

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Avaliação da influência da utilização do modo de operação de batelada alimentada na produção de metabólitos por *Klebsiella pneumoniae* utilizando glicerol residual da indústria do biodiesel como substrato

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
ALLAN VALCAREGGI MORCELLI

Porto Alegre, Agosto de 2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Escola de Engenharia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Avaliação da influência da utilização do modo de operação de batelada alimentada na produção de metabólitos por *Klebsiella pneumoniae* utilizando glicerol residual da indústria do biodiesel como substrato

Allan Valcareggi Morcelli

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos

Orientadores:

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Prof. Dr. Rafael de Pelegrini Soares

Porto Alegre

2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Escola de Engenharia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação “Avaliação da influência da utilização do modo de operação de batelada alimentada na produção de metabólitos por *Klebsiella pneumoniae* utilizando glicerol residual da indústria do biodiesel como substrato”, elaborada por Allan Valcareggi Morcelli, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Daniele Misturini Rossi – DEQUI/UFRGS

Prof.^a Dr.^a Aline Schilling Cassini – PPGEQ/UFRGS

Prof. Dr. Alexandre José Macedo – PPGCF/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de desenvolver este trabalho, sobretudo aos professores que participaram orientando este projeto: Marco Antônio Záchia Ayub, Rafael de Pelegrini Soares e Rosane Rech.

Um grande agradecimento é dedicado ao aluno de engenharia química André Klafke, cuja dedicação e competência como bolsista de iniciação científica, além do constante companheirismo, foram fundamentais à realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais pelo apoio ao longo de todo este período e aos meus bons amigos por estarem sempre ao meu lado.

Obrigado a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para tornar o período de mestrado uma experiência positiva.

RESUMO

Em um mundo no qual uma crescente demanda por energia deve ser suprida, surgem preocupações referentes à sustentabilidade das fontes energéticas disponíveis, uma vez que as mudanças climáticas, aliadas aos fatores econômicos vinculados à obtenção de energia por diferentes fontes estimulam a avaliação de oportunidades na melhoria da estabilidade energética global. Estimulada por apresentar benefícios ambientais e, sobretudo, por tratar-se de um processo que utiliza fontes biológicas renováveis, a produção mundial de biodiesel vem crescendo. O notável aumento da disponibilidade de glicerol no mercado mundial é justificado pelo grande crescimento desta indústria, na qual ocorre sua produção como subproduto. Por não poder ser utilizado para fins alimentícios ou cosméticos sem purificação adicional, o uso de glicerol de baixo grau de pureza oriundo da produção de biodiesel torna-se um enorme desafio. Diante deste panorama, a rota biológica de transformação do glicerol apresenta-se como uma alternativa vantajosa em comparação à síntese química. Entre os microrganismos capazes de metabolizar glicerol a produtos de interesse industriais, *Klebsiella pneumoniae* vem recebendo crescente atenção. Trata-se de uma bactéria anaeróbia facultativa metabolicamente versátil, a qual vem sendo largamente investigada como produtora de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), 2,3-butanodiol (2,3-BDO) e etanol, em adição a ácidos orgânicos. Neste trabalho, a linhagem de bactéria *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 foi avaliada quanto à influência da utilização do modo de operação de batelada alimentada (operado utilizando-se um perfil de alimentação exponencial de glicerol bruto) no *pool* de metabólitos produzidos sob condições de anaerobiose. Um meio sintético previamente otimizado foi utilizado, testando-se velocidades específicas de crescimento empregadas de 0,035, 0,07 e 0,105 h⁻¹. Foi verificada a produção consistente de 1,3-propanodiol e de etanol para todos os níveis testados de velocidades específicas de crescimento, ocorrendo aumento nas produtividades de 1,3-PDO observadas em todos os testes em batelada alimentada em relação aos experimentos em batelada. Não foi observada a formação de 2,3-butanodiol em nenhum dos cultivos. Os experimentos utilizando velocidade específica de crescimento de 0,105 h⁻¹ foram considerados os mais satisfatórios sob o ponto de vista operacional diante da proposta deste trabalho, uma vez que foi possível conduzir o cultivo em batelada-alimentada mantendo concentrações residuais de glicerol baixas por um longo período. A formação de 1,3-PDO ocorreu ao longo de todo o experimento, atingindo concentração máxima de 38,52 g·L⁻¹ ao final

de 27 h. Comportamento semelhante foi observado para a produção de etanol, que alcançou concentração final de $13,22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ocorreu acúmulo acentuado de glicerol após 21 h e concentrações finais de ácido acético e de ácido láctico foram de $17,27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de $7,78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Foram observados valores crescentes de conversões para 1,3-propanodiol e etanol ao longo do tempo, alcançando valores finais de $0,56 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $0,18 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Sugere-se que a condução do processo em batelada alimentada gerou condições para que a rota metabólica do microrganismo fosse deslocada para a produção destes dois metabólitos. Os valores de produtividade para estes produtos variaram ao longo do tempo, apresentando valores finais de $1,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para 1,3-PDO e de $0,49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para etanol.

ABSTRACT

In a world where a growing demand for energy must be supplied, there are concerns regarding the sustainability of energy sources, since current climate changes, combined with economic factors linked to obtaining energy from different sources stimulate assessing opportunities in improving overall energy stability. Stimulated by present environmental benefits and, above all, due to the use of renewable biological sources, biodiesel world production has increased over the last years.

The remarkable increase in glycerol availability on the world market is justified by the great growth of this industry, in which production occurs as a byproduct. Since it cannot be used for food or cosmetic purposes without further purification, the use of glycerol of low purity derived from the production of biodiesel becomes a huge challenge. In light of this, the biological route of transformation of glycerol presents itself as an attractive alternative compared to chemical synthesis.

Among the microorganisms able to metabolize glycerol to products of industrial interest, *Klebsiella pneumoniae* has received increased attention. It is a facultative anaerobic, metabolically versatile bacterium, which has been widely investigated in the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO), 2,3-butanediol (2,3-BDO) and ethanol in addition to organic acids. In this work, the strain *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 was evaluated for the influence of the use of fed batch (operated using an exponential feeding profile of crude glycerol) in the pool of metabolites produced under anaerobic conditions.

A previously optimized synthetic medium was used, and specific growth rates of 0.035, 0.07 and 0.105 h⁻¹ were tested. Consistent production of 1,3-propanediol and ethanol was observed for all tested levels of specific growth rates, with increased yields of 1,3-PDO at all levels compared to batch experiments. Formation of 2,3-butanediol was absent in all cultivations. Experiments using specific growth rate of 0.105 h⁻¹ were considered the most satisfactory from the operating standpoint, considering the proposal of this work, since it was possible to conduct fed-batch cultivation maintaining low residual glycerol concentrations over a long period. The

formation of 1,3-PDO occurred throughout the experiments, reaching maximum concentration of $38.52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ at the end of 27 h.

Similar behavior was observed for ethanol production, which achieved final concentration of $13.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. There was considerable accumulation of glycerol after 21 h and final concentrations of acetic acid and lactic acid were $17.27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $7.78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Increasing conversion values were observed for 1,3-propanediol and ethanol over time, reaching final values of $0.56 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ and $0.18 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. It is suggested that carrying out the fermentation process under fed-batch operation generated a shift in metabolism towards the production of these two metabolites. Productivity values for these products varied over time, with final values of $1.43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ for 1,3-PDO and $0.49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ for ethanol.

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Glicerol e a indústria do biodiesel.....	3
2.2. 1,3-propanodiol	8
2.2.1. Síntese química de 1,3-PDO.....	10
2.2.2. Síntese biológica de 1,3-PDO.....	11
2.2.3. Rota metabólica de produção de 1,3-PDO: função dos genes e das enzimas produzidas.....	12
2.2.4. Bioconversão de glicerol a 1,3-PDO: processo fermentativo.....	15
2.3. Etanol	18
2.4. 2,3-Butanodiol.....	20
2.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
2.5.1. Aeração	28
3. Materiais e Métodos	30
3.1. Glicerol residual e reagentes químicos.....	30
3.2. Microrganismo e meio de cultivo.....	30
3.3. Preparo de inóculos	30
3.4. Experimentos em Batelada.....	31
3.5. Experimentos em Batelada alimentada	32
3.6. Métodos Analíticos	33
3.7. Obtenção de parâmetros cinéticos.....	34
3.8. Análise estatística dos dados experimentais.....	34
4. Resultados.....	35
4.1. Experimentos preliminares em batelada	35
4.2. Experimentos em batelada alimentada.....	38
5. Discussão.....	47
5.1. Resposta metabólica à falta de nutrientes	49
6. Conclusão	50
7. Referências	53

Lista de Figuras

Figura 1: Rota metabólica de conversão do glicerol (Kaur et al., 2012).	13
Figura 2: Estereoisômeros de 2,3-butanodiol (2,3-BDO) (CELÍŃSKA e GRAJEK, 2009).	21
Figura 3: Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada com concentração inicial de substrato de $65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	36
Figura 4: Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada com concentração inicial de substrato de $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	37
Figura 5: Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada-alimentada utilizando velocidade específica de crescimento de $0,035 \text{ h}^{-1}$	39
Figura 6: Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada-alimentada utilizando velocidade específica de crescimento de $0,07 \text{ h}^{-1}$	40
Figura 7: Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada-alimentada utilizando velocidade específica de crescimento de $0,105 \text{ h}^{-1}$	41
Figura 8: Variação da produtividade volumétrica calculada para os diferentes níveis de velocidade específica de crescimento testados	42

Lista de Tabelas

Tabela 1: Conversões de substrato a biomassa e a 1,3-PDO obtidos experimentalmente..... 38

Tabela 2: Concentrações, conversões e produtividades para os metabólitos produzidos sob modo de operação de batelada-alimentada. 43

1. Introdução

Em um mundo no qual uma crescente demanda por energia deve ser suprida, surgem preocupações referentes à sustentabilidade das fontes energéticas disponíveis, uma vez que as atuais mudanças climáticas, aliadas aos fatores econômicos vinculados à obtenção de energia por diferentes fontes estimulam a avaliação de oportunidades na melhoria da estabilidade energética global.

Estimulada por apresentar benefícios ambientais e, sobretudo, por tratar-se de um processo que utiliza fontes biológicas renováveis, a produção mundial de biodiesel vem crescendo nos últimos anos. A constante busca pela independência energética promove o biodiesel como importante alternativa de combustível, figurando entre suas vantagens o desenvolvimento rural e a redução da emissão de gases do efeito estufa.

O notável aumento da disponibilidade de glicerol no mercado mundial é justificada pelo grande crescimento da indústria do biodiesel. Um destino vantajoso para tal subproduto industrial, sobretudo o processamento de glicerol bruto em biorrefinarias, beneficiaria a economia global deste nicho de mercado através da redução do custo de eliminação de resíduos, mas, mais significativamente, pela produção de produtos químicos de alto valor. O glicerol puro representa um produto químico valioso, no entanto sua purificação é dispendiosa e considera-se que o atual cenário mundial do mercado de glicerol encontra-se saturado, causando a queda nos preços deste produto, fenômenos que deverá continuar com o início de atividade de mais unidades de manufatura de biodiesel.

Por não poder ser utilizado para fins alimentícios ou cosméticos sem purificação adicional, o uso de glicerol de baixo grau de pureza oriundo da produção de biodiesel torna-se um enorme desafio. A transformação deste subproduto em produtos de valor agregado viabilizará a redução dos custos de produção do biodiesel.

Diante deste panorama, a rota biológica de transformação do glicerol apresenta-se como uma alternativa vantajosa em comparação à síntese química, que comumente requer um número alto de etapas intermediárias, além do emprego de condições de trabalho dispendiosas, caracterizadas por altas pressões e temperaturas. Por contornar tais dificuldades e por, de forma

geral, apresentar maior seletividade, eficiência e tempos de reação mais curtos, a bioconversão microbiana de glicerol é favorecida.

O 1,3-propanodiol (1,3-PDO) é um poliol com diversas aplicações, entre as quais podem ser citadas as áreas de cosméticos, alimentos, lubrificantes e a indústria de fármacos. Este vem sendo apontado como um dos principais produtos obtidos através da conversão microbiana de glicerol, e o desenvolvimento do tereftalato de politrimetileno (PTT), um termoplástico com propriedades físico-químicas superiores ao tereftalato de polietileno (PET) que encontra aplicação na produção de tecidos, tapetes e plásticos, criou uma renovada demanda por 1,3-propanodiol.

Também vem surgindo um interesse crescente referente à conversão de glicerol em etanol, sobretudo glicerol bruto oriundo da indústria do biodiesel. Isso se deve principalmente pelo potencial barateamento do custo de produção de etanol ao utilizar-se um subproduto industrial cuja oferta supera a demanda do mercado, tornando-o de custo inferior ao etanol produzido de outras fontes mais comumente empregadas. Por essa razão, a seleção e o desenvolvimento de microrganismos capazes de produzir etanol eficientemente utilizando glicerol como fonte de carbono tem ganhado crescente atenção no cenário mundial.

2,3-butanodiol (2,3-BDO) é um álcool de especial interesse devido à possibilidade de sua conversão a 1,3-butadieno, o qual pode ser utilizado na produção de borracha sintética. Devido a seu baixo ponto de fusão de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2,3-BDO é utilizado como um agente anticongelante (Soltys et al., 2001). Em adição, este produto, bem como seus derivados, tem encontrado, entre muitas outras, aplicação na produção de plásticos e de solventes. A produção biológica deste álcool a partir de glicerol vem sendo alvo de estudo nos últimos anos.

Entre os microrganismos capazes de metabolizar glicerol a produtos de interesse industriais, *Klebsiella pneumoniae* vem recebendo crescente atenção. Trata-se de uma bactéria anaeróbia facultativa metabolicamente versátil, a qual vem sendo largamente investigada como produtora de 1,3-PDO, 2,3-BDO e etanol, em adição a ácidos orgânicos. Neste trabalho, a linhagem de bactéria *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 foi avaliada quanto à influência da utilização do modo de operação de batelada alimentada (operado utilizando-se um perfil de alimentação exponencial) no *pool* de metabólitos produzidos sob condições de anaerobiose.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Glicerol e a indústria do biodiesel

A produção de biodiesel está aumentando em todo o mundo nos últimos anos devido a seus benefícios ambientais e ao fato de que é feita a partir de fontes biológicas renováveis (AYOUB e ABDULLAH, 2012). O biodiesel vem sendo promovido como um meio para a independência energética, desenvolvimento rural e redução da emissão de gases do efeito estufa. O biodiesel pode ser produzido através da reação entre um óleo de matéria-prima com metanol ou etanol. A solubilidade do óleo em metanol é menor do que em etanol. Sua taxa de reação é limitada pela transferência de massa e o metanol permite maiores conversões devido ao produto intermediário de maior reatividade formado, o metóxido. A maioria dos processos de produção de biodiesel utiliza metanol, o qual é obtido pela indústria petroquímica. Esta dependência de metanol pode ser considerada como não-renovável (YAZDANI e GONZALEZ, 2008).

O crescimento da indústria do biodiesel é a razão principal para o notável aumento da quantidade de glicerol disponível no mercado. Glicerol bruto foi também obtido como subproduto da produção de sabão e de ácidos graxos nos últimos anos. No entanto, atualmente, a maior parte do glicerol é produzido a partir do processo de produção de biodiesel. Portanto, o preço do glicerol é determinado primariamente pela demanda e produção de biodiesel, e não de sabões e de ácidos graxos (AYOUB e ABDULLAH, 2013).

Prevê-se que o processamento de glicerol bruto em biorrefinarias beneficie a economia global da indústria de biodiesel por meio da redução dos custos de eliminação de resíduos e aumento na produção de produtos químicos de alto valor (KOUTINAS, WANG e WEBB, 2007).

A purificação do glicerol bruto para uma substância quimicamente pura resulta em um produto químico industrial valioso. No entanto, a purificação é dispendiosa e o mercado do glicerol já está saturado. Assim, o preço do glicerol bruto continua a diminuir e afeta diretamente no custo de produção de biodiesel. Esta tendência continuará conforme mais fábricas de biodiesel entrem em atividade. De acordo com relatório (HIGGINS, 2002), o custo de produção de biodiesel variou de US\$ 0,17 a US\$ 0,42 por litro na última década. Hoje, há abundância no estoque de glicerol disponível no mercado mundial e o seu preço está diminuindo dia a dia. O

preço de glicerol puro variou de US\$ 1,10 a US\$ 3,30 por quilograma, e o preço de glicerol bruto a partir de US\$0,04 a US\$ 0,33 por quilograma ao longo dos últimos anos.

