

Marcelo Merten Cruz

**Engenharia evolutiva aplicada à adaptação da bactéria  
*Klebsiella pneumoniae* ao aumento da concentração de glicerol  
em meios de cultivo**

Orientação: Prof. Dr<sup>o</sup> Marco Antônio Záchia Ayub

Coorientação: Dr<sup>a</sup> Lilian Raquel Hickert

Porto Alegre

2014

Marcelo Merten Cruz

**Engenharia evolutiva aplicada à adaptação da bactéria *Klebsiella pneumoniae* ao aumento da concentração de glicerol em meios de cultivo**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientação: Prof. Dr<sup>o</sup> Marco Antônio Záchia Ayub

Coorientação: Dr<sup>a</sup> Lilian Raquel Hickert

Porto Alegre

2014

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Marco Antônio Záchia Ayub, por todos ensinamentos, contribuição, dedicação e auxílio na elaboração deste trabalho. Não só deste, por todos esses anos, o meu muito obrigado.

Para minha coorientadora, Lílian Hickert, eu preciso fazer mais do que um agradecimento, meu eterno reconhecimento e gratidão, por toda a incansável ajuda, que mesmo quando deixou de ser “chefe” continuou apoiando, ensinando, esclarecendo e, principalmente, me acalmando. Tudo isso sempre com uma alegria contagiante.

Ao pessoal do Bioteclab palavras não são nada perto do sentimento de gratificação. As ajudas que recebi quando pensei que não iria conseguir fazer algo, os ensinamentos, ou até mesmo palavras de incentivo são modelos que eu levo daqui para sempre. Meu mais que especial agradecimento para Nicole, Daniele, Allan e Sabrina com as ajudas técnicas.

Enfim, os percalços foram muitos durante este trabalho. Tive 500 motivos para me desesperar, 501 motivos para desistir, 502 motivos para me aborrecer. Porém toda vez que algo dava errado, eram em vocês que eu pensava ao fechar os olhos e buscar força, e então eu tinha 503, 504, **505** ... motivos para sorrir e nunca desistir. Muito obrigado pelo simples fato de vocês existirem e serem meu modelo de amor saibam que todos os momentos de união foram fundamentais (e obrigado por entenderem os momentos de ausência), em que durante a companhia de vocês não existiam tristezas - afinal quem é maior que o amor? Amo vocês: Pai, mãe, irmã, família e amigos.

A Darwin.

## SUMÁRIO

INDICE DE FIGURAS.....	IV
INDICE DE TABELAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
2.1. Objetivos gerais.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. JUSTIFICATIVA.....	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1. Biodiesel.....	6
4.2. Glicerol.....	8
4.2.1. Impurezas do glicerol residual.....	10
4.3. 1,3 Propanodiol.....	11
4.4. Etanol.....	13
4.5. Engenharia evolutiva.....	13
4.6. Fermentação contínua.....	14
4.7. Crescimento de populações bacterianas.....	15
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
5.1. Glicerol residual.....	18
5.2. Microrganismo.....	18
5.3. Cinética de consumo do glicerol em agitador orbital.....	19
5.4. Cinética de consumo do glicerol em biorreatores .....	19
5.5. Cultivo contínuo.....	20
5.6. Ensaio de comparação entre as linhagens.....	21
5.7. Métodos analíticos.....	22
5.7.1. Determinação da Densidade Óptica (DO).....	22
5.7.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	22
5.7.3. Determinação dos parâmetros fermentativos.....	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24

6.1. Cinética do consumo de glicerol em agitadores orbitais.....	24
6.2. Cinética de consumo de glicerol em biorreatores.....	25
6.3. Cultivo contínuo.....	27
6.4. Comparação de ensaios em agitador orbital da linhagem antes e após o cultivo contínuo.....	32
7. CONCLUSÃO.....	35
8. BIBLIOGRAFIA.....	36
9. APÊNDICE.....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Processo de transesterificação de óleo vegetal; produção de biodiesel .....	7
<b>Figura 2.</b> Porcentagem de biodiesel produzida por cada um dos 10 maiores produtores mundiais que correspondem a 71,3% de toda produção mundial.....	8
<b>Figura 3.</b> Exemplos de produtos de interesse formados pela fermentação do glicerol.....	9
<b>Figura 4.</b> Aplicações do 1,3-propanodiol.....	11
<b>Figura 5.</b> Configuração geral do sistema de biorreatores para cultivos contínuos.....	15
<b>Figura 6.</b> Curva de crescimento microbiano.....	16
<b>Figura 7.</b> Biorreator operando em fluxo contínuo.....	21
<b>Figura 8.</b> Resultados dos cultivos em agitador orbital, após 24 horas de cultivo.....	24
<b>Figura 9.</b> Resultados dos cultivos em biorreatores, após 24 horas de cultivo.....	26
<b>Figura 10.</b> Batelada em 65 g L <sup>-1</sup> de glicerol.....	28
<b>Figura 11.</b> Cultivo contínuo em 70 g L <sup>-1</sup> de glicerol.....	28
<b>Figura 12.</b> Cultivo contínuo em 75 g L <sup>-1</sup> de glicerol.....	28
<b>Figura 13.</b> Cultivo contínuo em 80 g L <sup>-1</sup> de glicerol.....	28
<b>Figura 14.</b> Cultivo contínuo em 85 g L <sup>-1</sup> de glicerol.....	29
<b>Figura 15.</b> Cultivo contínuo em 90 g L <sup>-1</sup> de glicerol.....	29
<b>Figura 16.</b> Cultivo contínuo em 95 g L <sup>-1</sup> de glicerol.....	29
<b>Figura 17.</b> Cultivo contínuo em 100 g L <sup>-1</sup> de glicerol.....	29
<b>Figura 18.</b> Cultivo contínuo de glicerol nas 250 horas.....	30
<b>Figura 19.</b> Cultivo contínuo de glicerol e produção de 1,3-PD em 250 horas.....	31
<b>Figura 20.</b> Cultivo contínuo de glicerol e produção de etanol e ácidos orgânicos em 250 horas.....	31

<b>Figura 21.</b> Resultados dos cultivos em agitador orbital, após 24 horas de cultivo da linhagem pós-cultivo contínuo em meio de 100 g L <sup>-1</sup> de glicerol residual .....	32
<b>Figura 22.</b> . Resultados dos cultivos em bioreatores, após 24 horas de cultivo da linhagem selvagem (Blh-1) contínuo em meio de 100 g L <sup>-1</sup> de glicerol residual.....	33
<b>Figura 23.</b> Metabolismo do glicerol mostrando os principais produtos formados em duas rotas diferentes.....	39

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas do 1,3-propanodiol.....12

**Tabela 2.** Comparativo das linhagens.....33

## RESUMO

Devido as atuais crises políticas e ambientais causadas pelos combustíveis fósseis, busca-se cada vez mais fontes alternativas de energia. Os biocombustíveis, como o biodiesel, representam uma opção viável, sua produção está em expansão e como consequência há um aumento na formação de bioprodutos secundários, entre eles o glicerol.

Objetivando reduzir futuros problemas ambientais pelo acúmulo de glicerol e, conseqüentemente, tornar a produção de biodiesel mais rentável, estão sendo cada vez mais pesquisadas alternativas biotecnológicas que utilizam glicerol como única fonte de carbono para obtenção de produtos de alto valor agregado, atrativos ao mercado, como 1,3-propanodiol (1,3-PD) e etanol, através da fermentação de microrganismos. O meio contendo glicerol residual é bastante inóspito a um microrganismo, neste contexto, o objetivo deste trabalho foi promover a adaptação gradativa de *Klebsiella pneumoniae* Blh-1 ao meio contendo glicerol residual com o intuito de avaliar o efeito do processo adaptativo na produção de 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético e ácido láctico.

Após a verificação da cinética de consumo de glicerol residual, a bactéria *K. pneumoniae* Blh-1 foi cultivada em biorreatores operando em fluxo contínuo, como estratégia de engenharia evolutiva. Os biorreatores continham 1,5 L de meio de cultivo em condições anaeróbicas com pH 7, temperatura de 37 °C e agitação de 300 rpm. As entradas e saídas de meio também foram controladas através do uso de bombas com vazão constante em que o meio contendo glicerol residual estéril foi constantemente adicionado em concentrações gradativas crescentes que mudavam a cada 30 h: (g L<sup>-1</sup>): 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 e 100. Para testar o efeito da engenharia evolutiva sobre a bactéria, as linhagens armazenadas de antes e de depois do cultivo contínuo foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com 50 mL de meio contendo 100 g L<sup>-1</sup> glicerol residual e testadas quanto a eficiência de consumo e produção em agitadores orbitais a 150 rpm.

O cultivo contínuo, apesar de ter permitido a produção de 1,3-PD e etanol, provavelmente não foi suficientemente longa para permitir uma adaptação ao nível de seleção de mutantes. A linhagem de antes do cultivo contínuo apresentou melhores resultados quanto rendimento (0,47 g g<sup>-1</sup>) e produtividade (1,51 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) de 1,3-PD do que a linhagem após o cultivo contínuo (produtividade: 0,40 g g<sup>-1</sup> e rendimento 1,35 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) em agitador orbital 150 rpm, 37 °C em um meio contendo 100 g L<sup>-1</sup> de glicerol residual. Mais trabalhos são necessários para aprimorar a seleção da bactéria utilizada ao glicerol residual.

## ABSTRACT

Renewable energy sources are sought in substitution of the political and environmental problems caused by fossil fuels. Biofuels, such as biodiesel, represent a viable option for diesel alternative; its production is expanding and, as a result, there is an increased formation of secondary products, including glycerol.

Aiming to reduce future environmental problems by glycerol accumulation and, consequently, turn the biodiesel production more profitable, investigation is being carried out of biotechnological alternatives using glycerol as single carbon source to obtain high value products, attractive to the market, such as 1,3-propanediol (1,3-PD) and ethanol through microbial fermentation. The medium containing raw glycerol is quite inhospitable to a microorganism, in this context, the objective of this work was to promote the gradual adaptation of *Klebsiella pneumoniae* Blh-1 to the medium containing raw glycerol and rate the effect of the adaptive process in the production of 1, 3-propanediol, ethanol, acetic acid and lactic acid.

After evaluating the consumption of raw glycerol by *Klebsiella pneumoniae* was demonstrated, cultures were run in bioreactors operating under continuous flow, as an evolutionary engineering strategy. The experiments were performed in 2L stirred tank bioreactor fully equipped and controlled to pH 7, temperature of 37 °C, stirring of 300 rpm, and flow controls. The medium with raw glycerol was added with increasing concentrations every 30 h as follows (g L<sup>-1</sup> of glycerol) 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100. In order to test the effect of the evolutionary experiment on *K. pneumoniae*, the original strain and the strain submitted to the continuous cultivation, were both inoculated into 250 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL medium containing 100 g L<sup>-1</sup> of raw glycerol and tested for the consumption and production efficiency in rotary shaker at 150 rpm.

Although the bacterium was able to metabolize glycerol and convert it into 1,3-PD and ethanol in continuous cultivation, this was possibly not long enough to allow for a selection of true mutants. The strain before consumption showed 0,47 g g<sup>-1</sup> of yield and 1,51 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> of productivity of 1,3-PD and the strain after respectively 0,40 g g<sup>-1</sup> and 1,35 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, both in rotary shaker at 150 rpm, 37 °C, with medium containing 100 g L<sup>-1</sup> of raw glycerol. Further studies are required to improve the evolutionary selection of this bacterium towards raw glycerol.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso intensivo do petróleo como combustível provoca um desequilíbrio ambiental, uma vez que a combustão de seus derivados é a principal responsável pelas alterações climáticas provocadas pelos gases do efeito estufa liberados na atmosfera (DA SILVA *et al.*, 2009). Atualmente, devido as atuais crises políticas ambientais causadas pelo petróleo e pelas matrizes energéticas com fontes finitas de energia, busca-se cada vez mais fontes alternativas de energia e estratégias de aproveitamento das fontes já existentes (HAVLÍK *et al.*, 2011).

Os biocombustíveis, como o biodiesel, representam uma alternativa viável e menos prejudicial ambientalmente em relação aos combustíveis fósseis. O biodiesel, em geral, é obtido através de craqueamento, esterificação ou transesterificação. O processo consiste na reação entre o material graxo, óleo vegetal ou gordura animal, e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador (LIN *et al.*, 2011). Sua produção está em expansão e como consequência, há um aumento na formação de bioprodutos secundários, entre eles, o glicerol (BERNAL *et al.*, 2012).

