PD/Glicerol}$ – rendimento de 1,3-propanodiol (mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}); Z_1 - pH; Z_2 - extrato de levedura; Z_3 – fosfato (K_2HPO_4 e KH_2PO_4); * - multiplicação.

A análise de variância do modelo quadrático para a concentração final de 1,3-propanodiol de *K. pneumoniae* Ec18, ao nível de 5 % de significância, não apresentou efeito significativo do fosfato (Z_3), de forma que a remoção desse fator resultou em um melhor ajuste do modelo matemático (dados não mostrados). Segundo a análise de variância do modelo ajustado sem o fosfato (Z_3), ao nível de 5 % de significância, 81,85 % da variação observada nos resultados é explicada pelo modelo. Além disso, o modelo não apresenta falta de ajuste ($p > 0,05$), sendo adequado para prever a concentração final de 1,3-propanodiol (Tabela 4.7). A análise de variância do modelo quadrático para o rendimento de 1,3-propanodiol de *K. pneumoniae* Ec18, ao nível de 5 % de significância, mostrou que 76,48 % da variação observada nos resultados é explicada pelo modelo, não havendo falta de ajuste do modelo quadrático ($p > 0,05$), que é adequado para prever o rendimento de 1,3-propanodiol (Tabela 4.8).

Tabela 4.7 Análise de variância para os valores reais do modelo quadrático de concentração final de 1,3-propanodiol por *K. pneumoniae* Ec18.

Origem	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	5	1022,69	204,54	18,13	0,000
Linear	2	612,65	113,80	10,09	0,002
Quadrática	2	344,51	172,25	15,27	0,000
Interação	1	65,52	65,52	5,81	0,030
Resíduo	14	157,91	11,28		
Falta de ajuste	3	34,82	11,61	1,04	0,414
Erro puro	11	123,09	11,19		
Total	19	1180,59			

$R^2 = 0,8185$; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; $\alpha = 0,05$.

Tabela 4.8 Análise de variância para os valores reais do modelo quadrático de rendimento de 1,3-propanodiol de *K. pneumoniae* Ec18.

Origem	GL	SQ	QM	F	p
Regressão	8	0,0648	0,0081	8,72	0,001
Linear	3	0,0300	0,0048	5,20	0,018
Quadrática	2	0,0202	0,0101	10,88	0,002
Interação	3	0,0146	0,0049	5,24	0,017
Resíduo	11	0,0102	0,0009		
Falta de ajuste	6	0,0084	0,0014	3,88	0,079
Erro puro	5	0,0018	0,0004		
Total	19	0,0750			

$R^2 = 0,7648$; GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; $\alpha = 0,05$.

A partir dos modelos matemáticos para concentração final e rendimento de 1,3-propanodiol é possível estimar as respostas a partir de diferentes valores dos

fatores (pH, extrato de levedura, fosfato). Segundo o modelo quadrático para concentração final de 1,3-propanodiol, esta aumenta com a diminuição do pH e aumento da concentração de extrato de levedura, atingindo mais de 36 g/L entre o pH 6,3 e 5,6, e na concentração de extrato de levedura entre 9 e 7 g/L. Considerando-se o cultivo nas condições não otimizadas (pH 6,8, 0,5 g/L de extrato de levedura), a concentração final de 1,3-propanodiol estimada seria de até 20 g/L (Figura 4.3).

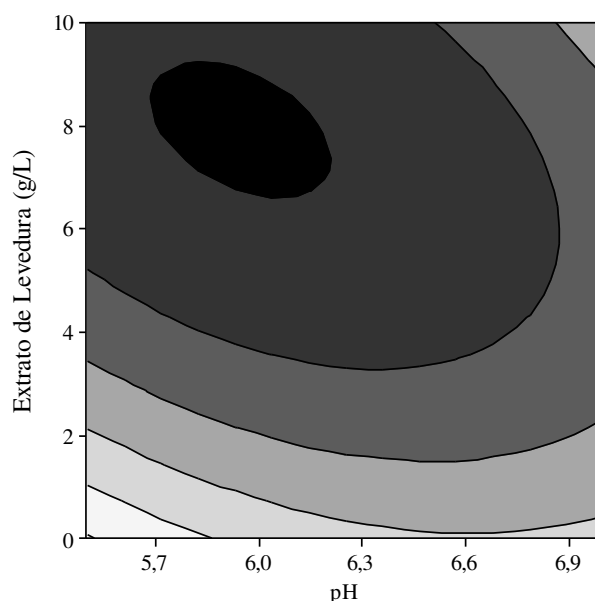


Figura 4.3 Concentração final estimada de 1,3-propanodiol para *K. pneumoniae* Ec18 cultivada em meio basal RS (35 °C, 150 rpm, 36 h) contendo 80 g/L de glicerina bruta. Concentração final de 1,3-propanodiol (g/L): □ 0 a 4; □ 4 a 12; □ 12 a 20; ■ 20 a 28; ■ 28 a 36; ■ > 36.