O glicerol, vulgarmente conhecido como glicerina é um material de excelente utilidade e com muitas áreas de aplicação. Uma combinação única de propriedades físicas e químicas do glicerol torna-o um produto tecnicamente versátil que é facilmente compatível com muitas outras substâncias e fácil de manusear. Glicerol também é praticamente atóxico para a saúde humana bem como ao ambiente (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1979). Fisicamente, o glicerol é um líquido claro quase incolor, inodoro e viscoso, solúvel em água, higroscópico, com um ponto de ebulição elevado. Quimicamente, o glicerol é um álcool tri-hídrico, capaz de reagir como um álcool, ademais estável sob a maioria das condições (AYOUB e ABDULLAH, 2012).

Claramente, a aplicação mais comum encontrada para o glicerol se dá na indústria de fármacos e de higiene pessoal. A demanda desta categoria aumentou de 26 % para 34 % durante 1995-2006. Na verdade, o glicerol é um ingrediente ideal em muitos produtos de cuidado pessoal, principalmente ajudando a evitar a perda de umidade. No setor farmacêutico, fornece lubrificação e suavidade para muitos xaropes para tosse. Entre produtos de higiene bucal, o glicerol é comumente encontrada em cremes dentais, antissépticos bucais e gomas de mascar sem açúcar, produtos nos quais dá um sabor doce sem contribuir para a cárie dentária, bem como em cosméticos para manter a umidade da pele a fim de prevenir o ressecamento (NEUMANN, 1991).

O glicerol é também uma fonte de carboidratos e proporciona um gosto doce, mas não provoca uma secreção de insulina durante o processo de digestão. O glicerol também é usado como umectante em produtos alimentares, o que ajuda a conservar os alimentos e mantê-los frescos por longos períodos. Portanto, a demanda por glicerol está em crescimento na indústria de alimentos. De acordo com as estatísticas sobre usos de glicerol, 11 % do glicerol global foi utilizado na indústria de alimentos e 6 % no setor do tabaco em 2006, em comparação com 8 % e 4 %, respectivamente, em 2005. Na produção de tabaco, a glicerina é usada como um umectante e um edulcorante (AYOUB e ABDULLAH, 2012). Ele é utilizado como camada de plástico no papel de cigarro, bem como um adoçante em tabaco de mascar. O uso de glicerol como substrato na indústria de síntese orgânica também apresentou crescimento. Basicamente, ele fornece um

dos blocos de construção químicos básicos para a produção de espumas rígidas de poliuretano (PAGLIARO e ROSSI, 2008).

No que diz respeito à pesquisa e desenvolvimento de novas aplicações para o glicerol, de forma geral, as indústrias esperam aumentar o valor agregado do glicerol bruto (MANNAZZU et al., 2010). O sucesso da utilização em larga escala do glicerol poderá assegurar a estabilidade do mercado e o aumento do preço deste químico (BABA et al., 2013). O mercado de glicerol deverá se fortalecer com a introdução de novas aplicações para o glicerol bruto e tais novos usos podem indiretamente apoiar a redução de custo na produção do biodiesel. Outras oportunidades na exploração de aplicações mais valiosas do glicerol bruto estão disponíveis (VLYSIDIS et al., 2011). Estas oportunidades podem aumentar a produção de biodiesel e transformar o glicerol bruto em uma parte vital de energia renovável.

Tradicionalmente, o glicerol é obtido a partir de quatro processos diferentes: fabricação de sabão, produção de ácidos graxos, produção de ésteres graxos e fermentação microbiana (WANG et al., 2001). No entanto, pode também ser sintetizado a partir de óxido de propileno. As reações para a transformação direta de óleos vegetais e gorduras animais nos respectivos ésteres metílicos e glicerol são conhecidas há mais de um século. A transesterificação de triglicerídios tais como óleos de colza, palma, soja e girassol ganhou papel de importância na obtenção de biodiesel de alta qualidade (MOOTABADI et al., 2010). Vários outros processos químicos e enzimáticos para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de óleo vegetal são comercialmente disponíveis (WILSON, 2002).

O modo mais comum para produzir biodiesel é a transesterificação de triacilgliceróis contidos em óleos vegetais ou gorduras de origem animal com um álcool, na presença de um catalisador alcalino ou ácido (SALAMATINIA et al., 2010). O metanol é o álcool mais utilizado para este processo devido ao seu baixo custo. Este processo envolve a remoção da glicerina do óleo ou gordura vegetal. Durante este processo, os ésteres metílicos são separados como o produto desejado, enquanto a glicerina é considerada como o subproduto. Glicerol bruto é normalmente gerado a uma taxa de um mol de glicerol para cada três moles de ésteres metílicos sintetizados. Aproximadamente, constituem cerca de 10 % em massa da totalidade do produto durante a produção de biocombustíveis (MELERO et al., 2012).

O glicerol bruto tem baixo valor econômico devido à presença de várias impurezas. Impurezas comuns no glicerol bruto oriundo da indústria do biodiesel são umidade, cinzas, sabão e cloreto. Por vezes, estas impurezas incluem metanol residual, especialmente quando o álcool é utilizado em excesso para conduzir a transesterificação química e a recuperação total do metanol não é alcançada. Por outro lado, alguns ácidos graxos livres presentes na matéria-prima inicial podem reagir com substâncias alcalinas para formar sabões, que são solúveis na camada de glicerol. De acordo com relatório, glicerol bruto proveniente da indústria de biodiesel contém um teor de carbono médio de cerca de 25 % e pequena quantidade de metais inorgânicos como Na, Ca, K, Mg, Na, P e S poderia também estar presente. As quantidades destes, com exceção do Na, normalmente está presente na faixa de 4 ppm a 163 ppm, enquanto o teor de sódio pode exceder 1 %. Além de metais, o glicerol bruto obtido a partir do processo de transesterificação também contém proteínas (0,06-0,44 %), gorduras (1-13 %) e carboidratos (75-83 %). Em geral, consiste de cerca de 65-80 % de glicerol (THOMPSON e HE, 2006).

O uso de glicerol de baixo grau de qualidade vindo da produção de biodiesel é um desafio, já que este tipo de glicerol não pode ser usado para fins alimentares e cosméticos sem purificação adicional. A utilização ou conversão do glicerol bruto eficaz em produtos de valor agregado deverá diminuir os custos de produção de biodiesel (YANG, HANNA e SUN, 2012).

A purificação do glicerol utilizando o método de destilação é um processo caro, e o preço baixo do glicerol o torna economicamente desvantajoso (KHANNA, GOYAL e MOHOLKAR, 2012). Além disso, o glicerol apresenta baixa volatilidade, devido ao seu elevado ponto de ebulição (290 °C), e não queima diretamente em qualquer motor projetado para gasolina ou diesel (ZHOU et al., 2008). Conseqüentemente, a idéia de converter o glicerol em produtos de valor agregado se torna atraente porque apresenta uma grande oportunidade para a indústria de biodiesel para aumentar a receita e expandir seu mercado de produtos.

Uma das possibilidades para a conversão do glicerol em um produto de valor superior é a sua conversão a acroleína, que é usada em muitos produtos de química fina. A desidratação catalítica do glicerol oferece uma via alternativa para a produção de acroleína. Tal derivado de glicerol é um intermediário versátil para a síntese de fármacos, detergentes e polímeros (CORMA et al., 2008). Poliglicerol é um derivado de glicerol, o qual é amplamente utilizado na liberação controlada de fármacos e cosméticos. Este derivado é composto por várias unidades de

glicerol, que formam uma estrutura de éter ramificado com grupos terminais de hidroxila (SUNDER et al., 1999). A estrutura multifuncional e as propriedades do glicerol permitem-lhe ser facilmente convertido em vários produtos, através de diferentes vias de reação. Este processo foi totalmente revisado recentemente (ZHOU, AL-ZAINI e ADESINA, 2013).

Para utilizar o excesso de glicerol produzido a partir do processo de obtenção do biodiesel, as indústrias estão desenvolvendo métodos inovadores que podem utilizar o glicerol como um bloco de construção para a produção de produtos químicos de valor agregado. O uso de glicerol proporciona uma possibilidade promissora para a independência de combustíveis fósseis. No entanto, relatórios que mostram a competitividade de custos entre os produtos derivados do petróleo e produtos obtidos a partir de glicerol sugerem que o equilíbrio só pode ser mantido quando o preço de custo do glicerol é significativamente menor do que dos seus homólogos à base de petróleo (ZHOU, NGUYEN e ADESINA, 2012).

Biologicamente, o glicerol pode ser convertido por microrganismos em uma variedade de produtos químicos valiosos, tais como 1,3-propanodiol, di-hidroxiacetona, ácidos succínico, propiônico, e cítrico, etanol, pigmentos, polihidroxicanoatos, biosurfactantes, 2,3-butanodiol, aminoácidos, ácidos glicéricos, d-xilulose, hidrogênio, 3-hidroxiacetaldeído e ácidos graxos (SILVA, DA, LIMA, DE e CONTIERO, 2014).

A bioconversão microbiana de glicerol tem um número de vantagens sobre a síntese química, incluindo uma maior seletividade em relação aos produtos finais, eficiência, e um tempo de reação mais curto. Em geral, a síntese química requer várias etapas intermediárias antes de chegar ao produto final, catalisadores específicos e condições de processo bem controladas, tais como altas temperaturas e altas pressões (ZHENG, CHEN e SHEN, 2008), fatores que favorecem a rota biotecnológica de bioconversão de glicerol (MAERVOET et al., 2011).

2.2. 1,3-propanodiol

Um dos principais produtos obtidos através da bioconversão microbiana de glicerol é o 1,3-propanodiol (1,3-PDO), um poliol com aplicações em cosméticos, alimentos, lubrificantes, e na indústria de fármacos (ROSSI et al., 2012).

1,3-PDO é um composto orgânico viscoso e incolor de fórmula $C_3H_8O_2$, o qual é não-inflamável, apresenta baixa toxicidade e é miscível em água, álcoois e éteres, o que o torna de fácil transporte. Historicamente, é considerado um químico de alto valor agregado, sobretudo por apresentar propriedades desejáveis para participação em reações de policondensação. Trata-se de um composto único para certas formulações industriais. No entanto, seu alto custo e disponibilidade limitada no passado se mostraram dois fatores importantes que restringiram suas aplicações, principalmente como solvente na produção de dioxinas (KAUR, SRIVASTAVA e CHAND, 2012).

Este cenário se alterou entre 1995 e 1998 após o anúncio da comercialização de um poliéster com base em 1,3-PDO denominado tereftalato de politrimetileno (PTT) pelas empresas Dupont (KURIAN, 2005) e Shell (SHELL, 1995). Este copoliéster é um produto de condensação de 1,3-PDO e ácido tereftálico principalmente utilizado na manufatura de tapetes e fibras têxteis, embora também encontre aplicação em termoplásticos, filmes e revestimentos. O desenvolvimento de tereftalato de politrimetileno (PTT), um termoplástico com propriedades físico-químicas superiores ao tereftalato de polietileno (PET), utilizado na produção de tecidos, tapetes e plásticos, criou uma renovada demanda por 1,3-propanodiol.

Considera-se 1,3-PDO adequado para a produção de PTT uma vez que sua utilização não incorpora a mesma dureza comparado a etileno glicol e evita a flexibilidade resultante da utilização de 1,4-butanodiol ou 1,6-hexadiol (WANG, HAWLEY e DEATHOS, 2003). O PTT derivado de 1,3-PDO tem aspecto de mola ou forma de “zigue-zague”, o que confere melhores características na capacidade de esticar e recuperar-se de tal deformação. Em adição, poliésteres produzidos a partir de 1,3-PDO apresentam menores temperaturas de tingimento, maior resistência à ação dos raios UV, bem como melhor suscetibilidade a lavagem em comparação a outros poliésteres comercialmente disponíveis (KRAUS, 2008). Atualmente, as marcas

registradas de PTT mais comumente encontradas no mercado são CDP Natureworks (da Dow Chemical), Dupont's Sorona (da Dupont) e Shell Chemical's Corterra (da Shell) (KURIAN, 2005).

Na área de uretanos termoplásticos (TPUs), o uso de 1,3-PDO pode levar a melhorias na estabilidade térmica e hidrolítica e estabilidade térmica dimensional (FORSCHNER e GWYN, 1999). O 1,3-PDO pode ser utilizado para modificar sistemas de poliésteres. Tal propriedade é particularmente benéfica na produção de revestimentos em pó, nos quais substituição parcial por 1,3-PDO agrega maior flexibilidade sem afetar outras propriedades essenciais como capacidade de armazenagem. Na formulação de líquidos de resfriamento para motores, 1,3-PDO apresenta melhor estabilidade calorífica, menor corrosão e menor toxicidade que etileno glicol. Em adição, 1,3-PDO apresenta uma variedade de outras aplicações, entre as quais podem ser citadas a formulação de laminados, solventes, moldes, adesivos, resinas, detergentes, cosméticos e desodorantes. 1,3-PDO é um importante intermediário para síntese orgânica e pode ser utilizado em vários medicamentos (vitamina H e medicamentos imunossupressores, por exemplo), repelentes para insetos, fragrâncias, entre outros (UMARE, CHANDURE e PANDEY, 2007).

O crescimento rápido do mercado global de 1,3-PDO está fortemente relacionado com a crescente demanda por seus derivados e sua conversão a produtos de alto valor agregado. No ano de 2012, a demanda mundial por 1,3-PDO atingiu o patamar de 60,2 mil toneladas, o que representa um déficit no suprimento deste mercado. Prospecções apontam o crescimento de tal demanda para 150 mil toneladas anuais em 2019 (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2012). Com base em outro relatório de pesquisa de mercado, estima-se que a venda de 1,3-PDO deverá passar de U\$ 150 milhões registrados em 2012 para U\$ 560 milhões em 2019 (MARKETSANDMARKETS, 2012).

2.2.1. Síntese química de 1,3-PDO

Atualmente, os processos de síntese convencionais de 1,3-propanodiol são obtidos através da hidratação da acroleína, hidroformilação de óxido de etileno e, mais recentemente, através da transformação enzimática de glicerol. Quimicamente, 1,3-PDO é produzido através de duas vias diferentes. Um deles utiliza acroleína (2-propenal) como uma matéria-prima, a qual é hidratada com ácido 3-hidroxiopropiônico, sendo o intermediário então hidrogenado na presença de um catalisador a 1,3-PDO. Outra via envolve a hidroformilação de óxido de etileno com CO e hidrogênio sob pressão elevada na presença de um catalisador e um solvente (SAXENA et al., 2009). Esta reação produz um dioxano que é hidrogenado a 1,3-PDO. Estes métodos são dispendiosos, criam poluentes, e são dependentes de derivados de petróleo (KAUR, SRIVASTAVA e CHAND, 2012).

O modo de operação convencional para a produção de 1,3-PDO consiste no método empregado pelas duas companhias que foram instrumentais no surgimento do interesse por esse produto. A Dupont iniciou seu processo utilizando acroleína, a qual era convertida a 3-hidroxiopropionaldeído (3-HPA) por hidratação, seguido de uma etapa de hidrogenação que levava a 1,3-PDO. A Shell, por sua vez, seguia o método de hidroformilação de óxido de etileno a 3-hidroxiopropanal (LAWRENCE e SULLIVAN, 1972). Este era então extraído e hidrogenado para produzir 1,3-PDO. No entanto, diversos obstáculos no emprego de tais métodos químicos, como a necessidade de altas pressões e temperaturas, uso de catalisadores caros, formação de intermediários tóxicos, dependência de materiais não-renováveis, bem como baixas conversões levaram a um crescente interesse no desenvolvimento da obtenção biológica de 1,3-PDO, a qual geraria um processo mais limpo (ARNTZ et al., 1991).

2.2.2. Síntese biológica de 1,3-PDO

Diversos processos foram desenvolvidos para a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol bruto ou glicerol puro. Segundo Zeng e Biebl (2002) e Wang et al. (2003), 1,3-PDO pode ser produzido a partir de glicerol através de processos fermentativos utilizando microrganismos. O desenvolvimento da rota biológica de produção de 1,3-PDO é particularmente interessante, uma vez que utiliza matéria prima renovável e cultivos a pressões e temperaturas normais, gerando coprodutos não-tóxicos. A produção de 1,3-PDO a partir de glicerol ocorre na natureza e este é o único substrato que pode ser fermentado a 1,3-PDO. Outras fontes de carbono como glicose, hidrolisado de milho e melaço de cana de açúcar também foram testados para a produção de 1,3-PDO. Porém, até o momento, não há microrganismos selvagens capazes de metabolizar açúcares diretamente para a produção de 1,3-PDO, sendo empregadas, nesses casos, fermentações envolvendo uma combinação de microrganismos ou o emprego de microrganismos geneticamente modificados, os quais receberam genes para conversão de açúcares a glicerol, e então, a conversão de glicerol a 1,3-PDO (KAUR, SRIVASTAVA e CHAND, 2012).