O glicerol é gerado em grandes quantidades durante a síntese de biodiesel e é caracterizado por ser o principal subproduto deste processo. O glicerol corresponde a aproximadamente 10 % do volume total de biodiesel produzido (DASARI *et al.*, 2005).

Apesar das inúmeras aplicações industriais, como aditivos para indústria de alimentos, química e farmacêutica, o glicerol residual encontra-se impuro e sua purificação não é economicamente viável. Por outro lado, o descarte do glicerol sem nenhum tipo de tratamento é um problema para a indústria e para o ambiente (BRIGANTI, 2013).

Objetivando reduzir futuros problemas ambientais pela acumulação do glicerol e, conseqüentemente, tornar a produção de biodiesel mais rentável, estão sendo cada vez mais pesquisadas estratégias biotecnológicas que utilizem glicerol como única fonte de carbono para obtenção de produtos de maior valor agregado, atrativos ao mercado (RIVALDI, *et al.*, 2007).

A fermentação do glicerol tem sido estudada principalmente por microrganismos procariontes, principalmente do gênero *Klebsiella*, *Citrobacter*,

*Enterobacter* e *Clostridium*. A assimilação do glicerol por tais microrganismos tem sido relacionada à produção de 1,3-propanodiol (1,3 PD). Entretanto outros importantes produtos biotecnológicos podem ser obtidos através da bioconversão do glicerol tais como: PHAs (polihidroxi-alcanoatos), ácido cítrico, bioplásticos e etanol (BIEBL *et al.*, 1998).

O 1,3-propanodiol (1,3-PD) é um monômero viscoso, incolor, não é inflamável e apresenta baixa toxicidade, sua fórmula química é  $C_3H_8O_2$ . É um composto miscível em água, álcoois e éteres (KAUR *et al.*, 2012). O 1,3-PD é um importante intermediário químico, potencialmente usado na fabricação de polímeros (poliésteres, poliéteres, poliuretanos, entre outros), cosméticos, lubrificantes, medicamentos e como um intermediário na síntese de componentes heterocíclicos (MENZEL *et al.*, 1997). Polímeros gerados por 1,3-PD têm várias características vantajosas, tais como boa estabilidade, elasticidade e biodegradabilidade (HORNG *et al.*, 2010).

Dentre os bioprodutos oriundos da fermentação do glicerol destaca-se o etanol, principal biocombustível do planeta, um dos mais promissores substituintes da gasolina e de importância econômica de consumo interno e exportativo para o país, que se destaca na sua produção, alcançando 30 % do total mundial (KOHLHEPP, 2010).

Para que um microrganismo se desenvolva em um meio contendo glicerol residual como única fonte de carbono, é necessária uma via metabólica específica deste. Para este fim, uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* utilizada foi isolada, estudada e caracterizada por ROSSI e colaboradores em 2012 como uma bactéria com habilidade de converter simultaneamente glicerol a 1,3-PD e etanol. O glicerol residual possui uma grande quantidade de sais de cloreto, e através da própria fermentação, geram-se inibidores do processo fermentativo (como o próprio etanol e ácidos orgânicos produzidos), o qual podem dificultar o crescimento microbiano e a formação dos produtos de maior valor agregado (ITO *et al.*, 2005).

A adaptação por engenharia evolutiva aplicada à *K. pneumoniae* permite a obtenção de cepas com maior tolerância aos inibidores presentes no glicerol residual e com maior eficiência na fermentação. As cepas adaptadas, cultivadas em biorreatores de crescimento contínuo com condições controladas, podem evoluir ao longo do tempo e deslocar a população original como resultado do processo de

seleção natural (SAUER, 2001). A adaptação por seleção natural está relacionada com a reprodução de células que possuem características vantajosas sobre as demais quando usada pressão por seleção adequada (ZHU *et al.*, 2013). A concentração crescente do glicerol exerce a pressão de seleção em *K. pneumoniae* resultando na reprodução de células adaptadas que garantem maior adaptação a porções maiores de glicerol, objetivando maior aproveitamento deste e mais eficiência na conversão de produtos.

## **2. OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a adaptação da bactéria *K. pneumoniae* Blh-1 através de engenharia evolutiva, cultivada em meio contendo glicerol inserido de modo crescente na fermentação, com intuito de aumentar a produtividade de 1,3-PD, etanol e outros produtos de alto valor agregado.

Além de Determinar e otimizar as condições ideais de fermentação através do aumento gradual da concentração de glicerol residual.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Visando minimizar atuais problemas ambientais e criar uma alternativa de maior aproveitamento de um subproduto gerado na produção do biodiesel, o glicerol residual, busca-se adaptar, através de engenharia evolutiva, a bactéria *Klebsiella pneumoniae* Blh-1, possibilitando um aumento na conversão do glicerol a, principalmente, 1,3-propanodiol e, também, etanol e ácidos orgânicos. Além de, almejar uma maior resistência deste microrganismo aos inibidores no meio.

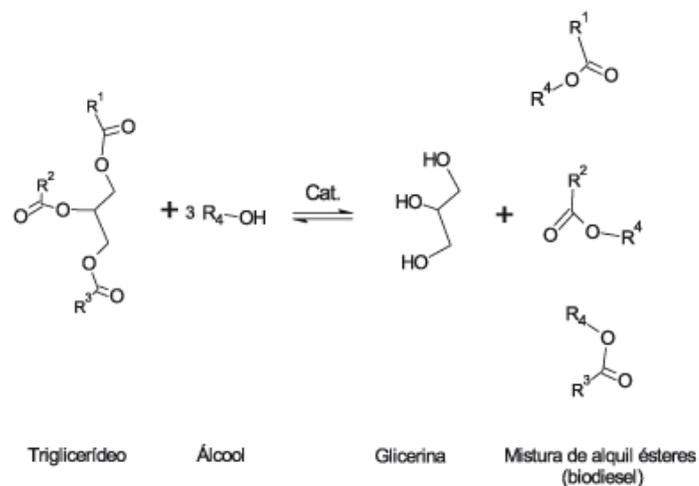
## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### **4.1. Biodiesel**

Conforme o artigo 4<sup>a</sup> da Lei nº 11.097/2005, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira e modificou o art. 6º, XXV da Lei nº 9.478/97, o biodiesel é um “combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”.

Os atuais esforços em relação a redução da poluição ambiental e a crise energética têm estimulado o mercado mundial de biocombustíveis. A economia global tem mantido o seu crescimento industrial e a demanda por energia limpa e recursos renováveis encontra-se em contínuo aumento (BILGEN et al., 2008). A utilização dos biocombustíveis, em geral apresenta destacáveis benefícios, incluindo sustentabilidade, energia renovável, o que diminui a dependência do petróleo, redução dos gases estufa, contribuindo para a redução da poluição atmosférica desenvolvimento regional, social e agrícola, podendo-se destacar ainda seu alto ponto de fulgor e excelente lubricidade (DEMIRBAS, 2007). Assim, o uso de biocombustíveis, como o biodiesel, tem sido visto como uma alternativa viável.

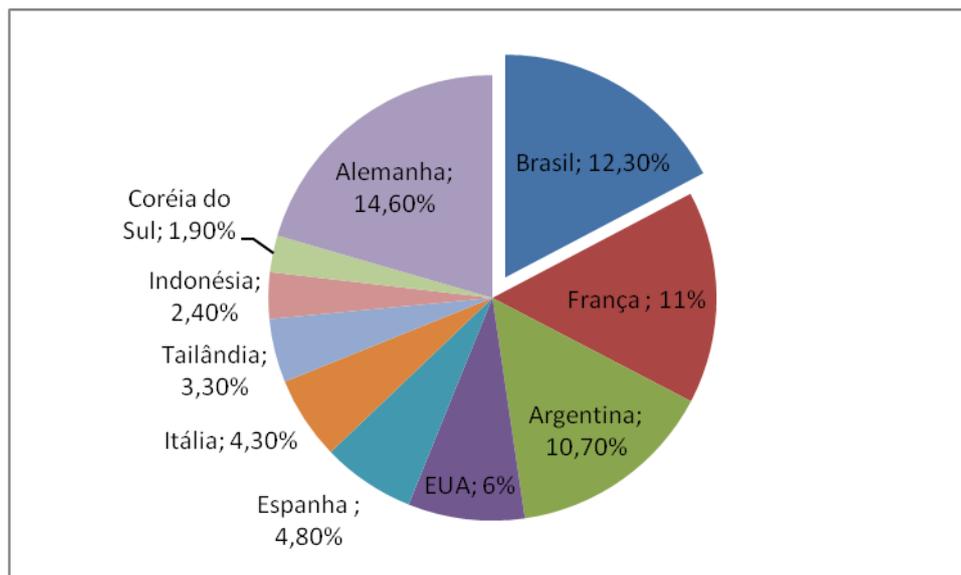
O biodiesel normalmente é produzido a partir da reação de um óleo que pode ser vegetal ou gordura animal, com um álcool, normalmente metanol ou etanol, na presença de um catalisador, que resulta na formação de glicerina e biodiesel. Esse processo é conhecido como transesterificação (Figura 1). Além da transesterificação, existem outros processos nos quais também é possível a obtenção de biodiesel, porém não apresentam o mesmo rendimento, por exemplo, o craqueamento, a esterificação e a hidroesterificação (LÔBO et al., 2009).



**Figura 1.** Processo de transesterificação de óleo vegetal; produção de biodiesel (LÔBO *et al.*, 2009).

A cadeia produtiva do biodiesel gera uma série de subprodutos, como glicerina, torta, farelo, baga, entre outros. Esses produtos se corretamente aproveitados, podem agregar valor e gerar outras fontes de renda importantes para os produtores, e ainda, serem utilizados como fontes alternativas de energia e de alimentação animal (SOUZA, 2013).

O Brasil é o segundo maior produtor de biodiesel do mundo (Figura 2). Com o avanço do programa nacional do biodiesel no ano de 2013 foram fabricados 2,9 bilhões de litros do biocombustível e a produção estimada para 2020 é de 14,3 bilhões de litros (ANP, 2013), mas há um fator que preocupa frente a este exacerbado crescimento: o destino do glicerol excedente. Uma vez que, para cada tonelada de biodiesel obtido são gerados 100 kg de glicerol, provocando efeitos adversos à economia do biodiesel (BOWKER *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Porcentagem de biodiesel produzida por cada um dos 10 maiores produtores mundiais que correspondem a 71,3% de toda produção mundial (ALMEIDA *et al.*, 2012).

## 4.2. Glicerol

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol descoberto, no final do século XVIII, resultado de uma mistura aquecida de óxido de chumbo (PbO) e óleo de oliva (BEATRIZ *et al.*, 2011). Na natureza, o glicerol é encontrado em alguns vegetais tais como soja, mamona, babuçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê e pinhão (LAGES; LUCAS, 1997); outra fonte encontrada na natureza é a gordura de origem animal. Em sua forma pura, o glicerol, apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico com sabor doce, solúvel em água e álcool e insolúvel em éter e em clorofórmio (WANG *et al.*, 2001).

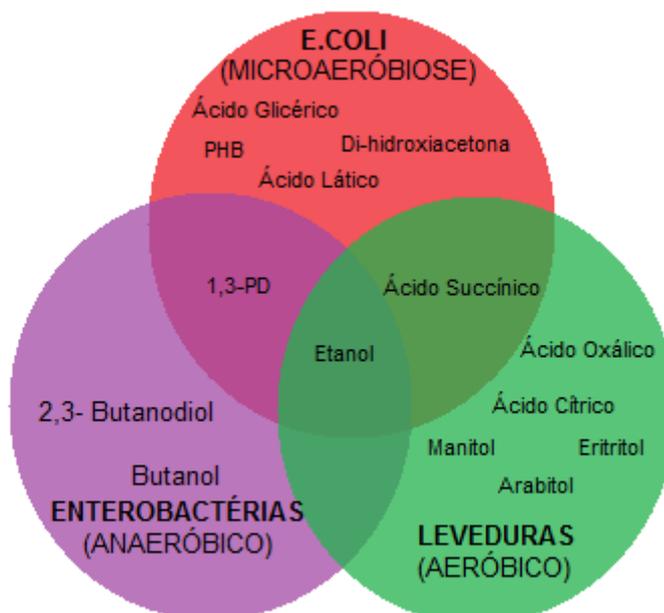
O glicerol pode ser aplicado na fabricação de diversos produtos, tais como remédios, indústria alimentícia, cerveja, vinhos, tabaco, resinas alquílicas, polioli-poliéster, celofane e explosivos. As características físicas, químicas e nutricionais dependem da fonte oriunda de ácido-graxo (animal ou vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel. É convencional considerar glicerol puro, também chamado de glicerina, o que tenha grau de pureza acima de 95 % (ROSSI *et al.*, 2012).