O modelo quadrático para o rendimento de 1,3-propanodiol inclui também o fosfato entre os fatores que afetam a resposta, sendo que na comparação entre dois fatores quaisquer, o terceiro fator deve ter seu nível fixado. Desta forma, para análise dos rendimentos de 1,3-propanodiol de *K. pneumoniae* Ec18, os fatores foram fixados nos valores mínimos (pH 5,5, 0 g/L de extrato de levedura e 0,16 de cada sal de fosfato - K_2HPO_4 e KH_2PO_4) e nos valores máximos (pH 7,0, 10 g/L de extrato de levedura e 1,6 mM de cada sal de fosfato - K_2HPO_4 e KH_2PO_4).

Para o par de fatores pH e extrato de levedura com a concentração de fosfato fixada em 0,16 mM de cada sal (K_2HPO_4 e KH_2PO_4), o rendimento de 1,3-propanodiol aumenta com o aumento do pH e da concentração de extrato de levedura, atingindo mais de 0,65 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicérol} em pH 6,5 a 6,9 com

concentração de extrato de levedura em torno de 10 g/L (Figura 4.4A). Fixando a concentração de fosfato em 1,6 mM de cada sal, o rendimento de 1,3-propanodiol aumenta com a redução do pH e da concentração de extrato de levedura, até mais de 0,65 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} em pH abaixo de 6,2 e em concentração de extrato de levedura abaixo de 2 g/L (Figura 4.4B). Considerando-se as condições de cultivo não otimizadas (pH 6,8, 0,5 g/L de extrato de levedura), o rendimento de 1,3-propanodiol em ambas as concentrações de fosfato (0,16 e 1,6 mM de cada sal) é estimada em 0,45 a 0,50 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} (Figura 4.4).

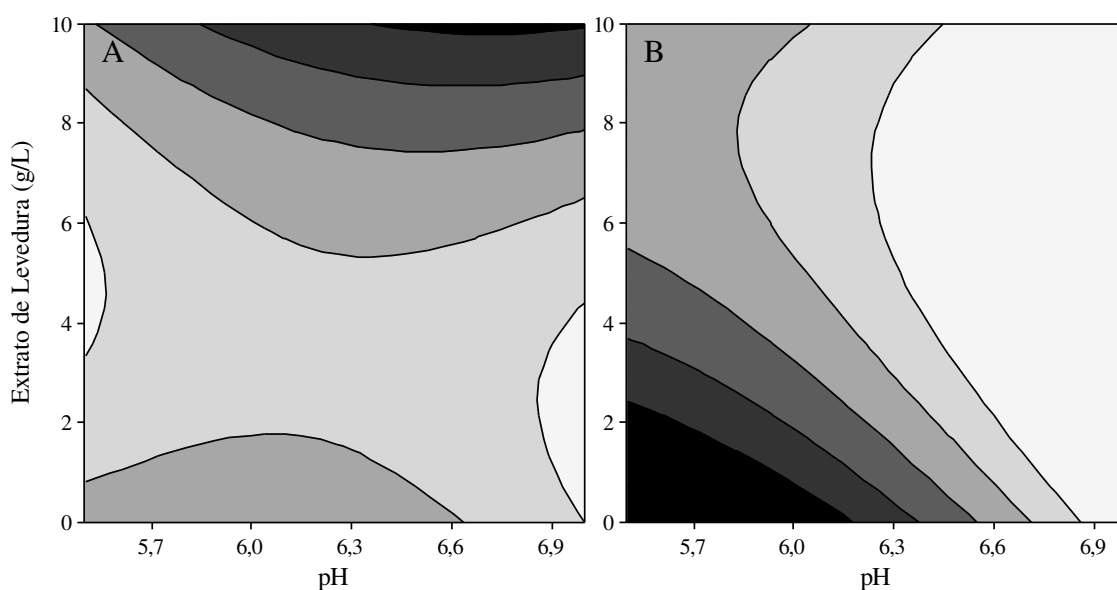


Figura 4.4 Rendimento estimado de 1,3-propanodiol para *K. pneumoniae* Ec18 cultivada em meio basal RS (35 °C, 150 rpm, 36 h) contendo 80 g/L de glicerina bruta e concentração de fosfato (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) de 0,16 (A) ou 1,6 mM (B). Rendimento de 1,3-propanodiol (mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}): □ < 0,45; □ 0,45 a 0,50; □ 0,50 a 0,55; ■ 0,55 a 0,60; ■ 0,60 a 0,65; ■ > 0,65.

Combinando-se o pH com a concentração de fosfato na ausência de extrato de levedura, o rendimento de 1,3-propanodiol aumenta até mais de 0,75 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} com a redução do pH abaixo 5,6 e com o aumento da concentração de fosfato acima de 1,3 mM de cada sal (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) (Figura 4.5A). Em cultivo na concentração de 10 g/L de extrato de levedura, o rendimento máximo estimado é de 0,60 a 0,65 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} em pH acima de 6,3 e com concentração de fosfato abaixo de 0,20 mM de cada sal (Figura 4.5B). Considerando-se as condições de cultivo não otimizadas (pH 6,8, 1,6 mM de cada sal de fosfato -

K_2HPO_4 e KH_2PO_4), o rendimento de 1,3-propanodiol ambas as concentrações de extrato de levedura (0 e 10 g/L) é estimada em 0,35 a 0,55 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} (Figura 4.5).