Alguns microrganismos têm demonstrado capacidade de produzir 1,3-PDO a partir de glicerol, entre os quais constam *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii*, *Bacillus welchii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum* e *Enterobacter agglomerans* (ZHAO, CHEN e YAO, 2006). 1,3-PDO é mais reduzido do que glicerol, motivo de a fermentação de glicerol produzir 1,3-PDO e um co-produto mais oxidado. Em enterobactérias tais como *C. freundii* e *K. pneumoniae*, a fermentação de glicerol resulta na produção de 1,3-PDO e ácido acético como os principais produtos de fermentação (HOMANN et al., 1990), enquanto espécies de *Clostridium* produzem 1,3-PDO juntamente com uma variedade de outros produtos de fermentação, incluindo o ácido butírico, n-butanol, ácido acético, etanol e lactato, dependendo da linhagem e das condições de cultivo (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013). Uma das bactérias mais estudadas e eficientes para a produção de 1,3-propanodiol é *K. pneumoniae*.

2.2.3. Rota metabólica de produção de 1,3-PDO: função dos genes e das enzimas produzidas

A rota metabólica de produção de 1,3-PDO a partir de glicerol é um processo acoplado de oxidação-redução, o qual foi elegantemente descrito no trabalho de Kaur et al. (2012). Nesse processo, a geração de energia na forma de ATP e equivalentes redutores na forma de NADH + H⁺ ocorre no lado oxidativo, enquanto a regeneração de NAD⁺, concomitante com a formação do produto reduzido 1,3-PDO, ocorre no lado redutivo (Figura 1).

NADH + H⁺ é gerado durante as reações glicolíticas (ramo oxidativo), as quais também geram diversos outros coprodutos. No lado redutivo, glicerol é primeiramente desidratado a 3-HPA através de uma reação catalisada pela enzima B-12 dependente glicerol desidratase (GDHt), o qual é então reduzido a 1,3-PDO pela enzima NADH + H⁺-dependente 1,3-PD desidrogenase (1,3-PD DH). Outras desidratases foram descritas na literatura como sendo igualmente B12-dependentes, tal como GDHt em *C. butyricum*. Diferentes tipos de coprodutos são formados por diferentes microrganismos no lado oxidativo. Enquanto ácido butírico e ácido acético são os principais coprodutos formados por *C. butyricum*, butanol é produzido por *C. pasteurianum*. Além destes, etanol, ácido lático e 2,3-butanodiol são produzidos por Enterobactérias. As reações presentes até a formação de piruvato são comuns a todos os microrganismos. Glicerol é desidrogenado a dihidroxiacetona (DHA) com a ajuda da enzima NAD-dependente glicerol desidrogenase (GDH) e é então fosforilado pela DHA quinase (DHAK) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), um dos metabólitos na rota glicolítica. Ocorre a produção de duas moléculas de NADH + H⁺ e uma molécula de ATP durante a conversão de glicerol a piruvato. Uma rota alternativa para a degradação de glicerol é observada em *Klebsiella* sp. quando cultivadas sob condições aeróbias. Glicerol é fosforilado a sn-glicerol-3-fosfato por uma glicerol quinase e é então convertido a DHAP pela NAD-dependente glicerol-3-fosfato desidrogenase. Em *Lactobacillus* sp., o lado oxidativo do metabolismo de glicerol não é observado e, portanto, tais microrganismos necessitam uma fonte de carbono adicional a fim de preencher os requerimentos de energia e de equivalentes redutores.

desidratase é mediada por outra enzima, a glicerol desidratase reativase. A regeneração da coenzima B12 da sua forma inativa é mediada por duas subunidades do fator reativante da enzima GDHt codificadas pelos genes *dhaF* e *dhaG*. A segunda reação do lado oxidativo é catalizada pela 1,3-PD desidrogenase codificada pelo gene *dhaT*. Uma isoenzima da 1,3-PD DH que se chama 1,3-PD oxidoreductase foi também relatada em *Escherichia coli*, na qual é codificada pelo gene *yqhD* e para a qual verificou-se existir atividade oxidoreductiva superior se comparada a 1,3-PD DH. Tal enzima é NADP-dependente, diferente da 1,3-PD DH, a qual é NAD-dependente.

Durante o processo fermentativo, o piruvato obtido pela rota metabólica da glicólise irá competir com 3-HPA por NADH-oxidoreductase para formar outros coprodutos como etanol, ácido cítrico, ácido acético, butanol, entre outros. A composição de coprodutos poderá diferir dependendo dos microrganismos envolvidos no processo, bem como das condições utilizadas. Por exemplo, a formação de propanodiol é favorecida quando o processo é conduzido na faixa de pH de 6,5 a 7,5, uma vez que pH inferior a 6,5 estimula a formação de 2,3-butanodiol. A formação de coprodutos pode resultar em um decréscimo na conversão em propanodiol. O acetato produzido no processo fermentativo apresenta efeito inibitório na formação de propanodiol. Em um processo anaeróbio ideal, a máxima conversão teórica calculada para 1,3-propanodiol a partir de glicerol é de $0,875 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ de glicerol. Durante esse processo, acredita-se que toda acetilcoenzima A é consumida pelo ciclo do ácido cítrico, sem que ocorra alimentação de NADH para a rota metabólica de fosforilação oxidativa para formação de acetato, assim conduzindo a eficiência mais alta na criação de equivalentes redutores.

A fim de obter-se a conversão máxima de 1,3-PDO, os coprodutos formados na rota de redução do piruvato devem ser mantidos no nível mais baixo possível ou ter sua formação impedida. Inicialmente, é necessário que os pesquisadores determinem os principais competidores durante a produção de propanodiol e removam-os do processo, se possível. Por exemplo, Zhang et al. (2006) determinaram que etanol é o principal coproduto na produção de 1,3-PDO utilizando *Klebsiella pneumoniae* YMU2 como biocatalisador. Duas moléculas de NADH são consumidas para formar uma molécula de etanol. Nesse caso, a acetaldeído desidrogenase (ALDH) oxida uma molécula de NADH a fim de converter a acetilcoenzima A em

acetaldeído para posterior produção de etanol pela etanol desidrogenase e oxidar outra molécula de NADH.

Dessa forma, tais enzimas (acetaldeído desidrogenase e etanol desidrogenase), as quais oxidam NADH para produzir etanol, são os principais competidores durante a produção de 1,3-PDO. Os autores tentaram inativar a codificação do gene para ALDH e obtiveram sucesso no aumento de conversão para $0,7 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$. Outro estudo foi relatado por Xu et al. (2009), no qual o gene *ldhA* na *K. pneumonia* HR526 foi bloqueado a fim de impedir o comportamento da lactato desidrogenase. A produção de lactato foi eliminada e a conversão mais alta de 1,3-PDO obtida foi de $0,52 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$.

2.2.4. Bioconversão de glicerol a 1,3-PDO: processo fermentativo

Uma das abordagens para a otimização da produção microbiana de 1,3-PDO a partir de glicerol é a otimização de processo. Diferentes estratégias de operação de biorreatores vem sendo implementadas por diversos autores buscando maximizar a produção deste produto. Entre os microrganismos capazes de sintetizar 1,3-PDO, destacam-se Enterobactérias e Clostrídios por apresentarem melhores conversões e produtividades (GONZÁLEZ-PAJUELO, ANDRADE e VASCONCELOS, 2005; ZENG et al., 1994).

Pesquisa referente ao cultivo em batelada foi realizada por Günzel et al. (1991) e Barbirato et al. (1998) a fim de demonstrar a possibilidade de escalonamento da produção de 1,3-PDO para biorreatores de escala industrial e definir o melhor organismo para tal processo, respectivamente. *C. butyricum* foi o candidato mais promissor para o bioprocessamento industrial, uma vez que apresentou maior conversão em 1,3-PDO, não ocorreu acúmulo de 3-HPA, e este microrganismo apresentou menores tempos de fermentação comparados a cultivos com *K. pneumoniae*, *C. freundii* e *E. agglomerans* (BARBIRATO et al., 1998). O uso de glicerol (67 % em massa) para a produção de 1,3-PDO utilizando *C. butyricum* CNCM1211 foi avaliado por Himmi et al. (1999) e uma alta concentração de 1,3-PDO de $65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ obtida a partir de $121 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicerol bruto foi obtida. Biebl et al. (1992) investigaram o uso de *C. butyricum* DSM 5431 na produção de 1,3-PDO. Os estudos levaram a uma concentração final de $29,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ do produto

com consumo de $52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicerol, assim obtendo uma conversão em 1,3-PDO de $0,56 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Experimentos em batelada sem controle de pH foram realizados por González-Pajuelo et al. (2005) utilizando *C. butyricum* VPI3266. Uma conversão em 1,3-PDO de $0,58 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, com consumo de glicerol a 41 % em massa, foi observada neste trabalho. Uma alta concentração de 1,3-PDO ($61 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e alta produtividade ($1,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) foram alcançadas ao realizar-se cultivos com *K. pneumoniae* DSM2026 (HOMANN et al., 1990).

Embora cultivos em batelada mostrem-se como uma estratégia simples para a produção do metabólito desejado, esta forma de operação apresenta problemas relacionados à limitação de substrato ao final do processo fermentativo, bem como inibição pela formação de produtos inerentes à produção de 1,3-PDO de glicerol. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de estratégias que facilitem o cultivo sob condições sob as quais não surjam situações de limitação ou inibição, assim melhorando a produtividade global da fermentação.

A relação inversa observada entre alta concentração de substrato inicial e a velocidade de crescimento do microrganismo indica que o modo de operação em batelada alimentada poderia ser utilizado como uma estratégia proveitosa para a obtenção de alta concentração e/ou produtividade de 1,3-PDO (SAINT-AMANS et al., 1994).

Um processo de batelada alimentada simples para alta produção de 1,3-PDO a partir de glicerol utilizando *C. butyricum* VPI3266 foi utilizado por Saint-Amans et al. (1994), que acoplou a alimentação de substrato à produção volumétrica de CO_2 produzido durante a fermentação. A produção de $65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,3-PDO com produtividade volumétrica de $1,21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e conversão de $0,69 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ foi alcançada neste estudo, com eliminação da inibição por substrato. O acoplamento da alimentação de glicerol ao consumo de amônia como solução básica foi testada por Reimann e Biebl (1996) utilizando *C. butyricum* DSM 5431 e mutantes tolerantes a concentrações de produto. Uma redução significativa nos tempos de cultivo foi reportada, o que foi atribuído à manutenção da concentração de substrato em níveis não-limitantes, levando a crescimento mais rápido. A conversão de glicerol bruto a 1,3-PDO por uma linhagem isolada denominada *C. butyricum* IK124 resistente a altas concentrações de substrato e produtos foi avaliada (HIRSCHMANN et al., 2005). Uma estratégia de alimentação combinando baixa adição de glicerol correlacionada à utilização de base à leitura *online* da concentração de glicerol foi testada. Uma concentração final de 1,3-PDO de $87 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ com produtividade de 1.9

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ foi alcançada utilizando glicerol refinado. Em adição, o uso de glicerol bruto conduziu a alta concentração e produtividade de 1,3-PDO de $80,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente, que foram considerados comparáveis aos resultados obtidos utilizando glicerol refinado. A produção de 1,3-PDO de glicerol bruto em fermentadores de 1 L e 200 L utilizando *C. butyricum* AKR102a isolado foi recentemente testada (WILKENS et al., 2012). Fermentação em batelada alimentada levou a concentração e produtividade de 1,3-PDO (de $76,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente) comparáveis aos resultados obtidos utilizando glicerol puro ($93,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $3,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente). A diferença em produção de 1,3-PDO foi mais pronunciada quando a concentração deste metabólito no meio de cultivo tornou-se superior a $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Tal queda de produção foi atribuída pelos autores à presença de impurezas como ácidos graxos, íons metálicos pesados e sais, os quais são constituintes inerentes do glicerol bruto. O escalonamento a fermentadores de 200 L foi tentado neste mesmo estudo. Uma concentração de 1,3-PDO relativamente alta de $61,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ com produtividade de 1,3-PDO de $2,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ foi atingida. Os resultados obtidos foram considerados promissores para a posterior otimização do processo em larga escala de produção de 1,3-PDO. Em um estudo recente utilizando a alimentação pulsada de glicerol bruto sob condições não-estéreis a uma cultura de *C. butyricum* VPI1718, concentração máxima de 1,3-PDO de $67,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ foi obtida ao final de 87 h de fermentação (CHATZIFRAGKOU, PAPANIKOLAOU, et al., 2011). Utilizando a mesma linhagem, o impacto da estratégia para manutenção de anaerobiose na produção de 1,3-PDO foi avaliada (CHATZIFRAGKOU, AGGELIS, et al., 2011). Foi observado que a aspersão contínua de nitrogênio durante o cultivo em batelada alimentada em oposição à anaerobiose gerada naturalmente rendeu resultados diferentes quanto à produção de 1,3-PDO e de ácido. Sob aspersão contínua, $70,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,3-PDO foram produzidas por *C. butyricum* VPI1718. Tal produção diminuiu consideravelmente para $30,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sem esta adição. Ademais, a produção de ácido láctico foi caracteristicamente alta em experimentos de batelada alimentada com geração de anaerobiose natural, o que afetou negativamente tanto o crescimento de biomassa como a produção de 1,3-PDO. Ji et al. (2009) desenvolveram e analisaram diferentes estratégias de alimentação fundamentadas no controle de pH a fim de obter alta produção de 1,3-PDO utilizando *K. pneumoniae* ME-308. As duas primeiras tentativas utilizando alimentação de glicerol e de NH_3 , em linhas separadas e em conjunto na forma de mistura, não se mostraram benéficas, uma vez que conduziram a limitação por glicerol ou inibição (devido à falta de

monitoramento da concentração de glicerol no meio de cultivo) ou a concentrações relativamente altas de 2,3-BDO (pH de 6,3) ou lactato (pH de 7,3), os quais competem com 1,3-PDO por $\text{NADH} + \text{H}^+$, assim reduzindo a concentração final deste último. Finalmente, a última abordagem testada foi a flutuação do valor de pH entre 6,3 e 7,3 através da adição de uma mistura de glicerol e NH_3 e H_2SO_4 30 %. Esta forma de operação limitou a formação de coprodutos, reduziu a presença de glicerol não-metabolizado no meio de cultivo ao final da fermentação e resultou em alta concentração de $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,3-PDO. Recentemente, fermentação em batelada alimentada utilizando hidrolisado hemicelulósico de palha de milho como substrato juntamente com glicerol para produção de 1,3-PDO foi avaliada por Jin et al. (2011). Como estratégia para a condução da batelada alimentada com *K. pneumoniae*, a variação do estado redox foi regulado automaticamente pela vazão de alimentação utilizada (mantendo a concentração de xilose variando entre 5 e $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). O estudo conduziu a concentração de 1,3-PDO de $71.58 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, e conversão e produtividade de $0,65 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $1,93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente, o que representou ganhos de 17,8 %, 25 % e 17,7 %, respectivamente, em comparação ao uso de glicerol como substrato único.

Embora concentrações razoavelmente altas de 1,3-PDO tenham sido obtidas nos trabalhos existentes que utilizaram o modo de operação de batelada alimentada, existe um número limitado de publicações com este enfoque. Existem dificuldades inerentes a esta forma de operação, sobretudo referentes à utilização de sensores *online* esterilizáveis para acompanhamento das variáveis de processo (sobretudo concentração de substrato), os quais são praticamente não-existent. Como resultado, existe vasta oportunidade de melhoria no desenvolvimento de estratégias de batelada alimentada para aumentar a produção de 1,3-PDO.

2.3.Etanol

Nas últimas décadas, a produção e o consumo mundial de biocombustíveis se expandiram significativamente devido a políticas de estímulo que objetivam, entre outras questões, a redução dos efeitos de emissões de poluentes causadores do efeito estufa, bem como a diversificação da matriz energética. Espera-se que a demanda por biocombustíveis aumente nos próximos anos

(JONKER et al., 2015). A produção mundial de etanol vem sendo dominada pelos EUA e pelo Brasil, sendo que, para este último, a produção é primariamente baseada na fermentação de açúcares extraídos da cana de açúcar, cuja oferta se origina predominantemente (em torno de 90 %) da região centro-sul do país (SEABRA et al., 2011).

O Brasil apresenta potencial de aumento da produção de etanol para o futuro. Opções incluem a expansão das áreas de cultivo, melhorias nos rendimentos dos processos de agricultura e industriais, e a introdução de novas rotas para o processamento industrial, as quais podem incluir um aprimoramento na obtenção de etanol de primeira geração (fermentação de açúcares) ou de segunda geração (conversão de material lignocelulósico) (JONKER et al., 2015).

No entanto, devido à complexa estrutura da lignocelulose, a biomassa utilizada para produção de etanol de segunda geração precisa passar por uma etapa crítica de pré-tratamento a fim de tornar disponíveis os açúcares ali presentes para a fermentação a etanol (LIMAYEM e RICKE, 2012). Após, hemicelulose e pequena quantidade de celulose são hidrolisadas, ocorrendo em sequência a etapa de fermentação e separação do etanol formado. Hidrólise combinada com fermentação é um processo mais complexo que a fermentação de açúcares mais simples. Diversas técnicas diferentes de pré-tratamento e hidrólise vem sendo propostas para viabilizar esta tecnologia, melhorando rendimentos de etanol e reduzindo custos de produção. Atualmente, tratamento com vapor seguido de hidrólise enzimática é considerada uma das opções mais viáveis para a produção de etanol de materiais lignocelulósicos (MACRELLI, MOGENSEN e ZACCHI, 2012).