A glicerina constitui uma fonte de matéria prima para produtos de alto valor agregado, como polímeros, obtidos através de conversão química e bioquímica,

aditivos para combustíveis, como ésteres e éteres de glicerina, antibióticos, analgésicos e vermícidias (YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

Porém este uso está vinculado ao alto grau de pureza do glicerol. Para obter grau de pureza superior a 95 % o glicerol deve ser submetido a destilação, mas o custo é elevado. Por outro lado, o glicerol, abaixo desse grau de pureza, o dito bruto, contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio o que viabiliza o uso de microorganismos para fermentá-lo (LIU *et al.*, 2007).

A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de alto valor agregado como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização e aproveitamento da produção de biodiesel (ITO *et al.*, 2005). O glicerol é um composto considerado fundamental dentro do sistema metabólico de certos microorganismos, ele atua como precursor de numerosos compostos e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (Figura 3). Entretanto, este tipo de glicerol não puro tem como desvantagem em sua utilização em processos fermentativos a grande quantidade de sais de cloreto presente, oriundos da produção de biodiesel via catálise básica. Este tipo de sal é um inibidor do processo fermentativo e pode interferir no crescimento microbiano e assim diminuir a formação de produtos de interesse (ITO *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Exemplos de produtos de interesse formados pela fermentação do glicerol (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A fermentação do glicerol tem sido estudada principalmente em bactérias, principalmente do gênero *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Clostridium*. A

assimilação do glicerol por tais microrganismos tem sido associada à produção de 1,3-propanodiol, etanol, ácido lático e ácido acético (SOUZA, 2013).

#### **4.2.1. Impurezas do glicerol residual**

O glicerol é uma promissora e abundante fonte de carbono para diversas aplicações na indústria microbiológica, entretanto o uso deste que é classificado como residual, sem purificação prévia em processos fermentativos de bactérias é dificultado em comparação ao glicerol puro. Impurezas neste material influenciam rotas bioquímicas na bactéria e podem limitar a eficiência de produção de metabólitos (DESBOIS; SMITH, 2010).

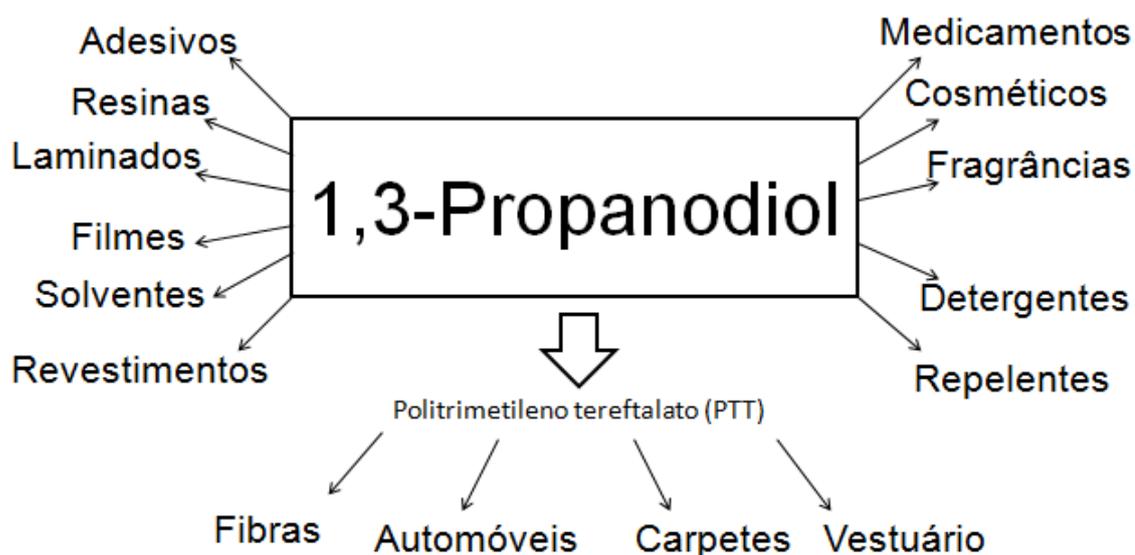
Glicerol residual consiste basicamente em: glicerol, álcool (normalmente metanol), sais inorgânicos (resíduos de catálises), ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis não reagentes, metil ésteres e água. A composição do glicerol residual depende, principalmente, do tipo de óleo usado na produção de biodiesel, das condições do processo de transesterificação e das condições da separação das fases apolar e polar na transesterificação (HÁJEK; SKOPAL, 2010).

Impurezas no glicerol interagem umas com outras o que gera um processo sinérgico. O álcool influencia a membrana celular e aumenta sua permeabilidade. Altas concentrações de sais monovalentes diminuem as forças de Van der Waals na membrana lipídica e causa a dilatação da membrana celular. E este crescimento tem um efeito negativo na barreira energética na camada lipídica da membrana e altera o curso dos processos bioquímicos nas células, o que pode influenciar o transporte de nutrientes. Os ácidos graxos livres (linoleico, esteárico e oleico) têm grande influência na síntese de metabólitos. Ácidos graxos são componentes da membrana celular e a presença deles causa um distúrbio no processo de síntese metabólica (SAMUL *et al.*, 2014).

Apesar de todas as impurezas do glicerol residual, é economicamente vantajoso usá-lo em comparação ao purificado. Otimizações no processo fermentativo são estudadas para minimizar o fator das impurezas, evitar a fase de purificação e conseguir uma produtividade alta. Engenharia metabólica e/ou engenharia evolutiva do microrganismo fermentador são exemplos de estratégias de melhoramento (POTT *et al.*, 2014).

### 4.3. 1,3-Propanodiol

O 1,3 propanodiol (trimetileno glicol ou propileno glicol) é um composto alifático, linear, líquido, incolor, inodoro, inócuo, miscível em água, álcool e éter (Figura 4). O 1,3-PD foi descoberto em 1881 pelo químico August Freund em cultura mista de fermentação contendo *Clostridium pasteurianum*. Porém o interesse industrial por este intermediário químico é relativamente recente, surgindo depois que foram desenvolvidos processos para sua síntese química em larga escala, principalmente com o advento do biodiesel, pois sua produção gera resíduos de glicerol, a partir do qual 1,3 propanodiol pode ser produzido (SILVA et al., 2014).



**Figura 4.** Aplicações do 1,3-Propanodiol (SILVA et al., 2014).

O 1,3-PD pode ser usado na produção de cosméticos, como anti-congelante e como fluido para transferência de calor, bem como base em soluções para refrigeração de motores que requerem estabilidade em ampla escala de temperaturas. Também pode ser aproveitado na fabricação de resinas baseadas em poliésteres e aditivo na química de uretano, em áreas como a automotiva, engenharia de polímeros, fibras e revestimento. As propriedades físico-químicas deste produto são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas do 1,3-propanodiol (SILVA *et al.*, 2014).

Nome IUPAC	Propan-1,3-diol
Outros Nomes	1,3-propanodiol, trimetilenoglicol, 1,3-di-hidroxi-propano
Número CAS	504-63-2
Fórmula Molecular	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Solubilidade em água	100 g L <sup>-1</sup>
Massa Molar	76.09 g mol <sup>-1</sup>
Temperatura de ebulição	210-212 °C
Temperatura de fusão	-28 °C
Índice de refração	1,436 (20 °F)
Densidade	1,0597 g cm <sup>-3</sup>
Calor específico	0,53 BTU/lb/°F
Viscosidade	52 cp
Temperatura de fulgor	131 °C
Temperatura de autoignição	405 °C
Pressão de vapor	0,08 mmHg

No passado 1,3-PD era produzido somente por métodos de engenharia química e por dois métodos: o primeiro, através da hidratação da acroelina, o segundo, através da hidroformilação do etileno. A síntese química, entretanto, tem algumas desvantagens, tais como: requer altas pressões, altas temperaturas e presença de catalisadores. Consequentemente, o custo de produção é muito caro. Uma alternativa viável à síntese química é a conversão microbiana, este método é atrativo, pois pode utilizar diferentes matérias-primas para a produção e não gera subprodutos tóxicos (SILVA *et al.*, 2014).

Contudo, a maior limitação para a produção microbiana industrial de 1,3-PD é o relativo alto custo de alguns substratos, como fonte de carbono, por exemplo, glicose. Ainda busca-se uma solução economicamente e ambientalmente atrativa

para produção de 1,3-propanodiol. Uma alternativa pode ser o uso de glicerol residual como substrato para a fermentação (MU *et al.*, 2008).

#### **4.4. Etanol**

O etanol é o biocombustível mais produzido do mundo. Uma crucial fonte que pode substituir gradativamente os combustíveis fósseis com ainda favorecimento ambiental, por ser renovável. No Brasil o etanol é primordialmente produzido por cana de açúcar, nos Estados Unidos provém do milho, principalmente, e na União Européia da beterraba (DA SILVA *et al.*, 2009).

O Brasil, não apenas por ser o detentor de uma consolidada tradição na produção, distribuição e uso de álcool etílico (direto ou misturado na gasolina), como também por dispor de excelentes condições para um aumento em grandes proporções, na fabricação desse produto e tornar-se o grande supridor mundial para outros países interessados, tornou-se a referência internacional nas discussões sobre a matéria. (CONAB, 2008).

A súbita importância do álcool etílico combustível está sendo ocasionada de um lado pelo crescente interesse internacional e, de outro, pelo aumento da demanda potencial associada à forte expansão da frota de veículos híbridos (que podem ser abastecidos com álcool e gasolina) (CONAB, 2008). Paralelamente, com o aumento da produção de biodiesel no mundo, a produção de etanol a partir de glicerol se tornará interessante. Uma vez que, o etanol produzido pode ser utilizado na transesterificação do biodiesel contribuindo para o desenvolvimento de processos que possam permitir um maior e praticamente cíclico aproveitamento ambiental (ROSSI *et al.*, 2013).

#### **4.5. Engenharia evolutiva**

O termo engenharia evolutiva foi usado pela primeira vez em 1996 por BUTLER e colaboradores aplicando uma técnica de seleção contínua para isolamento de bactérias resistentes à estreptomicina. Diferentes estratégias de engenharia evolutiva têm sido empregadas nos últimos anos para designar uma

estratégia de melhoramento de microrganismos que é baseado no princípio da variação e seleção natural, conforme proposto por Charles Darwin em 1859 em sua Teoria da Origem das Espécies, em que consiste em selecionar os organismos mais adaptados a determinada condição imposta pelo meio, e assim sobreviver e deixar descendentes (SAUER, 2001).

Assim, desde que seja possível impor um meio de cultura selecionador, por assim dizer, adequado em laboratório, torna-se viável induzir uma pressão seletiva visando selecionar um fenótipo desejado ao microrganismo de estudo. Esta estratégia representa uma alternativa ou uma complementação à engenharia metabólica que se baseia em modificações genéticas dirigidas na busca de um fenótipo desejado, diferente da Engenharia Evolutiva, que busca o fenótipo desejado através da imposição de uma ou mais pressões seletivas, contando com a ocorrência de mutações e de seleção natural. A engenharia evolutiva é realizada, através de experimentos longos com populações do microrganismo em estudo, em que através de várias gerações transcorrem uma maior probabilidade de ocorrer mutações (ELENA; LENSKI, 2003).

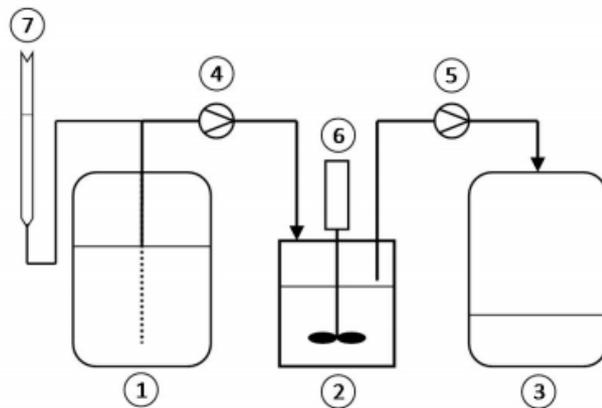
#### **4.6. Fermentação contínua**

Denominam-se biorreatores, reatores bioquímicos ou ainda reatores biológicos, os reatores químicos nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores. Esses biocatalisadores podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais).