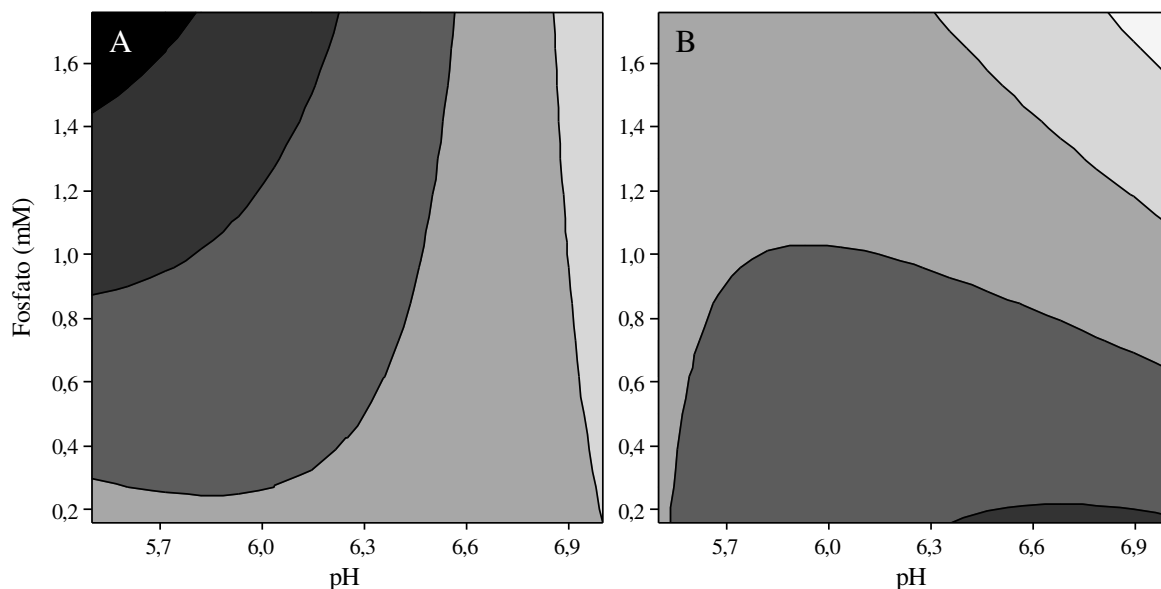


Figura 4.5 Rendimento estimado de 1,3-propanodiol para *K. pneumoniae* Ec18 cultivada em meio basal RS (35 °C, 150 rpm, 36 h) contendo 80 g/L de glicerina bruta e concentração de extrato de levedura de 0 (A) ou 10 g/L (B). Rendimento de 1,3-propanodiol (mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}): □ < 0,35; □ 0,35 a 0,45; □ 0,45 a 0,55; ■ 0,55 a 0,65; ■ 0,65 a 0,75; ■ > 0,75.

Fixando-se os valores do pH de cultivo em 5,5 e variando as concentrações de extrato de levedura e fosfato, o rendimento de 1,3-propanodiol aumenta à medida que a concentração extrato de levedura é reduzida e que a concentração de fosfato é elevada, atingindo mais de 0,70 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} nas concentrações de extrato de levedura abaixo de 1 g/L e de fosfato acima de 1,2 mM de cada sal (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) (Figura 4.6A). Considerando-se o cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 em pH 6,8, o rendimento máximo estimado é de 0,40 a 0,50 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} se o cultivo for realizado em concentração de extrato de levedura acima de 9 g/L e concentração de fosfato abaixo de 0,40 mM (Figura 4.6B). Se o cultivo for realizado nas concentrações de extrato de levedura e de fosfato utilizadas no meio basal (0,5 g/L de extrato de levedura e 1,6 mM de cada sal de fosfato), estima-se um rendimento de mais de 0,70 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} em pH 5,5 e de 0,30 a 0,40 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} em pH 6,8 (Figura 4.6).