Esforços significativos na pesquisa concentraram-se na engenharia de outros microrganismos para produzir etanol a conversões e concentrações máximas a partir de açúcares derivados de materiais lignocelulósicos . Apesar do sucesso destes esforços de engenharia, o estado de oxidação de açúcares tais como glicose determinam que cerca de metade do seu peso seja perdido na forma de CO_2 durante o processo de fermentação, reduzindo a conversão ao produto. Por outro lado, a natureza reduzida do glicerol permite a co-produção de etanol e ácido fórmico (ou etanol e hidrogênio), permitindo maiores conversões globais aos produtos em comparação com outros açúcares (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013).

Assim, nos últimos anos vem surgindo um interesse crescente referente à conversão de glicerol em etanol, sobretudo glicerol bruto oriundo da indústria do biodiesel. Considera-se que o

custo de produção ao utilizar-se glicerol como substrato é reduzido em aproximadamente 40 % em relação à produção a partir de açúcares derivados de milho, por exemplo, matéria-prima mais utilizada para essa finalidade nos EUA (YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Recentes descobertas de que *E. coli* (GONZALEZ et al., 2008) e *Paenibacillus macerans* (GUPTA et al., 2009) fermentam glicerol de uma maneira etanol-1,2-PDO-dependente sugere a possibilidade de utilizar estes organismos para a conversão de glicerol bruto em etanol. Além destas espécies, *Klebsiella planticola* tem sido utilizada para a coprodução de etanol e de ácido fórmico a partir de glicerol (JARVIS, MOORE e THIELE, 1997), e *Enterobacter aerogenes* foi utilizada para a conversão anaeróbia de glicerol em etanol e hidrogênio (ITO et al., 2005). O glicerol foi também convertido a etanol e pequenas quantidades de ácido fórmico e ácido láctico, por uma linhagem recentemente isolada de *C. freundii* (designada como FMCC-207) (METSOVITI et al., 2012). Esta linhagem foi capaz de produzir $14,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol, com uma conversão de $0,45 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, com uma produtividade volumétrica de $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Uma linhagem recentemente isolada de *Klebsiella oxytoca* (FMCC-197) mostrou a capacidade de coproduzir concentrações elevadas de etanol ($25,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) juntamente com 1,3-PDO ($50,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e ácido láctico ($16,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) através de fermentações em batelada alimentada com glicerol bruto (METSOVITI et al., 2012).

2.4. 2,3-Butanodiol

2,3-butanodiol (2,3-BDO) é um álcool que pode existir sob as formas isoméricas: D-(-)-, L-(+)- e meso- (Figura 2). Os pontos de ebulição desses três estereoisômeros diferem ligeiramente entre si, variando de $177 \text{ }^\circ\text{C}$ a $182 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo, no entanto, todos consideravelmente mais altos que o da água. Dessa forma, uma grande quantidade de água precisa ser evaporada através de destilação durante a recuperação de 2,3-BDO do caldo fermentado. É por isso que métodos alternativos para a recuperação deste produto, quando obtido biologicamente, vêm sendo desenvolvidos (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

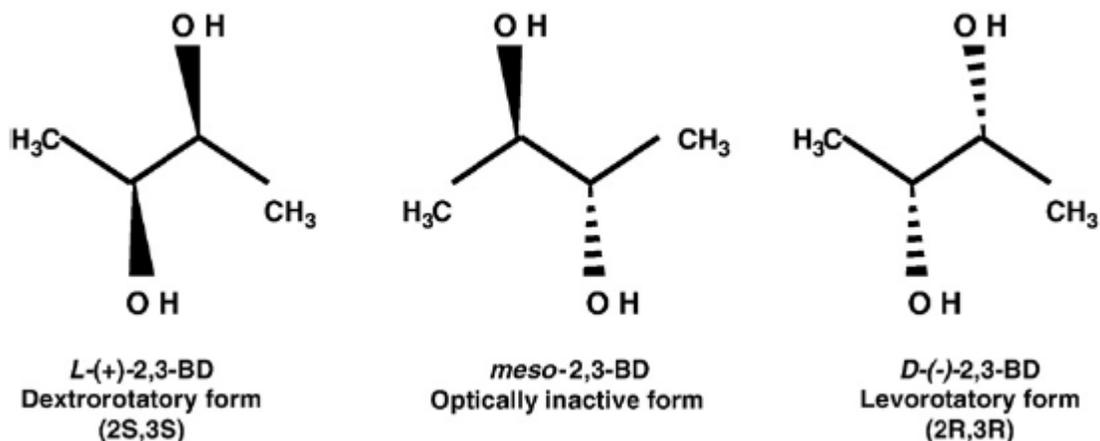


Figura 2: Estereoisômeros de 2,3-butanodiol (2,3-BDO) (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

Uma das aplicações de maior interesse para 2,3-BDO é sua conversão a 1,3-butadieno, o qual pode ser utilizado na produção de borracha sintética. Devido a seu baixo ponto de fusão de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2,3-BDO é utilizado como um agente anticongelante (SOLTYS, BATTÀ e KONERU, 2001). Em adição, este produto, bem como seus derivados, tem encontrado aplicação na produção de plásticos e de solventes. O produto da desidrogenação do 2,3-BDO, o diacetil, pode ser aplicado como um agente flavorizante de alto valor agregado na indústria de alimentos, conferindo sabor amanteigado (BARTOWSKY e HENSCHKE, 2004). O diacetil é também um aditivo alimentício bacteriostático, uma vez que inibe o crescimento de microrganismos. A desidratação do 2,3-BDO gera metiletilcetona, que é um aditivo de combustíveis que apresenta calor de combustão mais alto que o do etanol. Este produto pode também ser utilizado como solvente para resinas e vernizes. O calor de combustão do 2,3-BDO ($27.198\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) se compara favoravelmente a outros combustíveis líquidos, como, por exemplo, metanol ($22.081\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) e etanol ($29.055\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$). Misturas equimolares de etanol e 2,3-BDO fornecem um calor de combustão combinado de $27.660\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$, portanto a presença de etanol não afeta a utilidade de 2,3-BDO nessa aplicação (YU e SADDLER, 1982). Poliuretano-maleimidas (PUMAs) sintetizadas pela esterificação de 2,3-BDO com ácido maleico apresentam utilidade em aplicações cardiovasculares (TANZI et al., 1999). Outros produtos de transesterificação de 2,3-BDO normalmente têm aplicação no ramo farmacêutico e cosmético. Entre outras aplicações potenciais de 2,3-BDO constam: produção de tintas para impressão, perfumes, fumigantes,

spandex, agentes umidificantes e suavizantes, plastificantes (como nitrato de celulose, cloreto de polivinila e poliacrilatos) e transportadores para fármacos (GARG e JAIN, 1995).

Até o momento, a função metabólica do 2,3-BDO não foi esclarecida. No entanto, acredita-se que ele exerça um papel importante na prevenção da acidificação intracelular através da alteração do metabolismo da produção de ácido para a formação de compostos neutros (BLOMQUIST et al., 1993). Foi demonstrado que a síntese de 2,3-BDO é induzida sob condições ácidas (NAKASHIMADA et al., 2000), o que pode sugerir que, sendo um metabólito de pH neutro, 2,3-BDO atua contra alta acidificação. Por outro lado, a maior parte dos estudos realizados sobre a influência de baixos pHs na síntese desse metabólito utilizou ácido acético (BARRETT et al., 1983; NAKASHIMADA et al., 2000), o qual sabe-se induzir as enzimas envolvidas na rota metabólica de formação de 2,3-BDO (BRYN, ULSTRUP e STØRMER, 1973). A segunda função atribuída à rota metabólica do 2,3-BDO é a regeneração do excesso de poder redutor associado à glicólise. Assim, a rota do 2,3-BDO, como ocorre em outros processos fermentativos, participa na regulação da razão NADH/NAD⁺ na célula. Finalmente, a síntese de 2,3-BDO é considerada como uma estratégia de armazenamento de carbono e energia (XIAO e XU, 2007). 2,3-BDO pode ser reutilizado durante a fase estacionário quando a fonte de carbon e energia tiver sido consumida.

No atual estágio da pesquisa de bioprocessos para produção de 2,3-BDO, microrganismos que se destacam como eficientes produtores deste metabólito são *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *B. polymyxa*. *E. aerogenes* também é considerado como um microrganismo promissor nessa aplicação: sob condições anaeróbias estritas, ele produz preferencialmente hidrogênio, porém, quando cultivado sob condições de microaerofilia, torna-se um produtor de 2,3-BDO semelhante a *K. oxytoca* (PEREGO et al., 2000). *Klebsiella sp.* apresentam um grande espectro de substratos utilizáveis (incluindo glicose, manose, galactose, xilose, arabinose, celobiose e lactose), são amplamente distribuídas na natureza e apresentam estabilidade sobre uma variedade de condições ambientais, embora trate-se de um gênero osmossensível. A linhagem *K. pneumoniae* GT1 é capaz de converter glicerol quase integralmente a 2,3-BDO sob condições de microaerofilia e baixo pH, reduzindo, dessa forma, a produção de 1,3-propanodiol (BIEBL et al., 1998). *Klebsiella sp.* e *Enterobacter sp.* são membros da família Enterobacteriaceae. Eles produzem L(+)- e meso estereoisômeros de 2,3-

BDO. *B. polymyxa* é uma das poucas espécies capazes de crescimento anaeróbio que vêm recebendo interesse histórico devido a sua habilidade de produzir somente o *levo*-isômero de 2,3-BDO (HESPELL, 1996). Além de monoaçúcares, a espécie é capaz de fermentar polímeros como xilana, inulina e amido. *B. licheniformis* é uma espécie semelhante, embora esta produza lactato como coproduto. *B. subtilis* produz uma mistura de D(-)- e meso-estereoisômeros, e glicerol no lugar de etanol como coproduto de fermentação (MADDOX, 1996). *B. amyloliquefaciens* se comporta de forma semelhante, embora produza um número menor de produtos.

K. pneumoniae produziu 2,3-BDO a partir de hemicelulose de madeira hidrolizada com ácido (YU e SADDLER, 1982), hidrolisado de trigo (OLSON e JOHNSON, 1948), soro de queijo (BARRETT et al., 1983), melaço de açúcar de beterraba (MCCALL e GEORGI, 1954), rejeitos de cítricos (LONG e PATRICK, 1961) e permeado de soro (LEE e MADDOX, 1984). Outro substrato de baixo custo, considerado um dos mais eficientes para a produção de 2,3-BDO, é o glicerol. Fermentação eficiente foi alcançada ao utilizar-se *Klebsiella sp.* utilizando este substrato. A linhagem *K. pneumoniae* DSM 2026 foi considerada excelente fermentadora de glicerol, embora, a linhagem GT1 tenha atuado melhor sob condições de pH não controlado, o que conhecidamente favorece a formação de 2,3-BDO (BIEBL et al., 1998; MENZEL, ZENG e DECKWER, 1997). Biebl et al. (1998) afirmaram que a proporção dos produtos obtidos depende fortemente do valor de pH quando glicerol é utilizado como única fonte de carbono. Os autores utilizaram valores de pH inferiores a 7,0 a fim de alcançar alta formação de 2,3-BDO, obtendo êxito.

O suprimento de oxigênio é a variável mais importante na fermentação a 2,3-BDO, o qual é produzido sob baixo fornecimento de O₂. NADH da glicólise é regenerado por BDH em uma reação reversível em que acetoína é transformada em 2,3-BDO. Dessa forma, o balanço entre NAD⁺/NADH é mantido pela relação de produção acetoína:2,3-BDO (BLOMQVIST et al., 1993). Foi verificado que sob condições aeróbias, α -ALS é rapidamente e irreversivelmente inativada, assim impossibilitando a síntese de 2,3-BDO sob alto fornecimento de O₂ (KOSARIC, MAGEE e BLASZCZYK, 1992). No entanto, a aeração (precisamente, condição de microaerofilia) aumenta sua produção (BARRETT et al., 1983; NAKASHIMADA et al., 2000). Esse fenômeno foi elegantemente explicado por Voloch et al. (1985). Primeiramente, deve-se

notar que a maioria dos estudos empregou *Klebsiella* sp. ou *B. polymyxa*, ambos anaeróbios facultativos. Tais microrganismos obtêm energia através de duas rotas metabólicas distintas: respiração e fermentação. Quando o suprimento de O₂ é limitado, ambos caminhos permanecem ativos simultaneamente. As conversões em 2,3-BDO dependem das atividades referentes a cada uma destas rotas.

Portanto, a conversão em 2,3-BDO pode ser maximizada através da minimização do suprimento de oxigênio, já que isso limita a respiração. Porém, ao reduzir-se a disponibilidade de O₂, a biomassa formada também é reduzida e, por consequência, a conversão em 2,3-BDO resultante diminui. Isso é resultado de uma relação direta entre produtividade volumétrica de 2,3-BDO e a concentração de biomassa, existindo, assim, um compromisso entre estes fatores. Em adição, a razão entre a demanda de oxigênio e seu suprimento determinará a distribuição dos metabólitos produzidos (VOLOCH et al., 1985). Em geral, um alto suprimento de O₂ favorece a formação de biomassa e de CO₂ em detrimento da formação de 2,3-BDO. A razão desta alteração de metabolismo é a manutenção do balanço entre NAD⁺/ NADH. Sob condições de aerobiose, NADH da glicólise é regenerado via respiração. Sob condições anaeróbias, a respiração não ocorre, então a formação de 2,3-BDO e outros produtos de fermentação servem o mesmo propósito. Na ausência de O₂, em geral etanol é produzido em proporção equimolar a 2,3-BDO (VOLOCH et al., 1985), embora também formato, acetato, lactato e acetoína sejam formados.

Através do controle da aeração, a síntese de etanol e de formato pode ser evitada, e glicose, por exemplo, pode integralmente ser convertida a 2,3-BDO (MADDOX, 1996). O aumento do fornecimento de O₂ aproximando-se do valor de demanda resulta em um aumento na razão entre acetoína e 2,3-BDO (Voloach et al., 1985). O posterior aumento na disponibilidade de O₂ resulta na produção de ácido acético (SYU, 2001). Se o suprimento de O₂ supera a demanda, os únicos produtos são biomassa e CO₂. Pela mesma razão, Motwani et al. (1993) observaram redução na concentração de 2,3-BDO após períodos de agitação superiores a 20 h. Dessa forma, a fim de maximizar a síntese de 2,3-BDO, um valor limitado, porém não zero, de fornecimento de O₂ é necessário (Voloach et al., 1985). A aeração otimizada também irá minimizar a formação de outros produtos, os quais podem ser inibitórios, bem como prejudicar a recuperação de produto.

2.5. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria anaeróbia facultativa metabolicamente versátil, a qual vem sendo largamente investigada como produtora de 1,3-PDO, principalmente quando cultivada sob condições anaeróbias. No entanto, alguns autores relataram também a produção de 1,3-PDO sob limitação de oxigênio ou condições de baixa concentração de oxigênio (CHENG et al., 2004). Outros produtos biotecnológicos importantes podem ser obtidos a partir de bioconversão de glicerol, entre os quais o etanol, que é destacadamente o mais importante biocombustível, além de ácidos orgânicos (ROSSI et al., 2013).

Rossi et al. (2013) otimizaram a bioconversão de glicerol residual da síntese de biodiesel em 1,3-propanodiol (1,3-PDO) por uma nova linhagem de *Klebsiella pneumoniae*. A influência da concentração de glicerol, pH, temperatura, nitrogênio e minerais foram investigadas usando delineamento estatístico de Plackett-Burman para determinar as variáveis que influenciariam significativamente a produção de 1,3-PDO. Experiências em biorreatores em batelada sob pH controlado produziram até 23,80 g·L⁻¹ de 1,3-PD e 12,30 g·L⁻¹ de etanol, enquanto, em cultivos em batelada alimentada, observou-se um aumento da produção de 1,3-PDO (36,86 g·L⁻¹).