Biorreatores nos quais as reações ocorrem na ausência de células vivas, são tipicamente reatores enzimáticos. Já os que ocorrem na presença de células vivas são mais conhecidos e com o uso bastante difundido. Os reatores com microrganismos estão sendo empregados desde a década de 1940 para a produção industrial de uma grande diversidade de produtos, tais como: enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos, solventes, ou ainda no tratamento de resíduos orgânicos industriais ou domésticos.

O processo de fermentação contínua caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante no

biorreator. O volume de reação é mantido constante através da retirada contínua de meio fermentado (Figura 5).



**Figura 5.** Configuração geral do sistema de biorreatores para cultivos contínuos: 1) Frasco contendo meio de alimentação estéril; 2) Biorreator; 3) Frasco para coleta do meio de saída; 4) Bomba peristáltica de alimentação de meio; 5) Bomba peristáltica pra retirada de meio; 6) Sistema de agitação; (Basso, 2011).

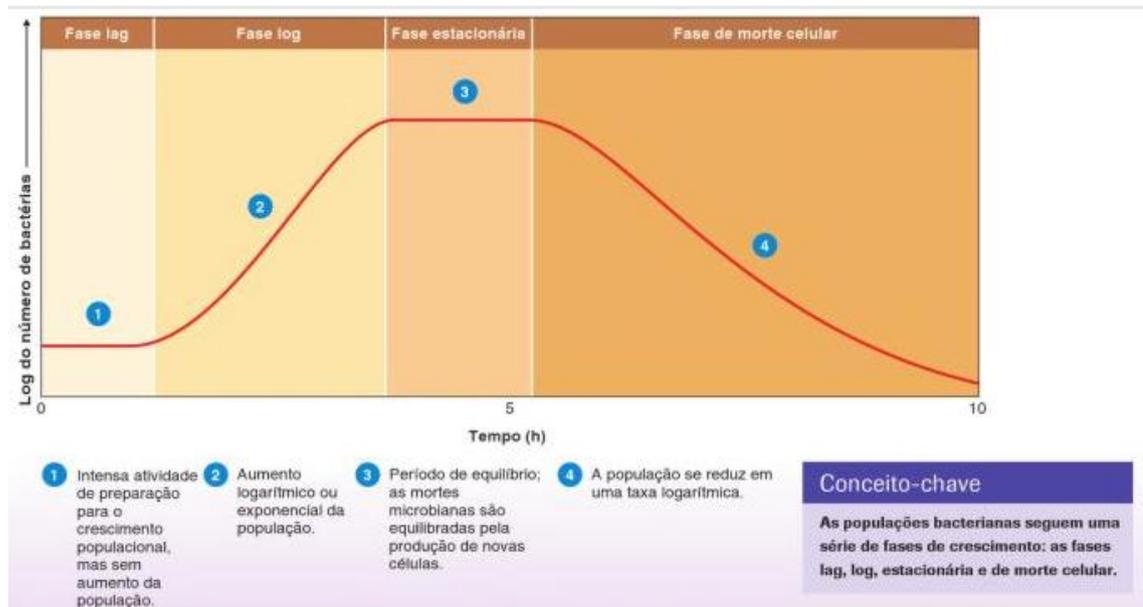
A manutenção de volume constante de líquido no reator é de primordial importância, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente. Nesta condição as variáveis do estado, tais quais concentração de células, concentração de substrato limitante e de produto permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema.

O processo contínuo caracteriza-se por ser um sistema que pode operar por longos períodos de tempo em estado estacionário, o que garante como vantagem em relação ao processo descontínuo tradicional é uma redução dos tempos mortos e não-produtivos que gera um aumento de produtividade. Outro fato positivo é a manutenção das células em um mesmo estado fisiológico, o que torna o processo contínuo uma excelente ferramenta para estudos de mecanismo de regulação metabólica. Por outro lado, um cuidado que deve se ter quanto a esse processo é a maior probabilidade de contaminações (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

#### 4.7. Crescimento de populações bacterianas

O crescimento microbiano é definido como um aumento do número de células em uma população (Figura 6), onde durante a divisão celular uma célula transforma-se em duas. Durante o tempo necessário para que esse processo ocorra, que é

conhecido como tempo de geração, o número total de células e a biomassa duplicam-se. Os tempos de geração variam amplamente entre os microrganismos. Em geral, a maioria das bactérias apresenta tempos de geração menores que a maioria dos eucariontes microbianos. O tempo de geração de um dado organismo em cultura depende do meio e das condições de incubação utilizados.



**Figura 6.** Curva de crescimento microbiano (Tortora *et al.*, 2010).

O aumento populacional, em que o número de células é duplicado durante um intervalo de tempo constante, é denominado crescimento exponencial. Durante o crescimento exponencial, inicialmente o aumento no número de células é relativamente lento: fase de adaptação. Posteriormente, o crescimento torna-se cada vez mais acelerado e quando há limitação do meio de cultura e/ou um produto de excreção do microrganismo se acumula no meio (inibindo o crescimento) o organismo entra em fase estacionária, em que não há crescimento nem diminuição no número de células. Mas há manutenção das funções vitais, incluindo metabolismo energético e processos biossintéticos. Se uma população que atingiu a fase estacionária permanecer em cultivo, as células poderão permanecer vivas e metabolizando, mas eventualmente morrerão. Atingindo, assim, a fase de morte (MADIGAN *et al.*, 2010).

O tempo de geração de uma cultura em crescimento exponencial pode ser calculado a partir da inclinação da função linear obtida em um gráfico semilogarítmico

de crescimento exponencial. Sendo assim, o cálculo de estimativa do número de gerações é mostrado na equação (1).

$$g = \ln 2 / \mu \quad (1)$$

Em que  $g$  é a estimativa do tempo de duplicação, logo tempo de geração. o  $\mu$  é a estimativa da taxa específica de crescimento da população.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1. Glicerol residual**

O glicerol residual foi fornecido por Bianchini S.A., uma indústria de biodiesel localizada em Canoas (RS), com produção obtida através da transesterificação de óleo degomado de soja com metanol ou metilato de sódio. Este contém (baseado na massa total): 82,97% de glicerol, 10,62% de umidade; 5,66% de cinzas; 0,75% de monoacilgliceróis; e, 5,72% de NaCl. O apêndice 2 mostra o laudo recebido da empresa com as especificações do produto.

### **5.2. Microrganismo**

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Klebsiella pneumoniae* BLh-1, isolada e caracterizada a partir de efluente industrial de soja como produtora de 1,3-PD (ROSSI *et al.*, 2012). Isolados desta bactéria são mantidos na Coleção de Culturas Microbiológicas do BiotecLab (ICTA, UFRGS). A cultura foi estocada em tubos de microcentrífuga contendo 50 % de glicerina a -80 °C.

O meio utilizado para plaqueamento e armazenamento foi o meio Agar Luria-Bertani (LB) em placas de Petri. O meio utilizado para o crescimento e para o cultivo de microrganismo foi otimizado pelo grupo em ROSSI *et al.*, 2012.

O meio inicial é composto por: 65 g L<sup>-1</sup> de glicerol, 5 g L<sup>-1</sup> de Extrato de Levedura, 5 g L<sup>-1</sup> de peptona, 7 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mL L<sup>-1</sup> de solução de elemento traço e pH igual a 7. A solução de elemento traço, por sua vez, contém: (g L<sup>-1</sup>): 70 mg ZnCl<sub>2</sub>; 0,1 g MnCl<sub>2</sub>. 4 H<sub>2</sub>O; 60 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,2 g CoCl<sub>2</sub>. 2 H<sub>2</sub>O; 20 mg CuCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O; 25 mg NiCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O; 35 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2 H<sub>2</sub>O; 0,9 mL HCl (9 M).

### **5.3. Cinética de consumo do glicerol em agitador orbital**

Para avaliar o consumo do glicerol pela bactéria *K. pneumoniae* Blh-1 e poder mensurar qual o tempo de cultivo da bactéria e quantas gerações são necessárias para engenharia evolutiva efetuaram-se cultivos em agitador orbital. Ou seja, realizou-se este experimento para analisar qual a estimativa da taxa específica de crescimento de *K. pneumoniae* Blh-1 em meio de glicerol residual em agitador orbital, extrapolando posteriormente o resultado e estimando-se quantas horas seriam necessárias para atingir um número satisfatório de gerações em um cultivo contínuo; e também, para poder comparar os resultados obtidos em agitadores orbitais com as linhagens após o cultivo contínuo.

Para o inóculo, frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio estéril foram pré-inoculados com colônia isolada de placas de petri, contendo meio LB e cultivados, primeiro, por 12 h a 37 °C. E, novamente, pré-inoculados (10 % do volume total) e cultivados por mais 2 horas para atingir DO 1,0 (densidade óptica, absorbância) a 600 nm. Para então, ocorrer o inóculo de 10 % do meio total. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e as amostras foram retiradas a cada 30 min nas primeiras 2 h (somente para leitura da absorbância em 600 nm e confecção da curva de crescimento), depois a cada 2 h de cultivo até 10 horas e, finalmente, no tempo de 24 h. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro e depois filtradas, guardadas e congeladas para posterior análise.

### **5.4. Cinética de consumo do glicerol em biorreatores**

Para avaliar o consumo do glicerol pela bactéria *K. pneumoniae* Blh-1 e poder mensurar qual o tempo de cultivo da bactéria e quantas gerações são necessárias para engenharia evolutiva foi realizado outro teste de consumo, desta vez em biorreatores para alcançar a escala e a proporção em que o cultivo contínuo foi realizado. Ou seja, a estimativa da taxa específica de crescimento de *K. pneumoniae* Blh-1 em meio de glicerol residual em batelada para depois estrapolar o resultado e estimar quantas horas seriam necessárias para atingir um número satisfatório de gerações em um cultivo contínuo. Os biorreatores (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Alemanha) possuem volume total de 2 L e o volume de

trabalho foi 1,5 L.. Para o inóculo e pré-inóculo foi realizado procedimento igual ao item **5.3** corrigido para volumes maiores.

O experimento foi conduzido em duplicata, a temperatura foi mantida a 37 °C, o pH foi mantido 7 através de bombeamento contínuo de NaOH 10M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M. A agitação foi de 300 rpm. As amostras foram retiradas de 2 em 2 h nas primeiras 10 h de cultivo e, então, nos tempos de 24 h. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro e depois filtradas, guardadas e congeladas para análise.

### **5.5. Cultivo contínuo**

As fermentações foram realizadas em biorreatores de cultivo submerso com capacidade total para 2 L (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Alemanha), contendo 1,5 L de meio sob condições anaeróbias, com controle de pH através da adição de NaOH 10 M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M. Para as fermentações contínuas os biorreatores operaram em fluxo contínuo, através do uso de bombas com vazão controlada a uma taxa de diluição de 0,03 h<sup>-1</sup>, ligada a frascos dumentadores contendo meio com glicerol residual estéril (gradativamente em crescente concentrações) e a durans para a retirada dos produtos (mesma vazão), de forma a sempre manter um volume de trabalho de 1,5 L nos biorreatores.

O inóculo foi obtido através do estoque de linhagens de *K. pneumoniae* BIh-1 congeladas a – 80 °C crescidos em agitadores orbitais por 12 h, e depois, crescidos em novos frascos com 150 mL de meio por mais 2 h, para atingir absorbância em 600 nm igual a 1, para inocular o biorreator em 10 % de seu volume total (150 mL).

O regime no fermentador foi iniciado como um cultivo batelada e a adição e retiradas contínuas de meio passaram a ocorrer no momento de estimativa (baseado nos itens **4.3** e **4.2**) de exaustão da fonte de carbono da etapa em batelada.