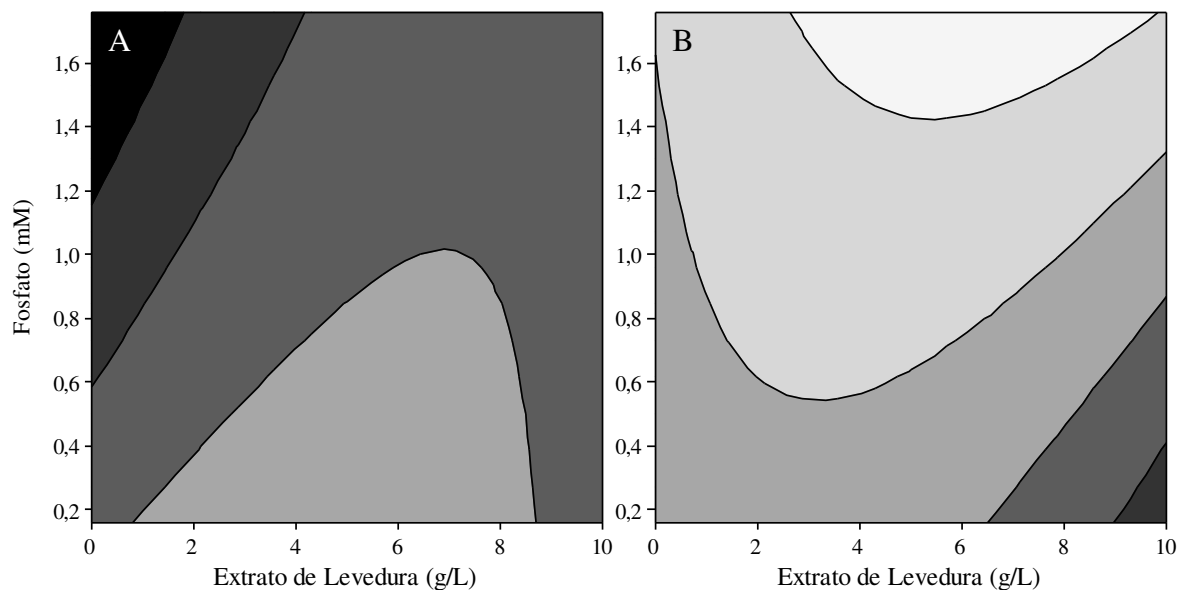


Figura 4.6 Rendimento estimado de 1,3-propanodiol para *K. pneumoniae* Ec18 cultivada em meio basal RS (35 °C, 150 rpm, 36 h) contendo 80 g/L de glicerina bruta e pH 5,5 (A) ou 7,0 g/L (B). Rendimento de 1,3-propanodiol ($\text{mol}_{1,3\text{-propanodiol}}/\text{mol}_{\text{glicerol}}$): □ < 0,30; □ 0,30 a 0,40; □ 0,40 a 0,50; ■ 0,50 a 0,60; ■ 0,60 a 0,70; ■ > 0,70.

Além das análises estatísticas, o *software* Minitab 16 oferece a ferramenta *Response Optimizer*, que permite prever os valores máximos das respostas. Considerando-se cada modelo isoladamente, os valores máximos preditos para a concentração final e o rendimento de 1,3-propanodiol são de 36,69 g/L de 1,3-propanodiol e 0,81 $\text{mol}_{1,3\text{-propanodiol}}/\text{mol}_{\text{glicerol}}$. A ferramenta *Response Optimizer* também permite analisar as duas respostas em conjunto, por meio da opção *Maximize*. Esta opção foi utilizada para estimar, em conjunto, os valores máximos de concentração final e de rendimento de 1,3-propanodiol, os quais atingiram 34,81 g/L e 0,60 $\text{mol}_{1,3\text{-propanodiol}}/\text{mol}_{\text{glicerol}}$, respectivamente. Segundo os modelos quadráticos para a concentração final e o rendimento de 1,3-propanodiol, esses valores são atingidos se o cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 for realizado em meio basal RS (35 °C, 150 rpm, 36 h) contendo 80 g/L de glicerina bruta, pH 6,1, 9,2 g/L de extrato de levedura e 0,16 mM de cada sal de fosfato (K_2HPO_4 : 29,2 mg; KH_2PO_4 : 24 mg).

Para validar os modelos matemáticos desenvolvidos, *K. pneumoniae* Ec18 foi cultivada nessas condições, produzindo 33,30 g/L de 1,3-propanodiol, com rendimento de 0,52 $\text{mol}_{1,3\text{-propanodiol}}/\text{mol}_{\text{glicerol}}$. Estes resultados foram 4 e 13 % inferiores aos previstos pelos modelos de concentração final e rendimento de 1,3-

propanodiol, respectivamente. A produção de 1,3-propanodiol acompanhou o período de crescimento de *K. pneumoniae* Ec18, ocorrendo principalmente durante as primeiras 24 horas de cultivo. A produção de biomassa por *K. pneumoniae* Ec18 foi de 3,87 g/L após 24 horas de cultivo, com redução de 4 % entre 24 e 36 horas de cultivo (Figura 4.7A).