Cultivos em batelada e batelada-alimentada foram também realizados em biorreatores sob condições anaeróbias e de limitação de oxigênio (ROSSI, SOUZA, DE e AYUB, 2013). Resultados de culturas em batelada mostraram que o produto principal foi 1,3-propanodiol (1,3-PDO) em ambas as condições, embora as conversões e produtividades mais elevadas (0,46 mol·mol⁻¹ de glicerol e 1,22 g·L⁻¹·h⁻¹, respectivamente) tenham sido obtidos sob condições anaeróbias. Grandes quantidades de etanol também foram produzidas sob condição anaeróbia em batelada, atingindo um máximo de 12,30 g·L⁻¹. Cultivos em batelada sob limitação de oxigênio foram caracterizados por uma cinética de crescimento mais rápida, com produção de biomassa mais elevada, mas conversões mais baixas do glicerol a 1,3-PDO, com conversões e produtividades de 0,33 mol·mol⁻¹ de glicerol e 0,99 g·L⁻¹·h⁻¹, respectivamente. Os cultivos em batelada alimentada foram realizados a fim de investigar os efeitos da alimentação de glicerol bruto sobre as células. Bateladas alimentadas sob anaerobiose mostraram que as concentrações de 1,3-PDO e etanol aumentaram com a taxa de alimentação, com produções máximas de 26,12 e 19,2 g·L⁻¹, respectivamente. As condições de limitação de oxigênio desviaram o metabolismo

da bactéria para uma formação de ácido láctico elevada, atingindo $59 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ na taxa de alimentação mais elevada de glicerol, mas diminuindo a produção de etanol.

Zhang et al. (2007) isolou uma nova linhagem de *Klebsiella pneumonia* identificada como XJ-Li. Após 8 h de fermentação em batelada, tanto a concentração de 1,3-PDO como o consumo de glicerol atingiram o máximo, com $12,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,3-PDO e $1,53 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de produtividade, com uma conversão molar de glicerol a 1,3-PDO de 0,75. Fermentação em batelada alimentada também indicou uma conversão molar superior de 0,70, e a concentração de 1,3-PDO atingiu $38,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ depois de $66,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de consumo de glicerol.

Da Silva et al. (2014) isolaram uma nova linhagem de *K. pneumonia* (GLC29), que foi investigada utilizando a metodologia de superfície de resposta por planejamento composto central para a produção de 1,3-propanodiol utilizando glicerol. Os efeitos do pH, temperatura, velocidade de agitação, e concentração de glicerol na produção e na produtividade de 1,3-propanodiol foram analisados. As melhores condições para a conversão de glicerol em 1,3-propanodiol foram um intervalo de pH de 6,9-7,1, a uma temperatura entre 33 e 38,5 °C, uma velocidade de agitação de 110-180 rpm, e uma concentração de glicerol de 39-49 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Fermentações em batelada realizadas a um pH de 7,0, uma temperatura de 35 °C, uma velocidade de agitação de 150 rpm, e uma concentração de glicerol de 40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ produziram 20,4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,3-propanodiol com um máximo de produtividade volumétrica de 2,92 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e uma conversão de 0,51 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Os principais produtos secundários foram o ácido acético (cerca de 7,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e formato (cerca de 3,7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

No trabalho de Menzel et al. (1997), em uma fermentação contínua de glicerol por *Klebsiella pneumoniae*, uma concentração final de 1,3-propanodiol de 35,2- 48,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e uma produtividade volumétrica de 4,9-8,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ foram obtidas a taxas de diluição entre 0,1 e 0,25 h^{-1} . Estes resultados correspondem a cerca de 80-96 % do máximo teórico, sob condições ideais (sem formação de etanol e de hidrogênio). A concentração mais elevada de 1,3-propanodiol alcançada neste estudo está perto da concentração máxima de 1,3-propanodiol (50-60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) verificada para culturas em batelada e batelada alimentada. A produtividade da cultura contínua é, no entanto, cerca de 2-3,5 vezes maior. Além disso, os autores sugerem que a melhoria nos resultados obtidas para fermentação de glicerol por *K. pneumoniae* deve ser focada no aumento da tolerância ao produto pela linhagem, bem como na redução da formação de etanol.

A bioconversão de glicerol residual da síntese de biodiesel em 1,3-propanodiol (1,3-PDO) foi realizada utilizando culturas de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 com células imobilizadas em Ca-alginato no estudo de Souza et al. (2014). O tamanho do grânulo e a concentração celular foram parâmetros de imobilização testados para a melhor produtividade possível, os quais verificou-se serem 3,4 mm e $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. Em cultivos em batelada de duração de 12 h, culturas imobilizadas apresentaram uma produtividade 1,3-PDO de $1,85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, em comparação a $1,22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ obtidos em cultivos de 16 h em batelada usando células livres. A possibilidade de reutilização dos biocatalisadores foi testada em cinco ciclos de culturas em batelada, e verificou-se que as células retidas mantiveram a sua estabilidade operacional e atividade biológica, com produtividades de 1,3-PDO tão elevadas como $4,48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Outros metabólitos importantes, tais como 2,3-butanediol e etanol também foram produzidos (10,11 e $3,71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente). Estes resultados mostram a viabilidade da utilização e do desenvolvimento futuro de sistemas de células imobilizadas de *K. pneumoniae* para o bioprocessamento eficiente de glicerol residual.

Vários esforços no campo da engenharia metabólica vêm sendo realizados com o intuito de aumentar as conversões e concentrações de 1,3-propanodiol. Zhu et al. (2009) clonaram o gene *yqhD* que codifica a isoenzima 1,3-propanodiol oxidoreductase (PDORI) a partir de *Escherichia coli* em *K. pneumoniae*. A superexpressão de PDORI levou a uma maior produção de 1,3-PDO, alcançando $67,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Além disso, a concentração do intermediário tóxico 3-hidroxi-propionaldeído foi reduzida em 22,4 % quando comparada com a linhagem inicial. Huang et al. (2012) examinou os efeitos da superexpressão do gene da aldeído desidrogenase na produção simultânea de ácido 3-hidroxi-propionico e 1,3-PDO por *K. pneumoniae*, obtendo-se 24,4 e $49,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Uma produção elevada de 1,3-PDO usando co-substratos foi relatada por Oh et al. (2013) utilizando uma *K. pneumoniae* mutante deficiente na repressão catabólica de carbono. Em condições otimizadas, a concentração de 1,3-PDO obtido a partir de glicerol foi de $81,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ao utilizar melaço como um cosubstrato. Uma produção elevada de 1,3-PDO por *K. pneumoniae* mutante deficiente em d-lactato foi relatada por Xu et al. (2009), obtendo-se $102,06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de 1,3-PDO por fermentação aeróbia em batelada alimentada. A mesma abordagem foi testada por Durgapal et al. (2014), que utilizou uma linhagem mutante de *K. pneumoniae* na formação de lactato. A fermentação em batelada alimentada a partir de glicerol

levou à produção de $58,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,3-PDO com uma conversão de $0,35 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e 2,3-BDO como o subproduto principal ($26,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

2.5.1. Aeração

O oxigênio dissolvido é outro fator determinante que afeta a rota metabólica no cultivo de *K. pneumoniae*. Chen e colaboradores investigaram a fisiologia celular e o fluxo de distribuição metabólica de *K. pneumoniae* em condições anaeróbias, aeróbias e de microaerofilia (CHEN et al., 2009). Em comparação à condição anaeróbia, sob as condições de microaerofilia e de aerobiose, o fluxo de carbono a partir de glicerol a biomassa aumentou em 10,1 % e 389,9 %, respectivamente, enquanto o fluxo de carbono a 1,3-propanodiol diminuiu 10,3 % e 92,9 %. Em adição, o fluxo de carbono direcionado para o ciclo TCA aumentou em 5,9 % e 31,0 %, respectivamente. Assim, os autores sugeriram que as condições de microaerofilia são melhores para a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol por *K. pneumoniae* do que as condições anaeróbias e aeróbicas, com base nos resultados da sua análise teórica. Os resultados experimentais obtidos a partir de várias culturas em batelada demonstraram que o cultivo sob microaerofilia é favorável para o crescimento celular, reduz o tempo de cultura e a formação de etanol, bem como aumenta a produtividade volumétrica de 1,3-PDO (CHEN et al., 2003).

No trabalho de Yen et al. (2014), uma linhagem de *Klebsiella* sp. (Ana-WS5) foi utilizada para examinar a produção simultânea de 1,3-PDO e 2,3-BDO, analisando o efeito do nível de oxigênio dissolvido (OD) na distribuição de ambos os compostos em cultivos em batelada. O efeito na atividade enzimática da glicerol desidratase (GDHt), que catalisa a via metabólica de glicerol para 1,3-PDO também foi examinado. Os resultados deste estudo indicaram que o nível de oxigênio dissolvido (DO) é um fator determinante na distribuição das DOP e BDO. Bateladas com um baixo nível de oxigênio dissolvido atingiram uma razão muito mais elevada de 1,3-PDO/2,3-BDO do que aquelas a nível baixo, com resultados de 9,9 e 0,2, respectivamente. A atividade da enzima glicerol desidratase (GDHt) a nível baixo de oxigênio dissolvido foi cerca de três vezes maior, e esta pode ser a causa da produção superior de 1,3-PDO.

No trabalho de Chen et al. (2009), a fisiologia da célula e a resposta do fluxo metabólico principal de *Klebsiella pneumoniae* sob diferentes condições de aeração foram investigadas e discutidas. As características de fermentação de *Klebsiella pneumoniae* em condições microaeróbias são semelhantes às em condições anaeróbias. A introdução de oxigênio é benéfica para o fornecimento de energia e o crescimento celular, mas o oxigênio em excesso mostra-se desvantajoso para a produção de 1,3-PDO. A análise de fluxo metabólico também indicou aumento no fluxo de carbono para biomassa e para o ciclo TCA, mas diminuição para produção de 1,3-PDO, e a produção de NADH₂ foi melhorada mas a proporção utilizada para a síntese de 1,3-PDO diminuiu com o aumento da concentração de oxigênio. Devido a estas duas razões, a oferta excessiva de oxigênio resultou na diminuição acentuada de conversão a 1,3-PDO. Assim, o controle de aeração é fundamental para o processo aeróbio de produção de 1,3-PDO. Uma estratégia de aeração de duas fases é sugerido, a fim de aumentar a produtividade através do fornecimento de oxigênio suficiente na fase inicial da fermentação para aumentar o crescimento celular e produção NADH₂, e na fase final de fermentação, a condição de microaerofilia seria adequada para aumentar a proporção de NADH₂ utilizado para a produção de 1,3-PDO.

3. Materiais e Métodos

3.1. Glicerol residual e reagentes químicos

Todo o glicerol residual utilizado nesse trabalho foi fornecido por uma unidade fabril de produção de biodiesel localizada no município de Canoas, no Rio Grande do Sul. Sua composição era (em percentual mássico): 82,97 % de glicerol, 10,62 % de umidade, 5,72 % de NaCl, 0,75 % de monoacilgliceróis (MONGs), além de concentrações-traço de cinzas e metanol residual do processo de fabricação. A produção de biodiesel nessa instalação é obtida através da transesterificação de óleo de soja por rota exclusivamente metílica.

Todos os demais reagentes utilizados nesse trabalho apresentavam grau de pureza analítico ou de cromatografia e foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.2. Microrganismo e meio de cultivo

A linhagem utilizada neste trabalho, *K. pneumoniae BLh-1*, foi isolada e caracterizada no trabalho de Rossi et al. de 2012. No trabalho em questão, o consórcio microbiano utilizado como fonte para o isolamento de um microrganismo capaz de metabolizar glicerol a metabólitos de interesse industrial foi obtido da porção inferior de um reator anaeróbico de fluxo ascendente (UASB) de uma fábrica de processamento de soja localizada em Esteio, no Rio Grande do Sul.

Estoques desta bactéria são mantidos no acervo de culturas microbiológicas do laboratório BiotecLab (UFRGS, Porto Alegre - RS) em meio Luria-Bertani (LB) em 50 % de glicerol a -80 °C.

3.3. Preparo de inóculos

Placas com células viáveis foram produzidas a partir do banco de células através do crescimento das amostras estocadas em meio de cultivo previamente otimizado (ROSSI et al., 2013) a 37 °C e 150 rpm em incubadora de agitação orbital até densidade ótica (DO) igual a 1 a 600 nm, procedendo-se então o plaqueamento em meio ágar LB. O meio de cultivo otimizado

para *K. pneumoniae* foi composto por 5 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g·L⁻¹ de peptona, 7 g·L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 7 g·L⁻¹ K₂HPO₄, 1mL de uma solução de elementos traço (contendo 0,1 g·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 0,06 g·L⁻¹ H₃BO₃, 0,0037 g·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 0,2 g·L⁻¹ CoCl₂·6H₂O, 0,025 g·L⁻¹ NiCl₂·6H₂O, 0,035 g·L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O, 0,14 g·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, e 0,9 mL HCl 37 %), e 65 g·L⁻¹ de glicerol bruto da indústria do biodiesel.

Inóculos foram preparados através da transferência de uma alçada de colônias das placas geradas a partir do banco de células (armazenadas a 4 °C e refeitas a cada 4 semanas a fim de assegurar viabilidade celular) para Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultivo citado acima, permitindo crescimento por 12 h. Subcultivos eram então realizados a partir deste, permitindo crescimento até DO igual a 1 a 600 nm.

3.3.1. Acompanhamento do crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado através de leituras de densidade ótica a 600 nm com espectrofotômetro (Amersham Biosciences, modelo Ultrospec 3100 pro) utilizando como controle o meio de cultivo previamente descrito sem a presença de células. As leituras foram realizadas em um comprimento de onda de 600 nm.

3.4. Experimentos em Batelada

Experimentos em batelada foram realizados em fermentadores do tipo tanque-agitado de 2 L de volume útil (modelo Biostat B da B. Braun Biotech International, Alemanha) completamente equipados com controle de pH, temperatura, agitação (duas turbinas contendo seis lâminas chatas), aeração e fluxo. As condições de anaerobiose foram asseguradas através do borbulhamento de gás nitrogênio no meio de cultivo durante 15 minutos anterior à inoculação do fermentador. As condições de operação foram de 37 °C e 300 rpm e o pH foi mantido no valor de 7,0 utilizando-se NaOH 10 M ou H₃PO₄ 1 M como soluções de base e ácido, respectivamente.

O meio de cultivo de fermentação é o mesmo descrito acima para o crescimento de inóculos. Os fermentadores foram inoculados a uma fração volumétrica de 10 % com um cultivo de DO igual a 1 a 600 nm preparado conforme previamente descrito. Todos os experimentos foram

realizados em duplicatas.

3.5. Experimentos em Batelada alimentada

Experimentos em batelada alimentada foram realizados em fermentadores do tipo tanque-agitado de 5 L de volume útil (modelo Biostat B da B. Braun Biotech International, Alemanha) igualmente equipados e munidos do mesmo aparato para controle de processos nas condições de operação descritas para experimentos em batelada.

O meio de cultivo para experimentos em batelada alimentada foi o mesmo previamente descrito, exceto quanto à concentração inicial de glicerol utilizada, a qual determinou-se pelo conjunto de experimentos realizados em batelada ser idealmente de $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para esse modo de operação em particular. A forma de cultivo, bem como a proporção volumétrica utilizadas para os inóculos de experimentos em batelada alimentada foram idênticas às aquelas para experimentos em batelada. Por limitações de volume dos biorreatores disponíveis, foi utilizado volume inicial de meio de cultivo de 2 L nos experimentos utilizando velocidades específicas de crescimento de $0,035 \text{ h}^{-1}$ e $0,07 \text{ h}^{-1}$, e de 1 L naqueles utilizando $0,105 \text{ h}^{-1}$. Nestes últimos, o volume de inóculo foi adaptado mantendo a proporção volumétrica de 10 % e a equação de alimentação de substrato teve o valor de volume inicial adaptado.

A alimentação de glicerol bruto previamente esterilizado era iniciada somente 4 h após a inoculação dos fermentadores, tempo verificado na etapa de experimentos em batelada como suficiente para o consumo completo da concentração inicial da fonte de carbono utilizada. Glicerol bruto foi então adicionado através de uma bomba peristáltica externa (Watson-Marlow 120U/DV) com o auxílio de uma placa de comunicação (Arduino Uno) conectada a um computador independente pelo software (Arduino Software (IDE) 1.6.5), no qual programou-se o algoritmo contendo a equação de alimentação $F(t)$ ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$):

$$F(t) = \frac{\mu_{set} \cdot V_0 \cdot X_0 \cdot e^{\mu_{set} t}}{Y_{x/s} \cdot S_F}$$

onde:

μ_{set} é a velocidade específica de crescimento estipulada (h^{-1});

V_0 é o volume de meio de cultivo no tempo zero de alimentação (L);

X_0 é a concentração de biomassa no tempo zero de alimentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

$Y_{x/s}$ é a conversão de substrato a biomassa ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$);

S_F é a concentração de substrato na solução de alimentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

No momento do início da alimentação, uma análise rápida da concentração de biomassa era realizada a fim de determinar o valor atual deste parâmetro e introduzi-lo corretamente na equação de alimentação no algoritmo. Este método analítico encontra-se posteriormente descrito na seção de Métodos Analíticos.

Experimentos em batelada alimentada eram amostrados a cada hora durante as primeiras 9 h de cultivo e, então, a cada 3 h até o final do processo, em 48 h.