O cultivo iniciou com uma batelada de 65 g L<sup>-1</sup> de glicerol residual por 8 horas, visando esgotar a quantidade de glicerol residual presente no meio e depois começou a ser alimentado com 70, 75, 80, 85, 90, 95 e 100 g L<sup>-1</sup> de glicerol residual em um total de 250 horas. Os cultivos realizados foram mantidos a temperatura de 37 °C e a agitação foi de 300 rpm. O tempo de cultivo foi determinado conforme a cinética de consumo do glicerol, e estipulado a 30 h por concentração de glicerol. No final de cada ciclo de 30 h, amostras de meio eram retirados e armazenados em



## **5.7. Métodos analíticos**

### **5.7.1. Determinação da Densidade Óptica (DO)**

A avaliação da turbidez de uma cultura microbiana constitui um método rápido de estimar a concentração celular. Um feixe de luz focado numa suspensão microbiana é parcialmente desviado (dispersão da luz) pelas células, e a percentagem de luz não desviada (transmitância, T) é medida por recurso a um espectrofotômetro. Este método é utilizado para acompanhar o crescimento microbiano com base no aumento da DO medida em um comprimento de onda particular. Todos os inóculos foram padronizados em DO = 1. A medida de DO de células foi realizada num espectrofotômetro (Modelo Ultraspec 3100 pro, marca Amersham Biosciences) com absorbância medida a 600 nm.

### **5.7.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

O consumo de glicerol e a produção de 1,3-PD, etanol e outros subprodutos foram analisados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em equipamento Shimadzu, empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 45 °C, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,05 M) como eluente, com fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e detector por índice de refração. O volume de amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram centrifugadas e filtradas em filtros de membrana de acetato de celulose (diâmetro dos poros 0,45 µm, Sartorius, Alemanha) e diluídas na proporção água/meio de 1:10 e mantidas no congelador para conservação.

### **5.7.3. Determinação dos parâmetros fermentativos**

A produtividade volumétrica ( $Q_P$  g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) dos produtos da fermentação e rendimento ( $Y_{P/S}$  g g<sup>-1</sup>) da conversão de glicerol a 1,3 propanodiol e de etanol foram calculados pelas seguintes equações:

$$Q_P = (C_{Pf} - C_{Pi}) / T$$

$$Y_{P/S} = (C_{Pf} - C_{Pi}) / (C_{Si} - C_{Sf})$$

Onde:

$C_{Pf}$  = concentração final de produto

$C_{Pi}$  = concentração inicial de produto

$C_{Si}$  = concentração inicial de substrato

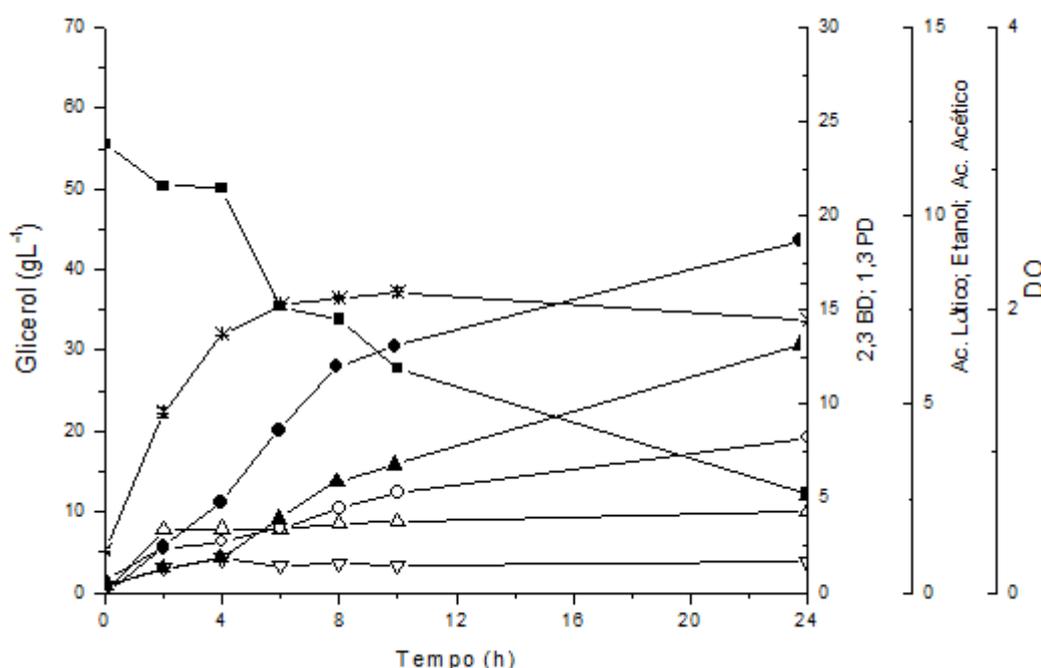
$C_{Sf}$  = concentração final de substrato

T = tempo em horas

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Cinética do consumo de glicerol em agitadores orbitais

A cinética do consumo do glicerol foi realizada durante 24 horas em agitador orbital. A figura 8 mostra que não houve um consumo total de glicerol residual, permanecendo mais de  $13 \text{ g L}^{-1}$  no meio de cultivo. O 1,3-propanodiol máximo produzido foi de  $19,9 \text{ g L}^{-1}$  desse tempo do cultivo. A maior produção de etanol alcançada foi de  $2,30 \text{ g L}^{-1}$  no ponto final. O crescimento bacteriano, medido em densidade óptica, estabilizou-se depois de 6 horas e permaneceu por volta de 2,0 até o fim do cultivo. A produtividade volumétrica de 1,3 propanodiol foi de  $0,80 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e o rendimento de  $0,37 \text{ g g}^{-1}$ .



**Figura 8.** Resultados dos cultivos em agitador orbital, após 24 horas de cultivo: (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (▲) 2,3-BD, (○) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico, (\*) biomassa. Resultados representam a média de duplicatas.

Pode-se verificar a produção de ácidos orgânicos, tais como ácido láctico e ácido acético em pequenas quantidades durante a fermentação. Esta produção pode ter prejudicado a produtividade e consumo, além do crescimento da bactéria, uma vez que o pH não é uma condição controlada no ensaio com agitador orbital.

Microrganismos são sensíveis a mudanças que ocorrem no microambiente e quanto maior a produção de ácidos orgânicos, mais ácido ficará o meio de cultura podendo influenciar a fisiologia da bactéria, dificultando a formação de produtos, principalmente de 1,3-PD (BIEBL *et al.*, 1998).

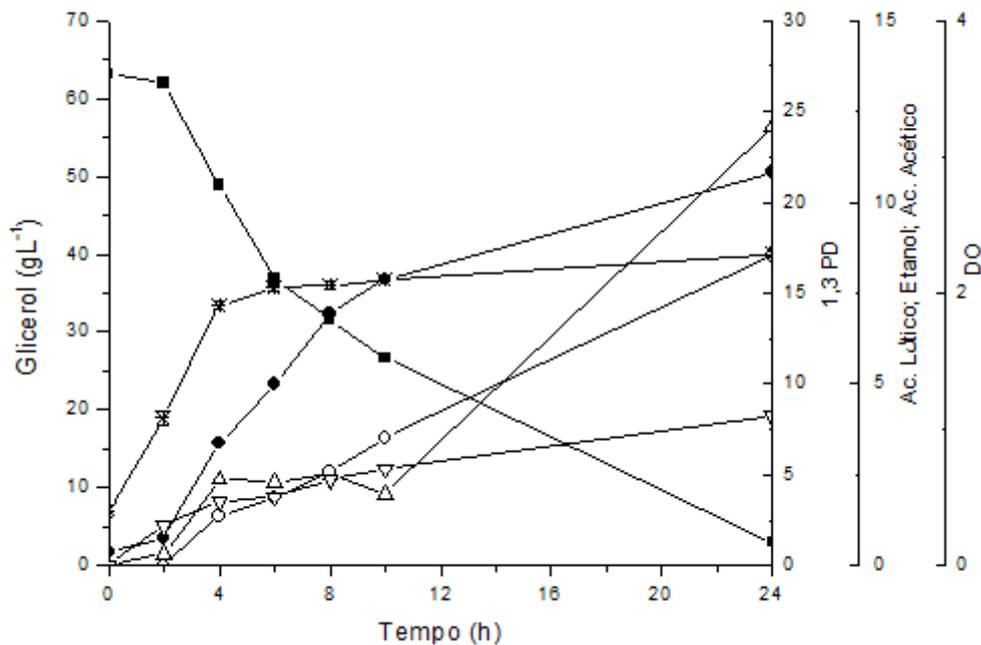
A presença de glicerol residual não consumido no meio de fermentação pode inibir a formação de 1,3-PD, porque pode ter direcionado a outras vias metabólicas e outros produtos podem ser formados, reduzindo o rendimento de 1,3-PD. A acumulação de glicerol pode favorecer o aparecimento de substâncias tóxicas e inibitórias à fermentação (ZENG; BIEBL, 2002).

O resultado obtido é consistente com o encontrado por SOUZA (2013) em que nas mesmas condições houve um acúmulo de  $15 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol no meio de cultura, após 32 horas de cultivo. A produção de 1,3-PD atingiu sua máxima produção em 16 horas e foi de  $19,51 \text{ g L}^{-1}$ , similar ao valor encontrado neste trabalho.

## 6.2. Cinética de consumo de glicerol em biorreatores

Uma série de parâmetros são controlados em biorreator e não em agitador orbital, principalmente pH, adição de uma solução anti-espumante ao meio se necessário e aeração, ou a ausência dela, que também é controlada. Nos biorreatores uma condição de anaerobiose ao microrganismo pode ser efetuada, pois necessita de ausência de oxigênio, já em agitador orbital a condição é de microaerofilia, com baixa presença de oxigênio. Por essas diferenças, além da dimensão volumétrica do experimento, se fez necessário um ensaio de consumo de glicerol pela linhagem de *K. pneumoniae* Blh-1 em biorreator, em duplicata.

A figura 9 mostra um consumo quase completo de glicerol, após 24 horas de cultivo, restando cerca de  $3 \text{ g L}^{-1}$  no meio de cultura. A produção de 1,3-PD atingiu sua maior produção no ponto de 24 horas, de  $21,64 \text{ g L}^{-1}$ . O etanol máximo produzido foi no final do cultivo, um total de  $12,07 \text{ g L}^{-1}$ . Ácidos orgânicos foram produzidos, com destaque para ácido acético e ácido lático, com  $8,53$  e  $4,12 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente em 24 horas. A produtividade volumétrica de 1,3-PD foi de  $0,87 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e o rendimento de  $0,34 \text{ g g}^{-1}$ .



**Figura 9.** Resultados dos cultivos em bioreatores, após 24 horas de cultivo: (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (○) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico, (\*) biomassa. Resultados representam a média de duplicatas.

Usando parâmetros otimizados e iguais ao presente trabalho com a mesma linhagem de *K. pneumoniae* Blh-1, ROSSI e colaboradores (2013) atingiram um total consumo do glicerol em 18 horas e um pico de produção de 1,3-PD de 24 g L<sup>-1</sup> em 23 horas. O etanol produzido atingiu os mesmos 12 g L<sup>-1</sup>. A produção de ácidos foi menor para aquele trabalho, justificando o maior rendimento da bactéria na produção de 1,3-PD, uma vez que a rota metabólica e o consumo de carbono teve que ser direcionado para produção de ácidos e não para produção de 1,3-PD. Podemos citar também o não consumo total do glicerol, pois apesar do pH ser controlado a presença de ácidos no meio de cultura pode ter sido prejudicial a bactéria (SAMUL *et al.*, 2014).

Segundo XUE e colaboradores (2010) o acúmulo de bioprodutos no meio de fermentação, especialmente ácido láctico, etanol e 2,3-BD, pode inibir o crescimento celular, e também utiliza equivalentes redutores de NADH, que compete diretamente com a formação do 1,3-PD, resultando em um menor rendimento. Estes autores

realizaram manipulação genética do microrganismo, para diminuir a formação de bioproductos visando o aumento do rendimento de 1,3-PD.

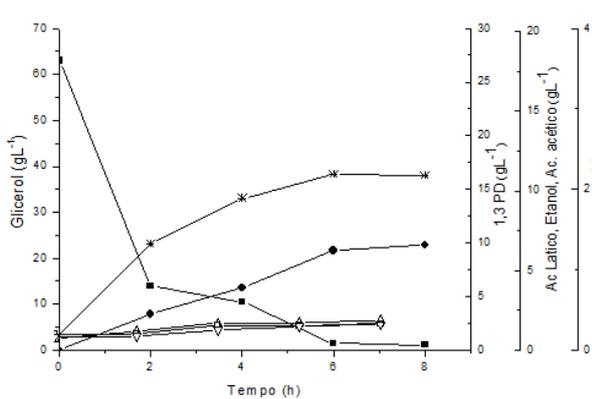
O metabolismo do glicerol é uma reação biológica de oxirredução (apêndice 1). O 1,3-PD é o produto final da rota redutiva, enquanto acetato, succinato, lactato, 2,3-BD e etanol são produzidos na rota oxidativa. Ambas as rotas são mutuamente conectadas pela formação NAD e pelo consumo de NADH (PETROV; STOYANOV, 2012).