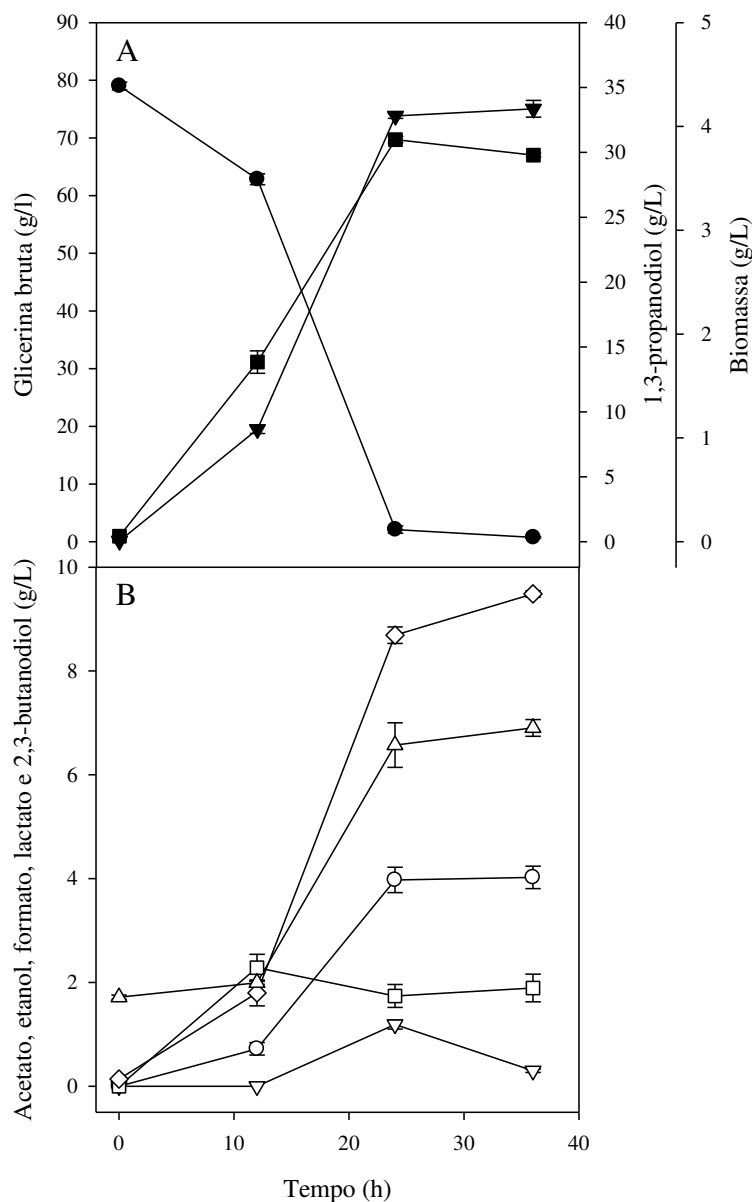


Figura 4.7 Crescimento de *K. pneumoniae* Ec18 em condições otimizadas. A: consumo de glicerina bruta (●), produção de 1,3-propanodiol (▼) e de biomassa (■). B: produção de acetato (□), etanol (△), formato (▽), lactato (○) e 2,3-butanodiol (◇). O cultivo foi realizado em meio basal RS contendo extrato de levedura (9,2 g/L), fosfato (0,16 mM de K_2HPO_4 e KH_2PO_4) e glicerina bruta (80 g/L) (37 °C, 150 rpm, pH 6,1 por 36 h) e os resultados representam médias de três cultivos.

O segundo principal produto da fermentação da glicerina bruta nas condições otimizadas foi o 2,3-butanodiol, com concentração final de 9,49 g/L. A concentração final de etanol no meio de cultivo foi de 6,90, porém, a quantidade de etanol produzida por *K. pneumoniae* Ec18 foi de 5,19, uma vez que a glicerina bruta contém etanol residual do processo de transesterificação. Produtos como lactato, acetato e formato também foram produzidos durante a fermentação da glicerina bruta por *K. pneumoniae* Ec18. A produção de acetato ocorreu principalmente durante as 12 primeiras horas de cultivo, enquanto a produção de formato foi detectada somente após esse período. Para os demais produtos, a produção seguiu o período de crescimento de *K. pneumoniae* Ec18, ocorrendo principalmente nas primeiras 24 horas de cultivo (Figura 4.7B).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, os microrganismos *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18 foram cultivados em sistema de batelada com pH do meio de cultivo controlado. Contudo, o crescimento do isolado *C. butyricum* Sb06 nessa condição foi semelhante ao observado nos experimentos em batelada sem controle do pH do meio de cultivo, nas mesmas concentrações de glicerina bruta (Capítulo III). A biomassa, em ambos os sistemas de cultivo, não ultrapassou a concentração de 1,5 g/L. Por outro lado, em sistema de batelada com controle do pH do meio de cultivo, o consumo de glicerina bruta aumentou em torno de 10 g/L e a produção de 1,3-propanodiol foi quase duas vezes maior do que o observado nos tratamentos sem controle de pH. Considerando-se as concentrações estimadas capazes de inibir totalmente o crescimento de *C. butyricum* Sb06, o 1,3-propanodiol produzido durante o cultivo em meio basal com pH controlado seria capaz de inibir em 36 e 29 % o crescimento desse clostrídio em meio contendo 40 e 80 g/L de glicerina bruta. Nessas condições, o acetato inibiria o crescimento em 1 % e o butirato em 10 e 6 %, respectivamente. Tomados em conjunto, esses resultados indicam que o crescimento de *C. butyricum* Sb06 em cultivo com controle de pH foi inibido principalmente pela produção de 1,3-propanodiol. No entanto, a formação de biomassa nos mesmos níveis do cultivo sem controle do pH do meio de cultivo sugerem também uma limitação do crescimento por algum fator nutricional ou condição de cultivo.