3.6.Métodos Analíticos

A composição do meio de cultivo foi analisada utilizando cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) através de equipamento da marca Shimadzu equipado com detector de índice de refração (RID-10A). A coluna utilizada foi Aminex HPX-87H (300×7,8 mm, Bio-Rad, EUA) e a fase móvel, uma solução H_2SO_4 0,005 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ alimentada a 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi controlada a 65 °C. As amostras de cultivo foram preparadas para cromatografia por centrifugação a 3000 × g por 15 min a fim de precipitar as células em suspensão, procedendo-se com filtração da porção sobrenadante utilizando membranas de acetato de celulose (tamanho de poro de 0,22 μm ; Sartorius, Alemanha). Para todas as análises por HPLC, padrões de 1,3-PD, etanol, ácido láctico e ácido acético com grau de pureza de cromatografia (superior a 99,5 %) foram utilizados.

A concentração de biomassa ao longo do processo fermentativo foi determinada através do método gravimétrico de peso seco, o qual foi sempre realizado em duplicatas. Para a aquisição imediata do valor da concentração de biomassa no início da alimentação de glicerol ($t = 4$ h), no entanto, um método gravimétrico rápido foi utilizado em paralelo a fim de introduzir tal informação corretamente na equação de alimentação no algoritmo utilizado. Essas amostras eram centrifugadas como previamente descrito e, então, a biomassa sedimentada era espalhada em

filtros de papel (Whatman, ref. 1001-090), sendo tal conjunto rapidamente seco pela utilização de um analisador de umidade (Ohaus MB-35), o qual emprega lâmpada halógena como fonte de calor.

3.7. Obtenção de parâmetros cinéticos

A velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi determinada através da regressão linear dos dados obtidos ao plotar-se a variação da concentração da biomassa (em escala logarítmica natural) contra o tempo. Tal valor correspondeu ao coeficiente angular da reta obtida.

A conversão de substrato a biomassa ($Y_{x/s}$) utilizado na equação de alimentação de substrato nos experimentos em batelada alimentada foi obtido através da regressão linear ao plotar-se a variação de concentração de biomassa contra o consumo de glicerol. Tal valor correspondeu ao coeficiente angular da reta obtida.

Os valores de conversão de substrato a produtos ao longo dos experimentos foram obtidos pela divisão da concentração acumulada do produto até o tempo considerado pelo valor calculado do consumo de substrato até este mesmo tempo.

Os valores de produtividades volumétricas foram obtidos ponderando a concentração total de produto formada pelo tempo necessário para obtê-la.

3.8. Análise estatística dos dados experimentais

A análise estatística dos resultados experimentais foi realizada pela aplicação do teste de Tukey com auxílio do software Statistica 10 (StatSoft Inc.). Os dados foram analisados a um nível de significância de 5 %.

4. Resultados

4.1. Experimentos preliminares em batelada

Experimentos preliminares de cultivos em batelada foram realizados a fim de obter-se uma concentração inicial da fonte de carbono (glicerol) que conduzisse a resultados satisfatórios para posterior realização de experimentos em batelada alimentada. As cinéticas de consumo de glicerol e de produção de biomassa e metabólitos para tais experimentos com concentrações iniciais de glicerol de 65 e de 15 g·L⁻¹ são mostradas na Figura 3 e na Figura 4, respectivamente.

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi calculada para todos os cultivos e seu valor é de 0,35 h⁻¹. Quando uma concentração inicial de glicerol de 65 g·L⁻¹ foi utilizada, obteve-se concentrações finais de 1,3-PD, de 2,3-BD e de etanol de 22,7 g·L⁻¹, de 3,7 g·L⁻¹ e de 1 g·L⁻¹, respectivamente. Já nos cultivos em que se utilizou uma concentração inicial de glicerol de 15 g·L⁻¹, obteve-se uma concentração final de 1,3-PD de 8,2 g·L⁻¹ e uma concentração final de etanol de 1,8 g·L⁻¹. Notadamente, não ocorreu formação de 2,3-BD para essa concentração inicial de substrato. Em adição, a formação de ácidos orgânicos foi consideravelmente inferior quando se utilizou a concentração de 15 g·L⁻¹ de glicerol. Os parâmetros cinéticos obtidos para as diferentes concentrações são apresentados na Tabela 1.

A linhagem de *K. pneumoniae* utilizada provou ser uma produtora eficiente de 1,3-PDO sob condições anaeróbias em cultivos sob regime de batelada para ambas as concentrações de substrato iniciais testadas.

Levando-se em consideração as condições gerais desejadas para a operação de cultivos em batelada alimentada, selecionou-se a concentração de glicerol de 15 g·L⁻¹, uma vez que nesta condição observou-se as maiores conversões de glicerol em biomassa e em 1,3-PDO (Tabela 1), aliados a um consumo rápido do substrato inicial e à formação mais baixa dos ácidos orgânicos (ácido acético e ácido láctico), os quais são conhecidos inibidores de bioprocessos. A análise dos dados experimentais para essa condição leva a crer que ao longo de todo o processo, o substrato consumido foi destinado a uma rota metabólica que favoreceu a conversão a 1,3-PDO.

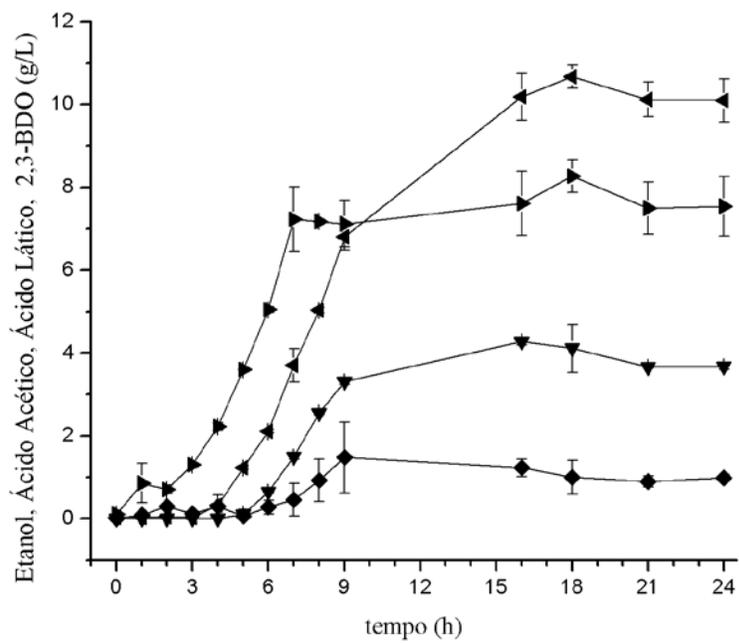
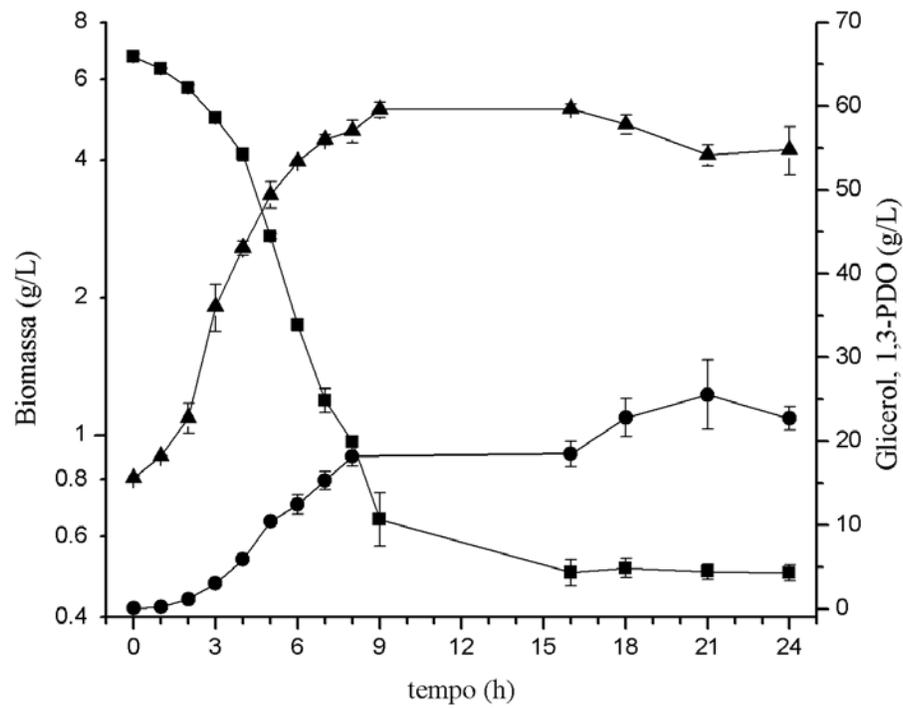


Figura 3: Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada com concentração inicial de substrato de $65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$: (-▲-) biomassa, (-■-) substrato (glicerol), (-●-) 1,3-PDO, (-▶-) ácido láctico, (-▼-) 2,3-BDO, (-◀-) ácido acético, (-◄-) etanol.

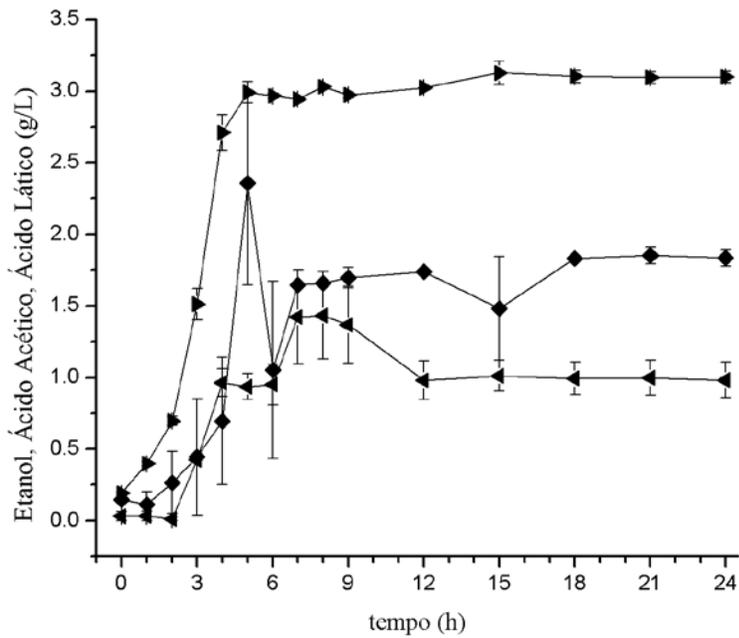
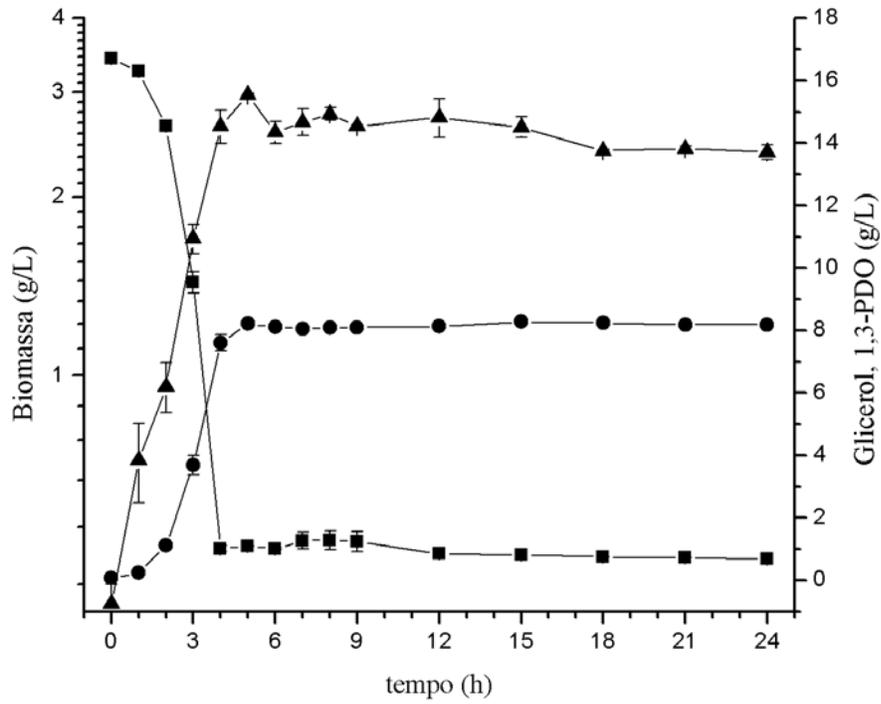


Figura 4: Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada com concentração inicial de substrato de $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$: (-▲-) biomassa, (-■-) substrato (glicerol), (-●-) 1,3-PDO, (-▶-) ácido láctico, (-◀-) ácido acético, (-◆-) etanol.

Tabela 1: Conversões de substrato a biomassa e a 1,3-PDO obtidos experimentalmente.

Concentração (g·L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g·g ⁻¹)	$Y_{1,3-PDO}$ (g·g ⁻¹)
65	0,35	0,073 ^b	0,38 ^b
15	0,35	0,13 ^a	0,51 ^a

O final do consumo de substrato ($t = 4$ h) foi determinado como tempo para o início da alimentação nos cultivos em batelada alimentada. A equação que controla tal alimentação utiliza os parâmetros cinéticos então obtidos ($\mu_{\text{máx}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0,13 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$).

4.2. Experimentos em batelada alimentada

Cultivos em batelada alimentada com a bactéria *K. pneumoniae* utilizando glicerol residual da indústria de biodiesel como fonte única de carbono foram realizados a fim de verificar a influência de tal modo de operação na fisiologia do microrganismo em questão e averiguar seu potencial como produtor de metabólitos de interesse industrial.

Dessa forma, valores de velocidades específicas de crescimento (μ_{set}) correspondentes a 10 %, 20 % e 30 % do valor de velocidade específica máxima de crescimento verificada nos experimentos preliminares ($0,35 \text{ h}^{-1}$) foram utilizadas, gerando três diferentes níveis testados para as curvas de alimentação de substrato. As velocidades específicas efetivamente utilizadas foram, portanto, de $0,035 \text{ h}^{-1}$, $0,07 \text{ h}^{-1}$ e $0,105 \text{ h}^{-1}$. As cinéticas de consumo de glicerol e de produção de biomassa e metabólitos para experimentos utilizando os diferentes níveis de velocidades específicas testados são apresentadas na Figura 5, Figura 6 e Figura 7, respectivamente. Adicionalmente, a variação dos valores calculados de produtividade volumétrica de 1,3-PDO ao longo do tempo são apresentados na Figura 8.

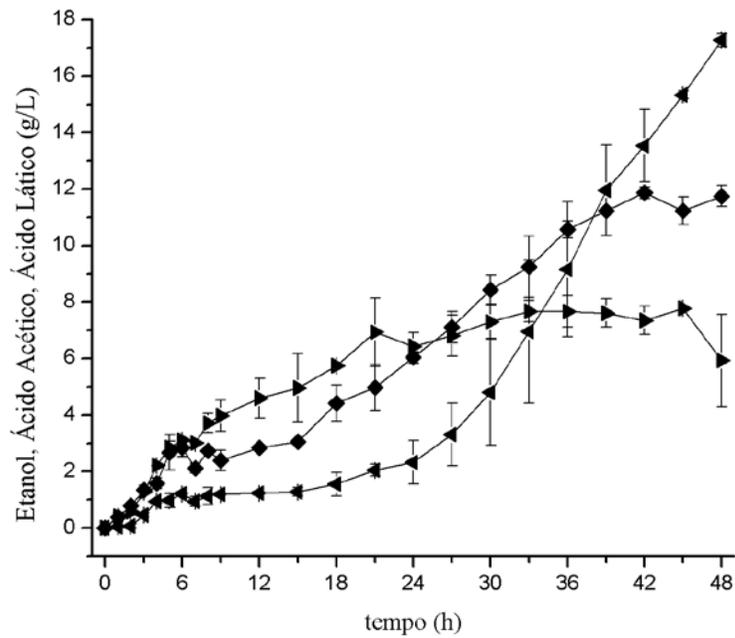
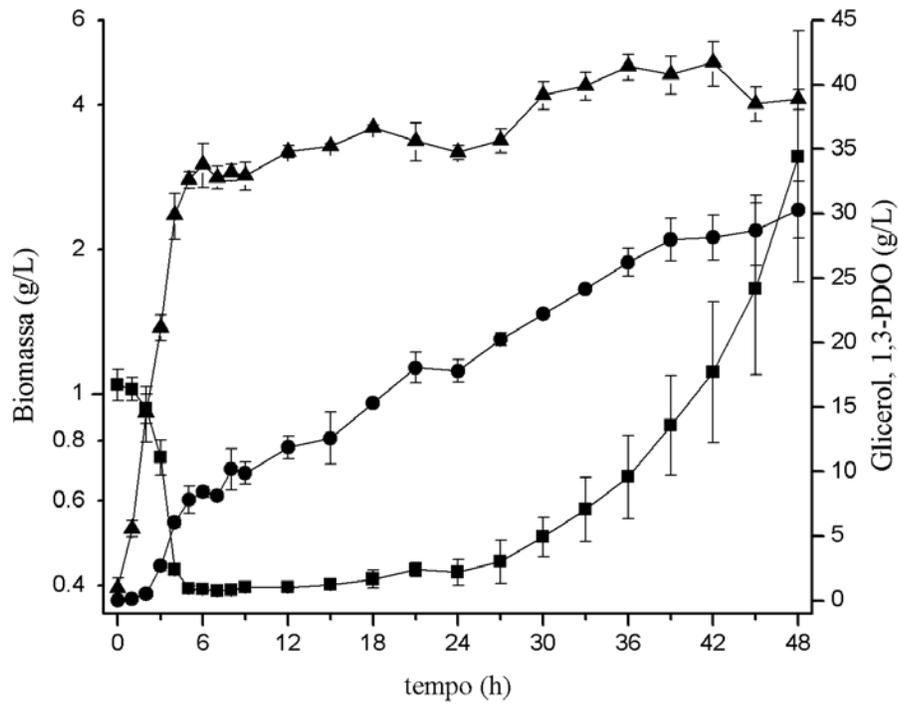


Figura 5: Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada-alimentada utilizando velocidade específica de crescimento de $0,035 \text{ h}^{-1}$: (-▲-) biomassa, (-■-) substrato (glicerol), (-●-) 1,3-PDO, (-▶-) ácido láctico, (-◄-) ácido acético, (-◆-) etanol.