### 6.3. Cultivo contínuo

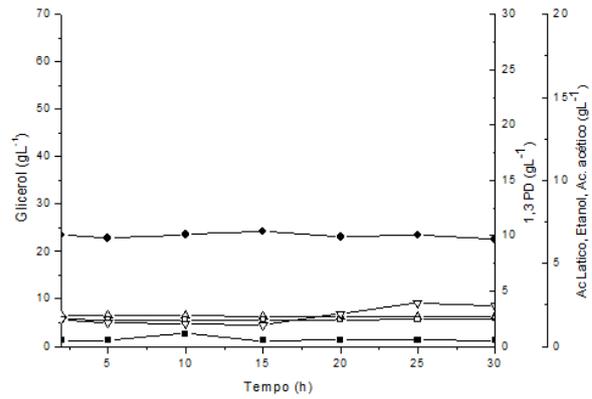
Para um processo de engenharia evolutiva, em que a concentração de glicerol no meio de cultivo aumenta gradativamente ao longo das gerações de *K. pneumoniae* Blh-1, aumentando assim a pressão seletiva e também a taxa de adaptação, foi elaborado um cultivo contínuo de biorreatores, em que a concentração de glicerol aumentou a cada 30 horas a uma concentração de 5 g L<sup>-1</sup>.

De acordo com a figura 10, durante a batelada inicial, a bactéria teve um consumo quase total do glicerol residual presente no meio, restando 1,12 g L<sup>-1</sup> depois de 8 horas, quando atingiu seu pico de produção de 1,3 propanodiol: 9,79 g L<sup>-1</sup> nesta batelada. A partir da alimentação e cultivo contínuo de 70 g L<sup>-1</sup> a bactéria possivelmente encontra-se em estado estacionário (Figura 11), uma provável resposta de adaptação ao meio, em que não há aumento de produção nem de consumo. A partir das concentrações de 75 g L<sup>-1</sup> de glicerol residual (Figura 12) e durante o tempo de alimentação da concentração de 80 g L<sup>-1</sup> de glicerol residual (Figura 13) a bactéria resistiu ao aumento da concentração de glicerol e gerou quantidades expressivas de produtos, por exemplo, produções de 12,23 g L<sup>-1</sup> de 1,3 propanodiol, 12,08 g L<sup>-1</sup> de etanol, 11,80 g L<sup>-1</sup> de ácido acético e 7,57 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico (Figura 12). Essa alta quantidade de produtos formados, principalmente ácidos e etanol que participam de uma rota oposta ao do 1,3 propanodiol (Apêndice 1) pode ter prejudicado o metabolismo da bactéria, como descrito por SAMUL e colaboradores (2014), fato que pode ter gerado uma instabilidade metabólica no meio, além de proporcionar acúmulo do glicerol residual que alimentava o sistema (Figura 13). Esta instabilidade perdurou os tempos das concentrações de 85 g L<sup>-1</sup> (Figura 14) e 90 g L<sup>-1</sup> (Figura 15) de glicerol residual, quando a *K. pneumoniae* Blh-1

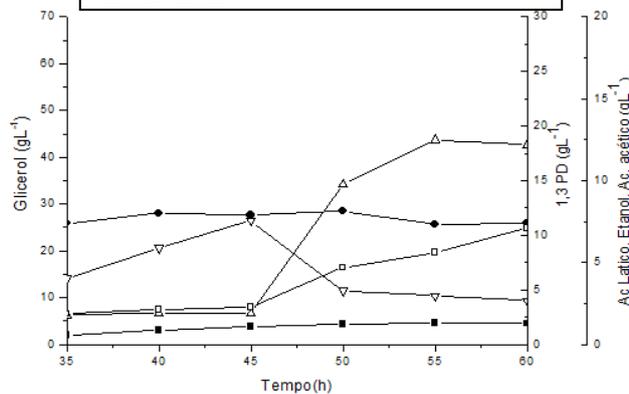
assimilou os ácidos orgânicos e etanol do meio, possivelmente adaptando-se. Neste período, entre as concentrações de  $90 \text{ g L}^{-1}$  e  $95 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 16) de glicerol residual, a bactéria mostrou-se bastante eficiente no consumo de glicerol e produção de 1,3-PD, porém, novamente, houve um acúmulo de glicerol no meio e queda na produção de 1,3 propanodiol, tornando-se ainda mais evidente na alimentação de  $100 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol residual (Figura 17).



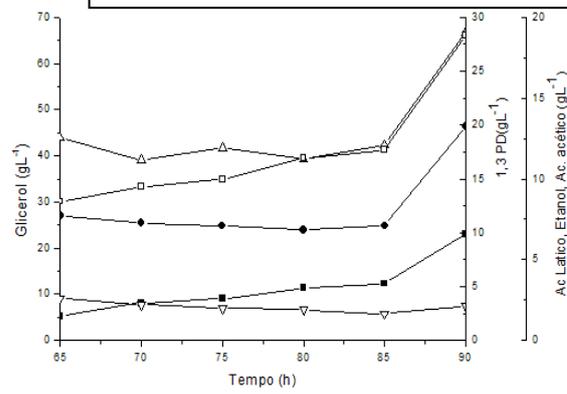
**Figura 10.** Batelada em  $65 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol. : (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (□) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico, (\*) biomassa. Resultados representam a média de duplicatas.



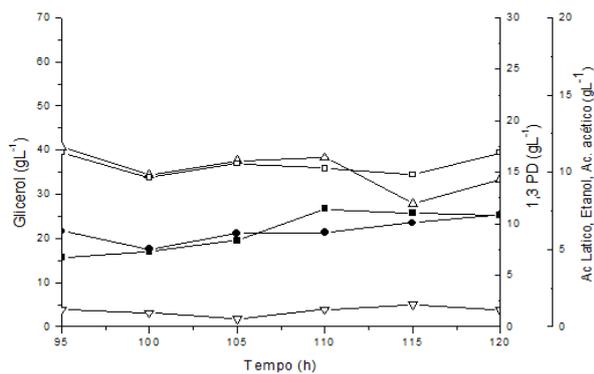
**Figura 11.** Cultivo contínuo em  $70 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol. : (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (□) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico. Resultados representam a média de duplicatas.



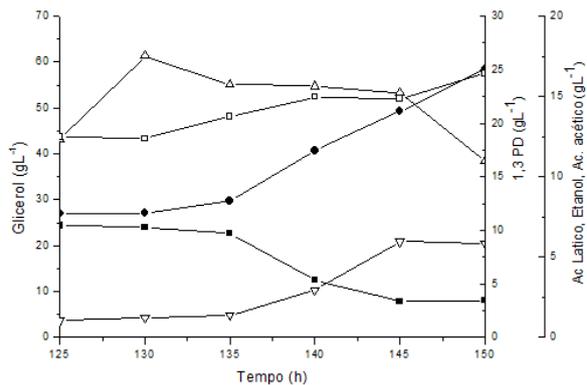
**Figura 12.** Cultivo contínuo em  $75 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol. : (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (□) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico. Resultados representam a média de duplicatas.



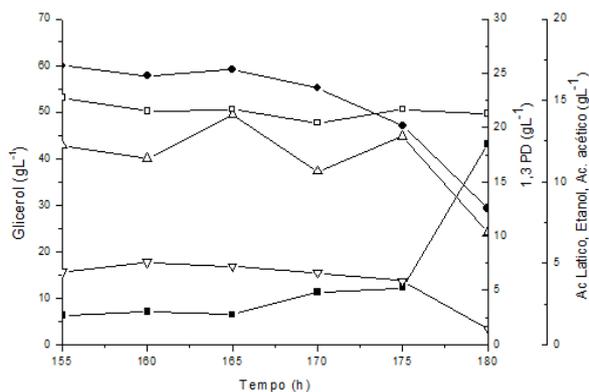
**Figura 13.** Cultivo contínuo em  $80 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol. : (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (□) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico. Resultados representam a média de duplicatas.



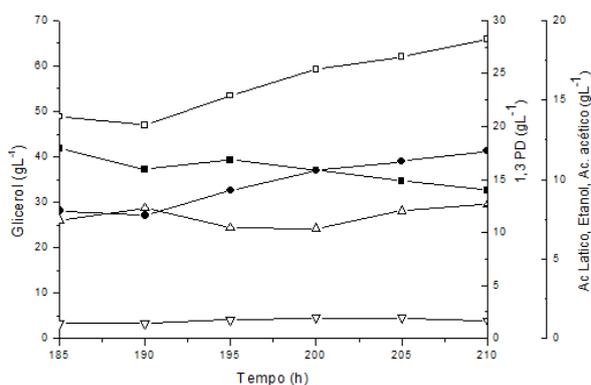
**Figura 14.** Cultivo contínuo em 85 g L<sup>-1</sup> de glicerol. : (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (□) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico. Resultados representam a média de duplicatas.



**Figura 15.** Cultivo contínuo em 90 g L<sup>-1</sup> de glicerol. : (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (□) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico. Resultados representam a média de duplicatas.



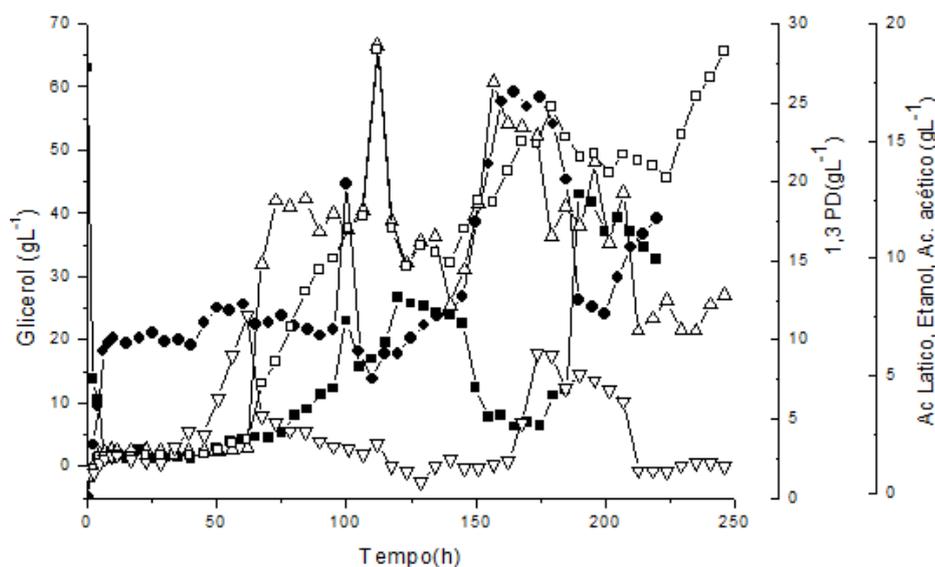
**Figura 16.** Cultivo contínuo em 95 g L<sup>-1</sup> de glicerol. : (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (□) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico. Resultados representam a média de duplicatas.



**Figura 17.** Cultivo contínuo em 100 g L<sup>-1</sup> de glicerol. : (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (□) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico. Resultados representam a média de duplicatas.