O controle do pH do meio de cultivo de *K. pneumoniae* Ec18 resultou em aumento da biomassa de aproximadamente 2,5 vezes, em comparação com o cultivo em sistema de batelada sem controle de pH. Aumento semelhante foi observado no consumo de glicerina bruta entre os cultivos na ausência e na presença de controle de pH, em meio contendo 40 g/L de substrato inicial. Nesta condição, a produção de 1,3-propanodiol acompanhou o crescimento de *K. pneumoniae* Ec18. Em cultivo com concentração inicial de substrato de 80 g/L e com controle de pH, o consumo de glicerina bruta foi 4,2 maior do que no cultivo sem controle de pH, sendo que aproximadamente 33 % do 1,3-propanodiol foi produzido após *K. pneumoniae* Ec18 entrar na fase estacionária do crescimento. O 1,3-propanodiol é normalmente formado durante o crescimento microbiano (GÜNZEL *et al.*, 1991; SOLOMON *et al.*, 1995). No entanto, em condições de excesso de glicerol e inibição do crescimento pode ocorrer desacoplamento entre o crescimento e o metabolismo do

glicerol, mantendo assim a produção de 1,3-propanodiol (DABROCK *et al.*, 1992). Além disso, em comparação com o cultivo sem controle de pH o rendimento de 1,3-propanodiol foi reduzido de 0,52 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol} para 0,41 mol_{1,3-propanodiol}/mol_{glicerol}, independentemente da concentração inicial de substrato.

Considerando-se o potencial inibitório estimado dos produtos da fermentação sobre o crescimento de *K. pneumoniae* Ec18, em meio contendo 40 e 80 g/L de glicerina bruta o 1,3-propanodiol produzido seria capaz de inibir em 14 e 22 % o crescimento, o acetato em 12 %, o lactato em 6 e 20 % e o etanol em 11 e 18 %, respectivamente. Comparando-se os cultivos em meio contendo 40 e 80 g/L de glicerina bruta, os produtos com menor potencial inibitório (acetato > etanol > lactato > 1,3-propanodiol) foram os que apresentaram maior aumento de produção entre a menor e a maior concentração de substrato. A alteração do perfil fermentativo de *K. pneumoniae* Ec18, com aumento da produção de lactato em relação ao etanol pode ser justificada, em parte, pela regulação da formação dos produtos da fermentação, que é realizada de modo a diminuir a inibição do crescimento (ZENG *et al.*, 1994; BIEBL *et al.*, 1999). Além disso, a produção de acetato, produto mais inibitório ao crescimento de *K. pneumoniae* Ec18, foi o que apresentou menor aumento entre os cultivos contendo 40 e 80 g/L de glicerina bruta.

Com objetivo de maximizar a produção de 1,3-propanodiol por *K. pneumoniae* Ec18 foi realizada, inicialmente, a identificação dos fatores que afetam significativamente a concentração final e o rendimento de 1,3-propanodiol e, posteriormente, a descrição da superfície na região ótima de produção e rendimento de 1,3-propanodiol. Para o primeiro objetivo, foi realizado um experimento em delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} , com quatro repetições no ponto central. Este delineamento possui número reduzido de tratamentos quando comparado com o fatorial completo 2^6 (16 contra 64), permitindo identificar os efeitos principais, mas não os efeitos da interação entre os fatores (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Os experimentos em fatorial fracionado foram analisados com base em modelo de primeira ordem (linear) ao nível de 5 % de significância ($\alpha = 0,05$), identificando-se o extrato de levedura ($p < 0,001$) e a Trypticase ($p = 0,029$) como fatores que afetam significativamente a concentração final de 1,3-propanodiol, e o pH ($p = 0,001$), extrato de levedura ($p < 0,001$) e o fosfato ($p = 0,018$) como fatores significativos para o rendimento de 1,3-propanodiol. A falta de ajuste detectado pelas análises de variância para os valores reais de concentração final e rendimento de 1,3-

propanodiol mostram que os modelos lineares não são adequados para explicar o comportamento dessas respostas, havendo provavelmente efeitos de interação entre os fatores. Para contemplar o possível efeito de interação entre fatores em um modelo que descreva o comportamento da produção e rendimento de 1,3-propanodiol foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, por meio de DCCR em fatorial completo 2^3 , com seis pontos axiais e seis repetições no ponto central. Os fatores que afetaram significativamente a concentração final e o rendimento de 1,3-propanodiol, com exceção da Trypticase, foram utilizados na metodologia de superfície de resposta. A Trypticase foi desconsiderada para o desenvolvimento do modelo matemático, pois apresentou efeito positivo semelhante ao observado pela adição de extrato de levedura, contudo, de magnitude inferior.

O DCCR permitiu desenvolver modelos polinomiais de segunda ordem (quadráticos), contemplando os efeitos principais e de interação entre o pH, a concentração de extrato de levedura e a concentração de fosfato. Este último não influenciou significativamente a concentração final de 1,3-propanodiol nas concentrações testadas, diferentemente do observado por Streekstra e colaboradores (1987). Considerando-se os modelos matemáticos gerados, os resultados dos experimentos de validação apresentaram boa concordância com os resultados preditos pelos modelos, sendo o resultado de rendimento o de maior desvio em relação ao modelo. Apesar dos desvios em relação ao modelo, a produção e o rendimento de 1,3-propanodiol em condições otimizadas foram 56 e 22 % superiores aos resultados obtidos em condições não-otimizadas. Além disso, a fermentação da glicerina bruta por *K. pneumoniae* Ec18 nas condições otimizadas pode ser realizada em apenas 24 horas, uma redução de 50 % no tempo de fermentação em relação aos experimentos de produção de 1,3-propanodiol por em condições não-otimizadas.