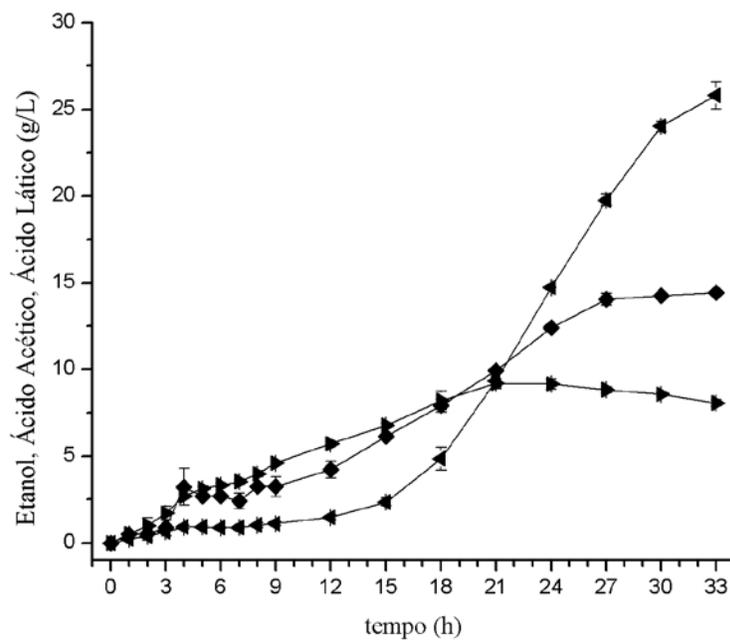
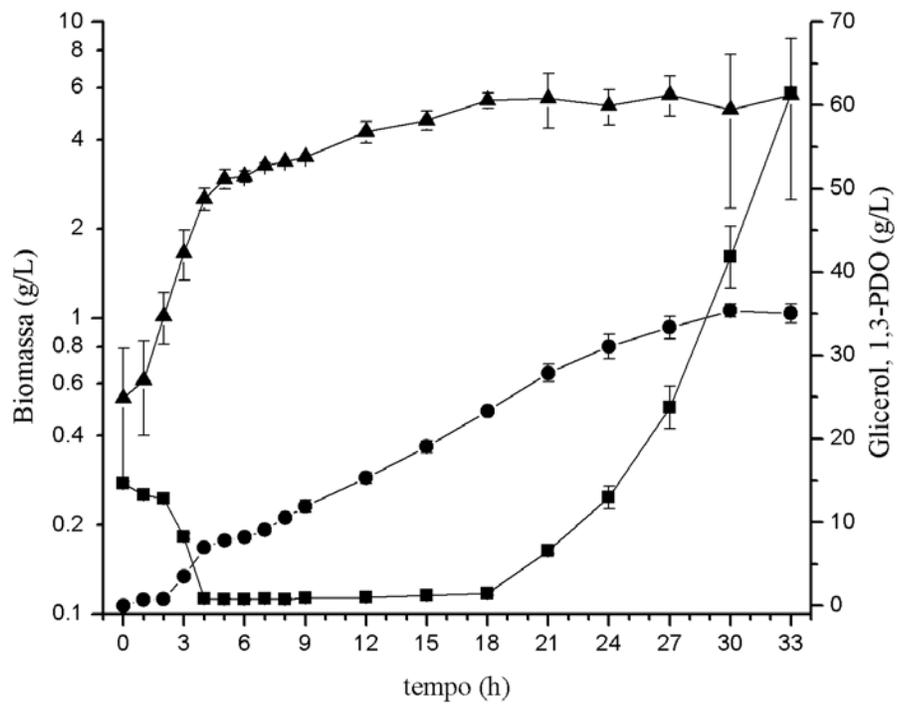


Figura 6: Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada-alimentada utilizando velocidade específica de crescimento de $0,07 \text{ h}^{-1}$: (-▲-) biomassa, (-■-) substrato (glicerol), (-●-) 1,3-PDO, (-▶-) ácido láctico, (-◀-) ácido acético, (-◆-) etanol.

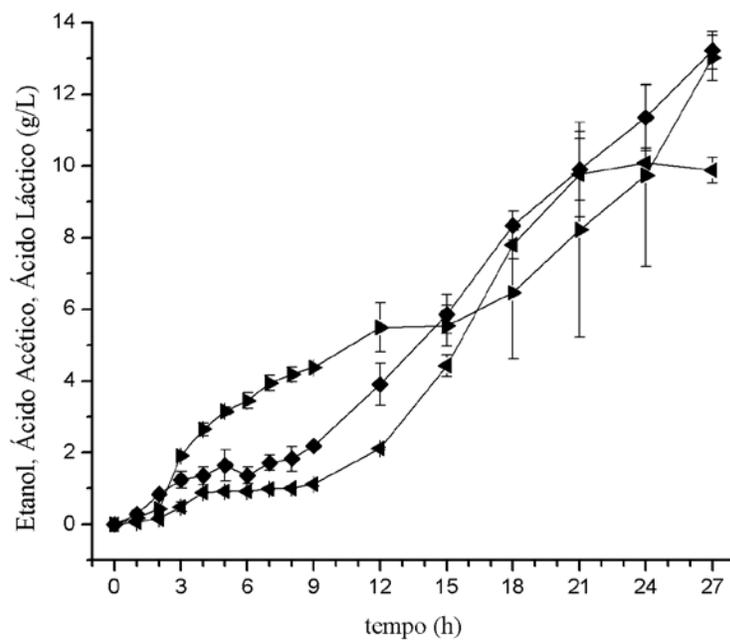
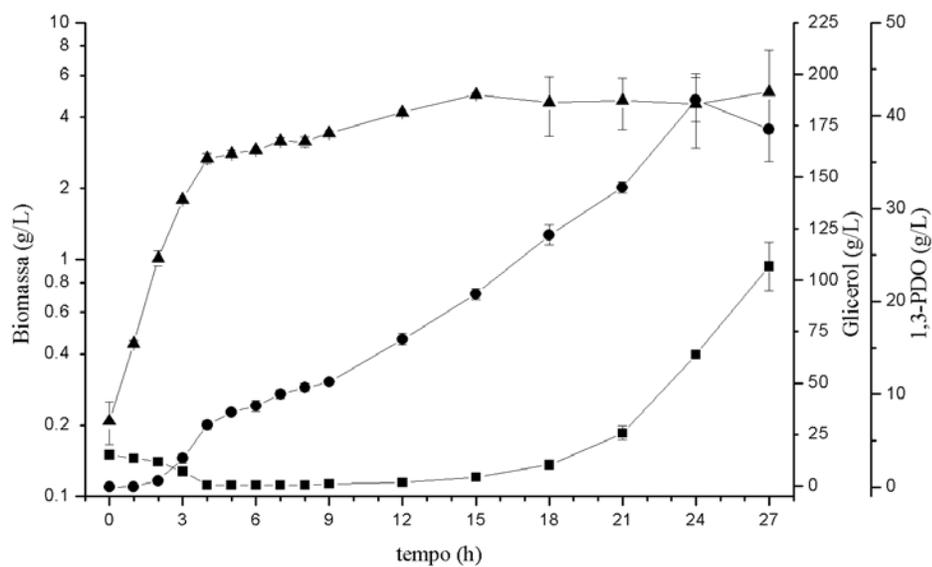


Figura 7: Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada-alimentada utilizando velocidade específica de crescimento de $0,105 \text{ h}^{-1}$: (-▲-) biomassa, (-■-) substrato (glicerol), (-●-) 1,3-PDO, (-▶-) ácido láctico, (-◀-) ácido acético, (-◆-) etanol.

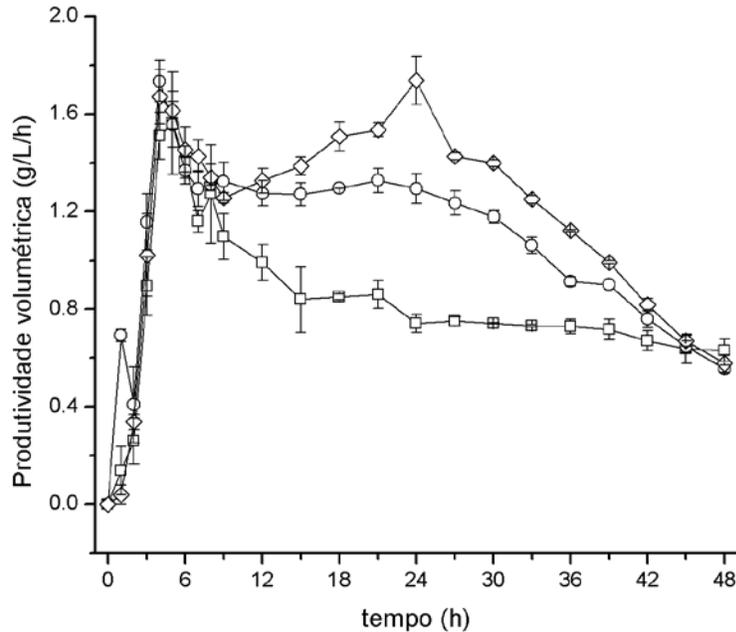


Figura 8: Variação da produtividade volumétrica calculada para os diferentes níveis de velocidade específica de crescimento testados: (-□-) $0,035 \text{ h}^{-1}$, (-○-) $0,07 \text{ h}^{-1}$, (-◇-) $0,105 \text{ h}^{-1}$.

Embora todos os cultivos neste conjunto de experimentos tenham sido conduzidos pelo tempo total de 48 h, os resultados neste trabalho apresentados contemplam somente o período durante o qual a operação no regime de batelada alimentada foi considerada apropriada. Assim, a apresentação dos resultados experimentais para os experimentos em que foram testadas velocidades específicas de crescimento de $0,07 \text{ h}^{-1}$ e $0,105 \text{ h}^{-1}$ somente até o tempo de cultivo de 33 h e 27 h, respectivamente, se deve ao fato de que a continuidade da alimentação de substrato de forma automatizada representou uma sobrealimentação. Em ambos os casos, a adição adicional de glicerol bruto levou à interrupção do consumo do substrato adicionado, observando-se crescente acúmulo deste, com conseqüente diminuição das concentrações dos demais componentes do meio de cultivo por efeito de diluição. O fenômeno em questão não foi observado ao utilizar-se uma velocidade específica de crescimento de $0,035 \text{ h}^{-1}$.

O resumo dos principais resultados obtidos através dos experimentos em batelada alimentada é exibido na Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações, conversões e produtividades para os metabólitos produzidos sob modo de operação de batelada-alimentada.*

$^{\alpha}\mu_{\text{set}}$ (h ⁻¹)	$^{\beta}C_{1,3\text{-PDO}}$ (g·L ⁻¹)	C_{Etanol} (g·L ⁻¹)	C_{Acet} (g·L ⁻¹)	C_{Lac} (g·L ⁻¹)	$^{\gamma}Y_{1,3\text{-PDO}}$ (g·g ⁻¹)	Y_{Etanol} (g·g ⁻¹)	$^{\delta}Q_{1,3\text{-PDO}}$ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Q_{Etanol} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
0,035	30,3±2,2 ^a	11,7±0,4 ^b	17,3±0,2 ^b	5,9±1,6 ^b	0,58±0,02 ^a	0,26±0,05 ^a	0,63±0,04 ^c	0,24±0,01 ^b
0,070	35,0±1,1 ^a	14,4±0,1 ^a	25,8±0,8 ^a	8,1±0,2 ^{ab}	0,54±0,02 ^a	0,22±0,00 ^a	1,06±0,03 ^b	0,44±0,00 ^a
0,105	38,5±0,4 ^a	13,2±0,5 ^{ab}	9,9±0,4 ^c	13,0±0,6 ^a	0,56±0,10 ^a	0,18±0,05 ^a	1,43±0,01 ^a	0,49±0,02 ^a

^α μ_{set} – velocidade específica controlada.

^β $C_{1,3\text{-PDO}}$ – 1,3-propanodiol, C_{Etanol} – etanol, C_{Acet} – ácido acético, C_{Lac} – ácido lático.

^γ Y – conversões.

^δ Q – produtividades.

* Tempos de avaliação dos parâmetros: 0,035 h⁻¹ - 48 h, 0,07 h⁻¹ - 33 h, 0,105 h⁻¹ - 27 h.

Foi verificada a produção consistente de 1,3-PDO e de etanol para todos os níveis testados de velocidades específicas de crescimento, ocorrendo aumento nas conversões em 1,3-PDO observadas em todos os testes em batelada-alimentada em relação aos experimentos em batelada. Não foi observada a formação de 2,3-BDO em nenhum dos cultivos.

Os experimentos utilizando velocidade específica de crescimento de 0,035 h⁻¹ mostraram-se bastante satisfatórios sob o ponto de vista operacional diante da proposta deste trabalho, isto é, foi possível conduzir o cultivo em batelada-alimentada mantendo concentrações residuais de glicerol baixas por um longo período – toda a carga inicial de 15 g·L⁻¹ foi consumida durante as primeiras 4 h de cultivo, conforme previsto pelos experimentos em batelada, e tal concentração tornou-se superior a 10 g·L⁻¹ somente após 36 h de cultivo.

A formação de 1,3-PDO ocorreu ao longo de todo o experimento, atingindo concentração máxima de 30,3 g·L⁻¹ ao final de 48 h. O comportamento observado para a formação deste metabólito sugere que a continuidade do acompanhamento do processo poderia revelar a

continuidade da formação de 1,3-PDO, embora a redução nos valores de produtividade no período final do processo sugiram a iminente estagnação na produção deste. Comportamento semelhante foi observado para a formação de etanol, cuja produção aproximadamente cessou após 42 h de processo, atingindo concentração final máxima de $11,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ocorreu acúmulo de glicerol ao longo das 12 h finais de processo e um aumento drástico na produção de ácido acético nas 24 h finais. Concentrações finais de ácido acético e de ácido láctico foram de $17,27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de $7,78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Foram observados valores crescentes de conversões para 1,3-propanodiol e etanol ao longo do tempo, alcançando valores finais de $0,58 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $0,26 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Isso sugere que a condução do processo em batelada alimentada gerou condições para que a rota metabólica do microrganismo fosse deslocada para a produção destes dois metabólitos. Os valores de produtividade para estes produtos variaram ao longo do tempo conforme apresentado na Figura 8, apresentando valores máximos de $1,56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para 1,3-PDO e de $0,54 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para etanol, ambos observados no tempo de 5 h de cultivo. Valores finais de produtividades volumétricas para o processo foram de $0,63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para 1,3-PDO e de $0,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para etanol.

Os experimentos utilizando velocidade específica de crescimento de $0,07 \text{ h}^{-1}$ mostraram-se operacionalmente satisfatórios pelo período de 33 h de cultivo, tempo tomado para a avaliação de parâmetros apresentados na Tabela 2. Foi possível manter concentrações residuais de glicerol inferiores a $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 21 h, observando-se acentuado acúmulo após este período. A condução dos experimentos após 33 h de cultivo evidenciou a parada no metabolismo de glicerol e o efeito de diluição pelo substrato adicionado não-metabolizado, levando a concentrações de metabólitos decrescentes. Desta forma, a discussão apresentada contempla somente o período de 33 h de cultivo durante o qual tal fenômeno não foi observado.