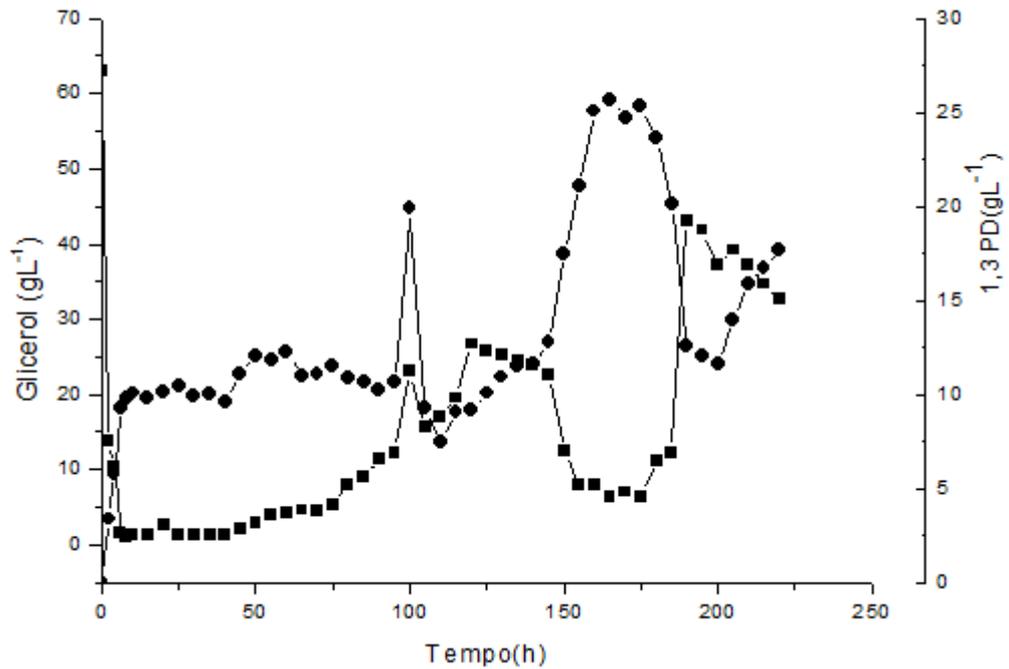
A figura demonstrada no Apêndice 1 (RIVALDI *et al.*, 2007) é a rota de metabolismo anaeróbico de glicerol e os principais produtos formados em duas rotas diferentes. Nota-se que o glicerol é fermentado por um processo de dismutação que envolve duas rotas paralelas. Numa rota o glicerol é convertido em diidroxiacetona (DHA) pela enzima glicerol desidrogenase, a qual então seguindo via glicolítica até o piruvato. A partir do piruvato, finalmente, vários coprodutos podem ser formados, tais como ácidos e álcoois. O glicerol é transformado na segunda rota pela coenzima B12 que é dependente da enzima glicerol desidratase para 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA), que por sua vez, é reduzido pelo NADH<sub>2</sub> para 1,3-PD, pela 1,3-PD:

oxiredutase. A segunda rota metabólica, a qual mantém o balanço redox da célula, é necessária para converter glicerol em 1,3 propanodiol, e a glicerol desidratase é a enzima chave e limitante para esse processo biológico (GENLIN ZHANG, 2007).

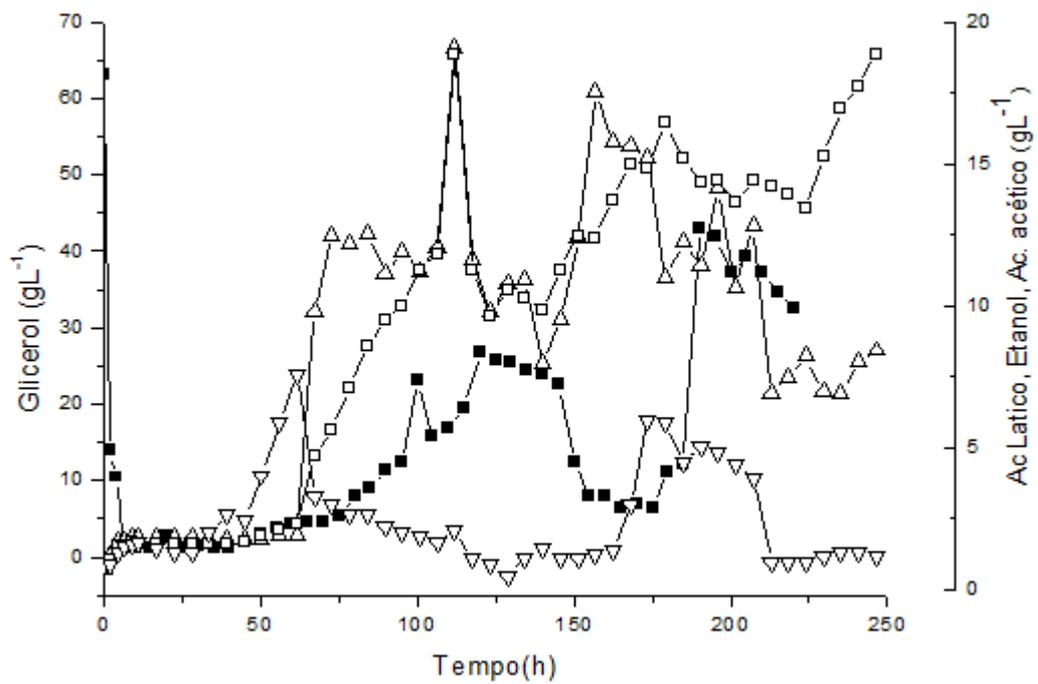


**Figura 18.** Cultivo contínuo de glicerol nas 250 horas: (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (○) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico. Resultados representam a média de duplicatas.

Sendo assim, a produção de 1,3 propanodiol é análogo à produção de etanol e ácidos orgânicos, por participarem de vias metabólicas diferentes, como pode-se ver nas figuras 20 e 21, onde os maiores resultados de produção de etanol e ácidos orgânicos são próximos ao tempo de 150 horas, quando o glicerol apresenta uma das menores concentrações no meio de cultura após o início do cultivo contínuo. Segundo LIU e colaboradores (2007), as maiores produções de etanol e ácidos orgânicos, obtidas utilizando *K. pneumoniae*, são em baixas concentrações de glicerol. Já para a rota de 1,3 propanodiol são necessárias altas concentrações de glicerol, como podemos comprovar na Figura 19. A maior produção de 1,3 propanodiol se dá no final do cultivo quando e, após, inicia-se o acúmulo de glicerol, mas não há um grande acúmulo de modo a inviabilizar a bactéria, como, por exemplo, nos pontos finais. Sabe-se que o melhor processo para produção microbiana de 1,3 propanodiol a partir de glicerol é a batelada alimentada, em que a adição do substrato é controlada para atingir a maior densidade de células e a maior produção de 1,3-PD (JUN *et al.*, 2010).



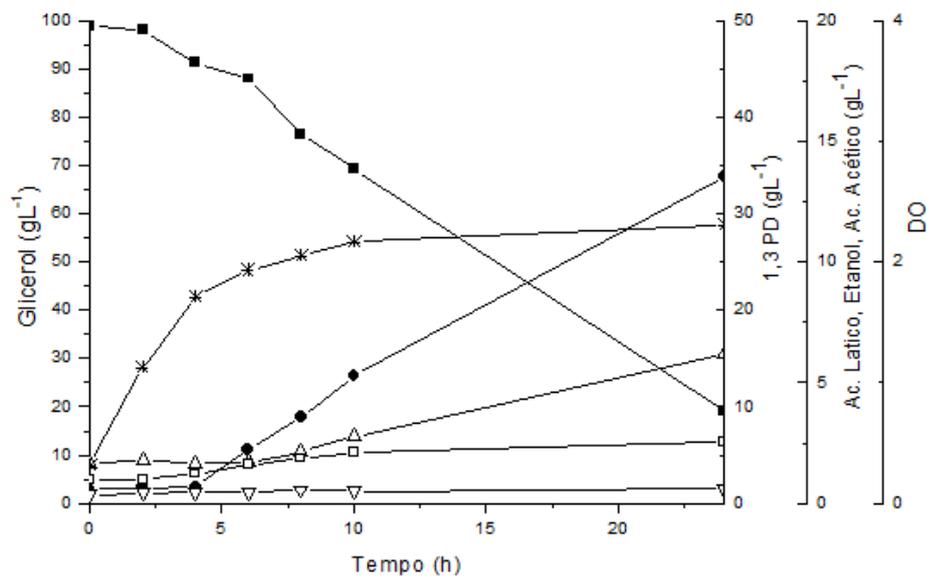
**Figura 19.** Cultivo contínuo de glicerol e produção de 1,3-PD em 250 horas: (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD. Resultados representam a média de duplicatas.



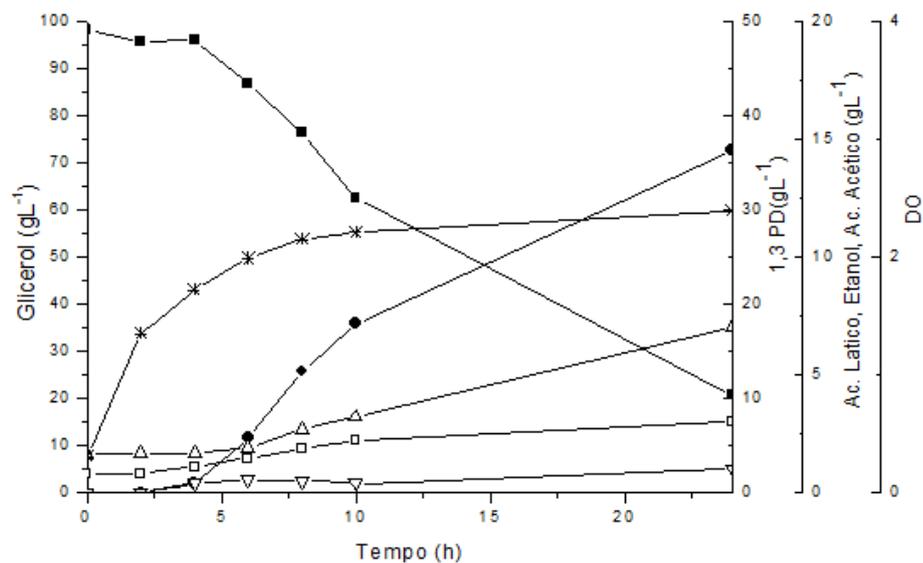
**Figura 20.** Cultivo contínuo de glicerol e produção de etanol e ácidos orgânicos em 250 horas: (■) glicerol residual, (○) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico. Resultados representam a média de duplicatas.

#### 6.4. Comparação de ensaios em agitador orbital da linhagem antes e após o cultivo contínuo

Realizaram-se cultivos comparativos entre a linhagem após o biorreator contínuo, que representaria uma linhagem pós-engenharia evolutiva, e a linhagem antes do biorreator contínuo em um meio com alta pressão seletiva, contendo  $100 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol (Figuras 21 e 22). A linhagem selvagem, que não passou pelo processo de engenharia evolutiva, apresentou melhor rendimento volumétrico e melhor produtividade quando comparada com a adaptada (Tabela 2).



**Figura 21.** Resultados dos cultivos em agitador orbital, após 24 horas de cultivo da linhagem pós-cultivo contínuo em meio de  $100 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol residual: (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (○) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico, (\*) biomassa. Resultados representam a média de duplicatas.



**Figura 22.** . Resultados dos cultivos em bioreatores, após 24 horas de cultivo da linhagem selvagem Blh-1 contínuo em meio de  $100 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol residual: (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (○) ácido acético, (△) etanol, (▽) ácido láctico, (\*) biomassa. Resultados representam a média de duplicatas.

Numa tentativa de impor uma pressão seletiva à bactéria acabou-se expondo demasiadamente o microrganismo aos seus inibidores (SAMUL *et al.*, 2014), fato que pode ter deixado a bactéria inviável, perdendo a capacidade de produção e consumo que possuía antes do processo seletivo.

**Tabela 2.** Comparativo das linhagens.

Linhagem	Produtividade de 1,3-PD	Rendimento de 1,3-PD ( $Y_{p/s}$ )
Após o cultivo contínuo em $100 \text{ g L}^{-1}$	$1,349 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,405 \text{ g g}^{-1}$
Antes do cultivo contínuo em $100 \text{ g L}^{-1}$ (Blh-1)	$1,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,469 \text{ g g}^{-1}$
Ensaio em $65 \text{ g L}$ , antes do cultivo contínuo (Blh-1)	$0,80 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$0,37 \text{ g g}^{-1}$

A bactéria *K. pneumoniae* Blh-1 apesar de produzir mais 1,3 propanodiol em 100 g L<sup>-1</sup> em comparação a 65 g L<sup>-1</sup> de glicerol residual, não apresenta rendimento suficientemente significativo que justifique o uso de alta quantidade de glicerol. A condição de 65 g L<sup>-1</sup> de glicerol residual é uma condição otimizada pelo grupo em (ROSSI *et al.*, 2013) e somente uma engenharia evolutiva eficiente e/ou engenharia metabólica poderá alterar essa condição.

## 7. Conclusão

O cultivo contínuo, que tinha como objetivo, expor a bactéria *Klebsiella pneumoniae* Blh-1 ao processo de engenharia evolutiva, pode ter se tornado prejudicial ao metabolismo do microrganismo. As grandes proporções de glicerol residual inserido de modo crescente ao meio de cultivo, o alto tempo de exposição da bactéria aos seus inibidores do processo fermentativo, possivelmente tornaram o meio inóspito a esta linhagem e podem ter inviabilizado-a, ao impor uma pressão seletiva muito forte.