Esses resultados demonstram o potencial de utilização do isolado *K. pneumoniae* Ec18 para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerina bruta. Porém, para que a produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerina bruta alcance níveis competitivos, de pelo menos 100 g/L de 1,3-propanodiol (MAERVOET *et al.*, 2011), novas estratégias deverão ser testadas. Dentre elas, o cultivo em diferentes sistemas de cultivo (batelada alimentada, cultura contínua), a inativação de vias de formação de produtos que competem com o 1,3-propanodiol, a fermentação de co-substratos e a o cultivo em aerobiose com bloqueio da fosforilação oxidativa são algumas das alternativas possíveis para aumentar a produção de 1,3-propanodiol.

5. CONCLUSÕES

O crescimento de *C. butyricum* Sb06 em meio basal é limitado à concentração de aproximadamente 1,5 g/L de biomassa em condições de disponibilidade de substrato, independentemente de controle ou não do pH do meio de cultivo.

C. butyricum Sb06 fermenta parcialmente concentrações a partir de 40 g/L de glicerina bruta em meio com pH controlado.

K. pneumoniae Ec18 fermenta completamente concentrações de 40 g/L de glicerina bruta, e parcialmente concentrações de 80 g/L de glicerina bruta em meio com pH controlado.

O 1,3-propanodiol é o principal produto da fermentação de concentrações iniciais de 40 e 80 g/L de glicerina bruta por *K. pneumoniae* Ec18 em sistema de batelada com pH controlado.

K. pneumoniae Ec18 regula a formação dos produtos da fermentação de acordo com o potencial inibitório de cada produto, favorecendo a formação de produtos menos tóxicos em condições de excesso de substrato.

O pH, as concentrações de extrato de levedura e fosfato são os principais fatores que afetam a concentração final e o rendimento de 1,3-propanodiol de *K. pneumoniae* Ec18 em meio contendo 80 g/L de glicerina bruta.

A produção de 1,3-propanodiol por *K. pneumoniae* Ec18 em condições otimizadas aumenta em 56 % sua concentração final e em 22 % seu rendimento em comparação com a produção em condições não-otimizadas.

A produção de 1,3-propanodiol por *K. pneumoniae* Ec18 em condições otimizadas reduz em 50 % o tempo de cultivo em comparação com a produção em condições não-otimizadas.

Referências

BARBIRATO F, CAMARASA-CLARET C, GRIVET J, BORIES A (1995) Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. **Appl Microbiol Biotechnol** 43 (5):786-793.

BIEBL H, MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. **Appl Microbiol Biotechnol** 52 (3):289-297.

BOX GEP, HUNTER WG, HUNTER JS (1978) **Statistic for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building**. John Wiley and Sons Inc., New York, NY, USA.

CELINSKA E (2010) Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. **Biotechnol Adv** 28 (4):519-530.

CHUAH HH, BROWN HS, DALTON PA (1999) CORTERRA Poly(Trimethylene Terephthalate) - A New Performance Carpet Fiber. **Shell Chemical Company**. http://www.shellchemicals.com/chemicals/pdf/corterra/NewPerformanceCarpets.pdf?section=our_products.

DABROCK B, BAHL H, GOTTSCHALK G (1992) Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. **Appl Environ Microbiol** 58 (4):1233-1239.

FORSBERG CW (1987) Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. **Appl Environ Microbiol** 53 (4):639-643.

FRAZZETTO G (2003) White biotechnology **EMBO Reports** 4 (9):835-837.

Genencor International and DuPont expand R&D collaboration to make key biobased polymer. (2001). http://www.genencor.com/wps/wcm/connect/genencor/genencor/media_relations/news/archive/2001/gen_120301_en.htm. Accessed 20/10/2010 2010

GÜNZEL B, YONSEL S, DECKWER W-D (1991) Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m³. **Appl Microbiol Biotechnol** 36 (3):289-294.

HAO J, XU F, LIU H, LIU D (2006) Downstream processing of 1,3-propanediol fermentation broth. **J Chem Technol Biotechnol** 81:102 - 108.

HIREMATH A, KANNABIRAN M, RANGASWAMY V (2011) 1,3-Propanediol production from crude glycerol from jatropha biodiesel process. **N Biotechnol** 28 (1):19-23.

HOMANN T, TAG C, BIEBL H, DECKWER W-D, SCHINK B (1990) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Appl Microbiol Biotechnol** 33 (2):121-126.

KRAUS GA (2008) Synthetic methods for the preparation of 1,3-propanediol. **CLEAN – Soil, Air, Water** 36 (8):648-651.

LAWRENCE FR, SULLIVAN RH (1972) **Process for making a dioxane**. United States of America Patent 3687981, 08/29/1972

MAERVOET VET, DE MEY M, BEAUPREZ J, DE MAESENEIRE S, SOETAERT WK (2011) Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. **Org Process Res Dev** 15 (1):189-202.

MICKELSON MN, WERKMAN CH (1940) The dissimilation of glycerol by coli-aerogenes intermediates. **J Bacteriol** 39 (6):709-715.

OH BR, SEO JW, CHOI MH, KIM CH (2008) Optimization of culture conditions for 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using response surface methodology. **Biotechnol Bioproc E** 13 (6):666-670.

RODRIGUES MI, IEMMA AF (2005) **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora, Campinas, Brasil.

SAUER M, MARX H, MATTANOVICH D (2008) Microbial production of 1,3-propanediol. **Recent Pat Biotechnol** 2 (3):191-197.

SAXENA RK, ANAND P, SARAN S, ISAR J (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. **Biotech Adv** 27 (6):895-913.

SOLOMON BO, ZENG AP, BIEBL H, SCHLIEKER H, POSTEN C, DECKWER WD (1995) Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. **J Biotechnol** 39 (2):107-117.

STREEKSTRA H, TEIXEIRA DE MATTOS MJ, NEIJSEL OM, TEMPEST DW (1987) Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. **Arch Microbiol** 147 (3):268-275.

TEATHER RM (1982) Maintenance of laboratory strains of obligately anaerobic rumen bacteria. **Appl Environ Microbiol** 44 (2):499-501.

WILLKE T, VORLOP K (2008) Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. **Eur J Lipid Sci Technol** 110 (9):831-840.

YAZDANI SS, GONZALEZ R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Curr Opin Biotechnol** 18 (3):213-219.

ZENG AP, BIEBL H (2002) Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. **Adv Biochem Eng Biotechnol** 74:239-259.

ZENG AP, ROSS A, BIEBL H, TAG C, GÜNZEL B, DECKWER WD (1994) Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. **Biotechnol Bioeng** 44 (8):902-911.

ZHENG ZM, HU QL, HAO J, XU F, GUO NN, SUN Y, LIU DH (2008) Statistical optimization of culture conditions for 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* AC 15 via central composite design. **Bioresour Technol** 99 (5):1052-1056.

CONCLUSÕES GERAIS

O enriquecimento de amostras de líquido de rúmen em meio contendo glicerina bruta não permitiu o isolamento de culturas produtoras de 1,3-propanodiol.

O enriquecimento de amostras de solo, esgoto e dejetos suínos em meio contendo glicerina bruta permitiu o isolamento de culturas produtoras de 1,3-propanodiol e tolerantes a concentração de 5 % (v/v) desse co-produto da indústria do biodiesel.

Glicerina bruta da indústria do biodiesel pode ser utilizada como substrato para produção de 1,3-propanodiol pelas culturas *Clostridium butyricum* Sb06 e *Klebsiella pneumoniae* Ec18.

O isolado *K. pneumoniae* Ec18 apresenta maior tolerância às concentrações elevadas de glicerol e glicerina bruta do que o isolado *C. butyricum* Sb06. O isolado *K. pneumoniae* Ec18 é capaz de crescer em concentração de 200 g/L de glicerol e glicerina bruta, enquanto o crescimento do isolado *C. butyricum* Sb06 é totalmente inibido em concentrações de 160 g/L desses substratos.

1,3-propanodiol é o principal produto da fermentação de glicerol ou glicerina bruta pelos isolados *C. butyricum* Sb06 e *K. pneumoniae* Ec18.

O isolado *K. pneumoniae* Ec18 apresenta maior tolerância ao 1,3-propanodiol do que o isolado *C. butyricum* Sb06. O isolado *K. pneumoniae* Ec18 é capaz de crescer em concentração de 80 g/L de 1,3-propanodiol, enquanto o crescimento do isolado *C. butyricum* Sb06 é totalmente inibido em concentrações de 40 g/L desse produto da fermentação.

O isolado *K. pneumoniae* Ec18 apresenta maior produção de 1,3-propanodiol do que o isolado *C. butyricum* Sb06 durante cultivo em batelada com controle do pH do meio em 6,8.

O isolado *C. butyricum* Sb06 apresenta maior rendimento de 1,3-propanodiol do que o isolado *K. pneumoniae* Ec18 durante cultivo em batelada com controle do pH do meio em 6,8.

A produção e o rendimento de 1,3-propanodiol do isolado *K. pneumoniae* Ec18 em condições otimizadas de cultivo em meio contendo 80 g/L de glicerina bruta aumentou em 56 e 22 %, respectivamente, em comparação com o cultivo em condições não-otimizadas.

O isolado *K. pneumoniae* Ec18 apresenta tolerância à glicerina bruta e aos produtos de sua fermentação (1,3-propanodiol, acetato, lactato, etanol) similar ou superior a outras bactérias (*K. pneumoniae* DSM 2026, *K. pneumoniae* M5a1) descritas na literatura e utilizadas para produção de 1,3-propanodiol.

A cultura *K. pneumoniae* Ec18, isolada por enriquecimento de amostra de esgoto em meio contendo 5 % (v/v) de glicerina bruta, apresenta potencial para produção de 1,3-propanodiol a partir desse co-produto da indústria do biodiesel.

Diferentes estratégias deverão ser avaliadas para aumentar a bioconversão de glicerina bruta em 1,3-propanodiol pelo isolado *K. pneumoniae* Ec18, como o cultivo em batelada alimentada e cultura contínua, a fermentação de co-substratos, a inativação de vias de produção de co-produtos da fermentação da glicerina bruta que competem com a formação de 1,3-propanodiol e o cultivo em condições de aerobiose.