Entretanto, antes de acumular glicerol residual no meio, por volta do tempo de 200 horas de cultivo contínuo, a bactéria mostrou-se bastante adaptativa e produtiva, ao longo de mais de 150 horas de cultivo e em concentrações de glicerol residual que chegaram a  $95 \text{ g L}^{-1}$ . Esta cepa está armazenada e mais estudos são necessários para mensurar os possíveis efeitos positivos quanto à resistência que esta adaptação progressiva imposta pode ter causado.

A partir deste trabalho, pode-se constatar que 1,3 propanodiol e etanol participam de rotas metabólicas diferentes, quanto ao consumo de glicerol, logo seus modos de produção são análogos, a otimização na produção de um pode diminuir a formação do outro, como é trazido pela literatura. Pode-se inferir, também, que a linhagem *K.pneumoniae* Blh-1 apresenta melhor rendimento de produção de 1,3-PD, quando em meio com  $65 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol residual em comparação ao meio de  $100 \text{ g L}^{-1}$ .

## 8. Bibliografia:

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. 2013. - Rio de Janeiro. ANP, 2008.

ALMEIDA, J. R. M.; FAVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 48, 18 jul. 2012.

BASSO, Thiago Olitta. Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Biotecnologia, University of São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-14092011-153623/>>. Acesso em: 2014-09-25.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. DE. Glycerol: a brief history and their application in stereoselective syntheses. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306–319, jan. 2011.

BIEBL, H. et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 24–29, jul. 1998.

BERNAL, J.M. et al. **Supercritical Synthesis of Biodiesel. Molecules**. 17, 8696-8719. 2012.

BILGEN, S. et al. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: A case study in Turkey. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 2, p. 372–396, 2008.

BOWKER, M.; DAVIES, P. R.; AL-MAZROAI, L. S. Photocatalytic Reforming of Glycerol over Gold and Palladium as an Alternative Fuel Source. **Catalysis Letters**, v. 128, n. 3-4, p. 253–255, 1 mar. 2009.

BRIGANTI, L. E. R. P. P. L. D. B. [UNESP. Clonagem e expressão de genes de *Klebsiella pneumoniae* responsáveis pela produção de 1,3-propanodiol em cepa mutante de *Escherichia coli*. **Aleph**, p. 45. 2013.

Companhia Nacional de Abastecimento /O Etanol Como Um Novo Combustível Universal. Brasília: CONAB, 2008.

DASARI, M. A. et al. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A-General**. v. 281. p. 225-231. 2005.

DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30–39. 2009.

DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. **Energy Policy**, v. 35, n. 9, p. 4661–4670, 2007.

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629–1642, 2010.

ELENA, S. F.; LENSKI, R. E. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 6, p. 457–469, 2003.

GENLIN, Z.; Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**. V. 3. P. 256-260. 2007.

HÁJEK, M.; SKOPAL, F. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3242–3245. 2010.

HORNG, Y.-T. et al. Inactivation of *dhaD* and *dhaK* abolishes by-product accumulation during 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 707–716, 1 jul. 2010.

HAVLÍK, P et al: Global land-use implications of first and second generation biofuel targets. **Energy Policy**. v. 39 p.5690-5702. 2011.

ITO, T. et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260–265. 2005.

JUN, S. et al. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 161, p. 491-501. 2010.

KAUR, G.; SRIVASTAVA, A. K.; CHAND, S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 106–118, 2012.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 223–253.2010.

LAGES, F.; LUCAS, C. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1322, n. 1, p. 8–18. 1997.

LIN, L. et al. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, v. 88, n. 4, p. 1020–1031. 2011.

LIU, H.-J. et al. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 8, p. 1281–1285. 2007.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. DA. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596–1608.2009.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

MENZEL, K.; ZENG, A.-P.; DECKWER, W.-D. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 2, p. 82–86.1997.

MU, Y.; XIU, Z.-L.; ZHANG, D.-J. A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 537–541.2008.

POTT, R. W. M.; HOWE, C. J.; DENNIS, J. S. The purification of crude glycerol derived from biodiesel manufacture and its use as a substrate by *Rhodospseudomonas palustris* to produce hydrogen. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 464–470.2014.

RIVALDI, J. D. et al. Glicerol de biodiesel. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**. n 37. p. 44-51. 2007.

ROSSI, D. M. et al. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. **Renewable Energy**. v. 39 p. 223-227. 2012.

ROSSI, D. M.; SOUZA, E. A. DE; AYUB, M. A. Z. Biodiesel Residual Glycerol Metabolism by *Klebsiella pneumoniae*: Pool of Metabolites Under Anaerobiosis and Oxygen Limitation as a Function of Feeding Rates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 6, p. 1952–1964. 2013.

SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 891–898. 2014.

SAUER, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 73, p. 129–169, 2001.

SCHMIDELL, W et al. **Biotecnologia Industrial**. Vol.2; 1. Ed., 541 p. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

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

SOUZA, Elisângela Aquino. Produção de 1,3-propanodiol em biorreatores com células imobilizadas de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 utilizando glicerol residual proveniente da produção de biodiesel. 2013. Tese (Mestrado Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. Disponível em: < <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/83826> >. Acesso em: 2014-08-16.

TORTORA, G.J.: *Microbiologia*. 10ª. Ed. São Paulo: Artmed, 2010.

VELICER GJ, LENSKI RE. Evolutionary trade-offs under conditions of resource abundance and scarcity: Experiments with bacteria. **Ecology**. v. 80 p. 1168. 1999.

WANG, Z. et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 201–223, jun. 2001.

WISSELINK HW et al. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Appl Environ Microbiol.** v.75 p.907–914. 2009

XUE, X. et al. Enhanced 1,3-propanediol production by supply of organic acids and repeated fed-batch culture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.** V. 37, p. 681-687. 2010.

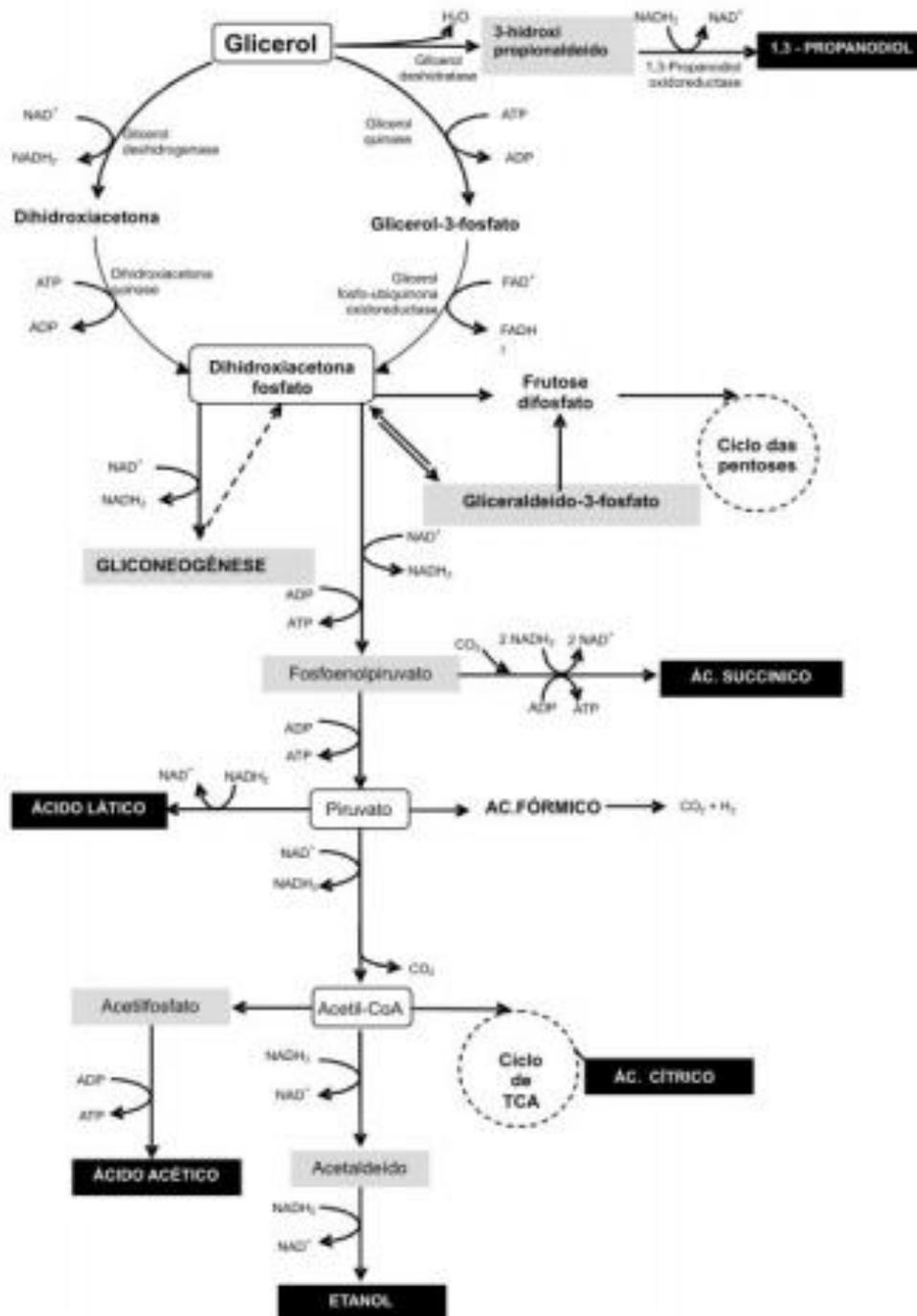
YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology / Environmental biotechnology.** v. 18, n. 3, p. 213–219, jun. 2007.

ZENG, A.; BIEBL, H. Bulk Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-Propanediol Production and the New Trends. **Tools and Applications of Biochemical Engineering Science.** V. 74 p. 239-259. 2002.

ZHU, L et al. Engineering stress tolerance of *Escherichia coli* by stress-induced-mutagenesis (SIM) based adaptive evolution. **Biotechnology journal.** v. 9 p. 120-127. 2013.

## 9. Apêndice

8.1. Metabolismo do glicerol mostrando os principais produtos formados em duas rotas diferentes (RIVALDI *et al.*, 2007).



8.2. Laudo enviado pela empresa fornecedora de glicerol residual:

**Bianchini** CERTIFICADO DE QUALIDADE  
 Nº 040 - 14 - 08 de Setembro de 2014

Identificação do Cliente	Bianchini S/A Indústria Comércio e Agricultura - Planta de Biodiesel		
Data de Entrada da Amostra:	Rua Antônio João Bianchini, 1800 - Canoas - RS		
Data de Realização dos Ensaio:	05/09/14		
	05/09/14 - 05/09/14		

**Dados do Produto**

Produto:	Glicerina Comercial		
Identificação da Amostra:	Tanque: 1421		
Composição da Matéria Prima:	100% Óleo de Soja	Data de Produção:	05/09/14
Rota de Produção:	Medica	Lacres da Amostra:	NA
Lacres do Tanque:	NA		

Característica	Resultado	Especificação	Método de Ensaio
Umidade (%)	10,62	Máx. 12,00%	AOC5 Ca 2e-84
Glicerol (%)	82,97	Mín. 80,00%	AOC5 Ea 6-94
Cinzas (%)	5,89	Máx. 7,00%	AOC5 Tm1e-84
MONG (%)	0,75	Máx. 3,00%	Cálculo
Metanol (%)	0,02	Máx. 0,30%	EN 14110
Cloro de Sódio (%)	0,72	Máx. 7,00%	AOC5 Ea2-38
Densidade (g/cm3)	1,25	Máx. 1,29 g/cm3	ASTM D 1256

**FABIANA ROGERIO DE MEDEIROS**  
 Assinado digitalmente por  
 FABIANA ROGERIO DE MEDEIROS  
 Data: 2014.09.08 17:28:37 -0300  
 CRQ 05201925 - V Regiõ  
 Signatário Autorizado

Os resultados acima se referem somente à amostra enviada. Este laudo não pode ser reproduzido em sua íntegra.

Laboratório de Controle de Qualidade  
 Rua Antônio João Bianchini, 1800 - Canoas - RS  
 Registro no CRQ-V nº 2340 - Cadastro na ANP nº 81