Novamente, a formação de 1,3-PDO ocorreu ao longo de todo o experimento, atingindo concentração de $35,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ao final de 33 h. Foi observada estagnação na produção deste metabólito entre 30 h e 33 h de processo. Comportamento semelhante foi observado para a produção de etanol, cuja produtividade decaiu drasticamente após 27 h de processo, atingindo concentração final máxima de $14,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ocorreu acúmulo de glicerol após 18 h de processo e

aumento na produção de ácido acético após o mesmo tempo. Concentrações finais de ácido acético e de ácido láctico foram de $25,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de $8,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

De forma semelhante à previamente descrita, foram observados valores crescentes de conversões para 1,3-propanodiol e etanol ao longo do tempo, alcançando valores finais de $0,54 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $0,22 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Os valores de produtividade para estes produtos variaram ao longo do tempo, apresentando valores máximos de $1,74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para 1,3-PDO e de $0,54 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para etanol, observados nos tempos de 4 h e 5 h de cultivo, respectivamente. Valores finais de produtividades volumétricas para o processo foram de $1,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para 1,3-PDO e de $0,44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para etanol.

Por fim, os experimentos utilizando velocidade específica de crescimento de $0,105 \text{ h}^{-1}$ mostraram-se operacionalmente satisfatórios pelo período de 27 h de cultivo. As concentrações residuais de glicerol foram mantidas abaixo de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 18 h, novamente observando-se acentuado acúmulo após este período. Foi observada parada no metabolismo de glicerol, bem como marcado efeito de diluição pelo substrato adicionado não-metabolizado após o período de 27 h, levando a concentrações de metabólitos decrescentes. Desta forma, para este nível de velocidade de crescimento testado, a discussão apresentada contempla somente o período de 27 h de cultivo.

Observou-se formação de 1,3-PDO ao longo de todo o experimento, atingindo concentração máxima de $38,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Foi observada estagnação na produção deste metabólito após 24 h de processo. Comportamento semelhante foi observado para a produção de etanol, o qual atingiu concentração máxima de $13,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ após 27 h de cultivo. Ocorreu acúmulo de glicerol após 18 h de processo e as concentrações mais altas de ácido acético e de ácido láctico alcançadas foram de $10,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de $13,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, em tempos de processo de 24 h e 27 h, respectivamente

Assim como nos demais níveis testados, foram observados valores crescentes de conversões para 1,3-propanodiol e etanol ao longo do tempo, alcançando valores finais de $0,56 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $0,18 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Os valores de produtividade para estes produtos variaram ao longo do tempo, apresentando valores máximos de $1,74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para 1,3-PDO e de $0,49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para etanol, observados nos tempos de 24 h e 27 h de cultivo, respectivamente,

conforme apresentado na Figura 8. Em adição, a produtividade volumétrica de 1,3-PDO ao final do processo foi $1,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

A aplicação do teste de Tukey permitiu comparar os resultados obtidos para os diferentes níveis de velocidade específica de crescimento testados. Destaca-se que a alteração deste parâmetro gerando diferentes perfis de alimentação não resultou em diferença estatisticamente significativa na concentração final de 1,3-PDO obtida, assim como nos valores observados para conversões em 1,3-PDO e em etanol ($Y_{1,3\text{-PDO}}$ e Y_{Etanol} , respectivamente). As concentrações finais de etanol e de ácido lático obtidas, no entanto, foram influenciadas pela velocidade específica de crescimento utilizada, sendo que $0,070 \text{ h}^{-1}$ e $0,105 \text{ h}^{-1}$ conduziram a valores superiores e que não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. A concentração final de ácido acético apresentou resultados estatisticamente diferentes em todos os níveis testados, sendo $0,07 \text{ h}^{-1}$ o valor de velocidade específica de crescimento para o qual foi observada maior concentração final deste metabólito, e $0,105 \text{ h}^{-1}$ o que gerou o menor valor. Importaneamente, a produtividade volumétrica de 1,3-PDO ($Q_{1,3\text{-PDO}}$) também mostrou-se estatisticamente diferente em todos os níveis, sendo que foi observado um comportamento claro: valores mais altos de velocidades específicas de crescimento conduziram a valores mais altos de produtividade volumétrica. Por sua vez, a produtividade volumétrica de etanol (Q_{Etanol}) apresentou valores mais altos e estatisticamente iguais ao utilizar-se velocidade específica de crescimento de $0,07 \text{ h}^{-1}$ e $0,105 \text{ h}^{-1}$.

5. Discussão

A análise global dos resultados experimentais obtidos aponta a utilização de uma velocidade específica de crescimento de $0,105 \text{ h}^{-1}$ como aquela que, entre os níveis testados, conduziu a resultados superiores quando utilizado um modo de operação de batelada alimentada com perfil de alimentação exponencial. Durante todo o período em que ocorreu alimentação automática, valores de conversões em 1,3-PDO não inferiores a $0,41 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ foram observados. Tais valores altos de conversão sugerem o direcionamento da rota metabólica de *K. pneumoniae* à produção deste metabólito. Os valores mais altos de produtividade de 1,3-PDO e de etanol observados foram obtidos no período de 4 h a 24 h de cultivo, o qual corresponde à fase inicial de alimentação de substrato, quando a vazão mássica de alimentação (glicerol bruto, 82,97 % de pureza) apresentou valores mais baixos. Durante esse período, a concentração residual de glicerol no meio de cultivo foi mantida entre $6,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $41,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. De forma análoga, nos cultivos utilizando velocidades específicas de crescimento de $0,035$ e $0,070 \text{ h}^{-1}$, os valores mais altos de produtividade observados correspondem ao período em que a concentração de glicerol residual no meio de cultivo manteve-se relativamente baixa.

Os resultados referentes a conversões e produtividades de 1,3-PDO obtidos neste trabalho foram considerados compatíveis com aqueles apresentados na literatura, embora, ao utilizar-se uma velocidade específica de crescimento de $0,105 \text{ h}^{-1}$ (considerada aquela que conduziu a melhores resultados), a concentração final deste metabólito obtida mostrou-se consideravelmente inferior àquela obtida em diversos trabalhos. Uma vez que as condições de operação utilizadas indicaram especificidade no desvio da rota metabólica do microrganismo para a produção de 1,3-PDO, a estratégia de batelada alimentada aplicada foi considerada eficiente.

Ao comparar os resultados obtidos neste trabalho com aqueles obtidos por Rossi et al. (2013) ao utilizar a mesma linhagem, *K. pneumoniae BLh-1*, com condições de cultivo anaeróbias sob regime de batelada e batelada alimentada com alimentação constante, foi obtida melhora na produção de 1,3-PDO. No trabalho em questão, cultivos em batelada conduziram a uma concentração final de $23,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,3-PDO, sendo observados valores de conversão e de produtividade volumétrica de 1,3-PDO de $0,55 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e de $1,22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. Ao empregar vazões constantes de alimentação, os autores reportaram como melhores resultados a

obtenção de concentração de $26,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,3-PDO (vazão de alimentação de $10,0 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$, tempo de cultivo de 32 h), conversão de $0,59 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($5 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ em 9 h), e produtividade volumétrica de $2,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ($2,5 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ em 9 h). É importante notar que os resultados obtidos no trabalho mencionado indicaram uma queda acentuada nos valores de conversão e de produtividade volumétrica com o avanço do tempo de fermentação, sugerindo que a aplicação de vazões constantes de alimentação não seja adequada ao processo estudado. Ao comparar estes resultados com os valores de conversão de 1,3-PDO obtidos neste trabalho, conclui-se que o emprego de um perfil de alimentação exponencial não gerou uma maior especificidade na rota metabólica do microrganismo em relação ao que se observa ao utilizar batelada ou batelada alimentada constantemente como modos de operação. A possibilidade de prolongar o tempo de fermentação, no entanto, mostrou-se vantajosa.

Notavelmente, trabalhos cujas concentrações finais de 1,3-PDO atingiram patamares mais altos utilizaram tempos de processo maiores, sendo capazes de evitar o acúmulo de glicerol no meio de cultivo ao longo do tempo de processo. Tal observação sugere que a utilização de um perfil exponencial de alimentação, o qual resultou em acúmulo de substrato, também não se mostre como uma alternativa promissora frente à utilização de técnicas capazes de medir ou inferir a concentração de substrato no meio de cultivo ao longo do tempo e, através da dosagem de substrato, mantê-la dentro de uma faixa desejável. Sugere-se que a especificidade do desvio da rota metabólica mencionada anteriormente esteja fortemente ligada à oferta de substrato mantida dentro de uma faixa de concentração específica ao longo do processo, o que é corroborado por resultados disponíveis na literatura.

No trabalho de Menzel et al. (1997), foram realizados cultivos contínuos de *K. pneumoniae* DSM 2026 a diferentes taxas de diluição, conduzindo a estados estacionários caracterizados por limitação, bem como por excesso de glicerol e o metabolismo anaeróbio de glicerol foi analisado. O estudo mostrou que sob condições de limitação de glicerol, a produção de 2,3-butanodiol e de acetoína são insignificantes se comparadas a condições de excesso de glicerol. A produção de 1,3-propanodiol, acetato, succinato e formato mostraram-se sempre favorecidas pela presença de excesso considerável de substrato no meio de cultivo. Em contraste, a produção de etanol foi maior sob limitação de glicerol. Segundo os autores, tais observações podem ser explicadas pela tendência do microrganismo de livrar-se do excesso de glicerol, bem

como de reduzir o efeito de produtos mais tóxicos que possam acumular além dos limites toleráveis por este, situação que pode ocorrer a altas taxas de diluição e consequentes concentração excessivas de glicerol (ZENG et al., 1993).

A inibição causada pela presença do substrato e dos produtos de fermentação no crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae* na produção de 1,3-propanodiol foi estudada no trabalho de Cheng et al. (2005). O crescimento celular sob condições de anaerobiose revelou tolerância a uma concentração máxima de $110 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicerol. Acetato foi o principal metabólito inibitório durante a fermentação, seguido de lactato e etanol. As concentrações críticas para estes produtos foram de 15, 19 e $26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, e para a concentração de 1,3-PDO o valor verificado foi de $69 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, que apresentou um efeito inibitório baixo. A presença de $7,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de acetato causou uma redução de 50 % no crescimento celular, enquanto não foi verificado crescimento quando a concentração deste produto excedeu $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em um pH de 6,8. Desta forma, sugere-se que a formação de ácido acético e ácido láctico observada nos experimentos do presente trabalho tenham prejudicado de forma geral o crescimento celular e a formação dos produtos de interesse.

5.1.Resposta metabólica à falta de nutrientes

Em adição à possibilidade de ocorrência de inibição devido à formação de produtos tóxicos como ácido acético e ácido láctico, levanta-se uma hipótese adicional para justificar a parada no crescimento celular na fase de batelada alimentada. Trata-se da possibilidade de depleção dos demais constituintes nutricionais do meio de cultivo ao longo do processo fermentativo alcançando concentrações inibitórias ao crescimento e/ou formação dos metabólitos de interesse (considerados nesta discussão 1,3-PDO e etanol), uma vez que a solução de alimentação foi constituída unicamente de glicerol residual da indústria do biodiesel, cujo único pré-tratamento foi o processo de esterilização.

É notável a escassez de informação na literatura referente ao efeito metabólico causado pela limitação das fontes de nitrogênio e fósforo, bem como pela variedade de nutrientes inorgânicos e elementos traços conhecidamente necessários ao metabolismo de glicerol em

Klebsiella pneumoniae. No entanto, o conhecimento do efeito de tais restrições em uma variedade de outros microrganismos sugere que o possível desequilíbrio nutricional causado pela não reposição dos componentes constituintes do meio de cultivo ao longo do processo fermentativo pode trazer efeitos nocivos à manutenção de diversas funções celulares (HARDER e DIJKHUIZEN, 1983).

6. Conclusão

Após a realização deste trabalho, pode-se afirmar que a linhagem de bactéria utilizada, *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 é capaz de produzir 1,3-propanodiol de maneira eficiente utilizando glicerol residual da indústria do biodiesel como fonte de carbono única sob regime de anaerobiose. Em adição, a linhagem utilizada mostrou-se uma promissora produtora de etanol a partir deste substrato, sendo necessárias adequações do processo fermentativo para atingir-se

uma produção compatível com outras linhagens de bactérias e leveduras já utilizadas na literatura.

O modo de operação de batelada alimentada conduzido através de um perfil de alimentação exponencial mostrou-se adequado para a produção de 1,3-PDO, bem como de etanol, empregando a linhagem de bactéria utilizada. Os resultados obtidos experimentalmente neste trabalho para tal modo de operação mostraram-se superiores àqueles obtidos ao conduzir-se o processo em batelada. Observou-se resultados crescentemente melhores ao empregar-se velocidades específicas de crescimento maiores, sendo o valor de $0,105 \text{ h}^{-1}$ aquele que, entre os níveis testados, conduziu a melhores resultados na produção de 1,3-PDO, de $38,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentração final após 27 h de cultivo, $0,56 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ de conversão (77,7 % de rendimento em relação à conversão teórica de $0,72 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) e $1,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de produtividade volumétrica. Os valores de conversão e de produtividade observados foram considerados compatíveis com aqueles apresentados na literatura específica e foram considerados indicativos de que existe evidência de que a manutenção da concentração da fonte de carbono em uma faixa de concentração baixa (neste caso, variando entre $6,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $41,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) estimule a produção de 1,3-PDO. A concentração final de 1,3-PDO obtida, no entanto, mostrou-se inferior a diversos trabalhos que visaram a produção de 1,3-PDO de glicerol residual utilizando *Klebsiella pneumoniae*.

A formação de ácido acético e ácido láctico até concentrações finais de $13,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de $9,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, sugere a possibilidade de ocorrência de inibição devido ao acúmulo destes metabólitos no meio de cultivo. Em adição, a formação acentuada de etanol conduziu a valores de conversões de 1,3-PDO inferiores, uma vez que a formação deste metabólito desviou a utilização da fonte de carbono. Sugere-se, portanto, o emprego de esforços na área de engenharia genética a fim de produzir linhagens capazes de minimizar a produção de ácidos orgânicos e etanol em trabalhos futuros, visando o direcionamento da rota metabólica do microrganismo à produção de 1,3-PDO.

A observação do acúmulo de glicerol no meio de cultivo ao final do processo fermentativo indicou a incapacidade do microrganismo, sob as condições de cultivo impostas, de metabolizar todo o substrato adicionado através do perfil de alimentação imposto pela função exponencial utilizada. Dessa forma, sugere-se a implementação de um modo de operação de

batelada alimentada utilizando a leitura *online* da concentração de substrato no meio de cultivo, retroalimentando a função de alimentação e, assim, adequando a vazão de alimentação de substrato a fim de manter a concentração residual de glicerol a níveis desejáveis para a maior produção de 1,3-PDO.

Finalmente, a fim de verificar a hipótese de que a parada no crescimento celular ao final do processo fermentativo possa estar relacionada à depleção dos demais componentes do meio de cultivo, os quais não foram repostos por adição ao longo do processo fermentativo, sugere-se a troca da adição de unicamente glicerol bruto como solução de alimentação, pela utilização de um meio adicionalmente composto por concentrações adequadas dos demais componentes originalmente presentes no meio de fermentação. Uma estratégia alternativa consiste em manter a alimentação na fase de batelada alimentada como glicerol bruto, realizando adições pontuais de meio de cultivo com os demais elementos em tempos do processo a serem avaliados.

Para futuros trabalhos visando a produção de 1,3-PDO, sugere-se a realização de ensaios enzimáticos a fim de elucidar a variação de metabolismo apresentada pelo microrganismo ao longo do processo fermentativo, podendo tal esforço conduzir a adequações de processo, bem como sugestões de melhorias genéticas, potencialmente benéficas à produção de 1,3-PDO. Com o mesmo intuito de melhoria no processo fermentativo, a modelagem matemática dos dados experimentais obtidos neste trabalho para obtenção de modelos representativos da cinética de consumo de substrato e produção de metabólitos consiste em uma sugestão de continuidade de estudo.

7. Referências

AQUINO DE SOUZA, E.;; ROSSI, D. M. e ZÁCHIA AYUB, M. A. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1. **Renewable Energy**, v. 72, p. 253–257, doi:10.1016/j.renene.2014.07.030, 2014.

ARNTZ, D. et al. Kinetische Untersuchung zur Hydratisierung von Acrolein. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 63, n. 7, p. 733–735, doi:10.1002/cite.330630714, 1991.

AYOUB, M. e ABDULLAH, A. Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2671–2686, doi:10.1016/j.rser.2012.01.054, 2012.

AYOUB, M. e ABDULLAH, A. Z. LiOH-modified montmorillonite K-10 as catalyst for selective glycerol etherification to diglycerol. **Catalysis Communications**, v. 34, p. 22–25, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.catcom.2013.01.007, 2013.

BABA, Y. et al. Anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel manufacturing using a large-scale pilot plant: Methane production and application of digested sludge as fertilizer. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 342–348, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.020, 2013.

BARBIRATO, F. et al. 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**, v. 7, n. 2–3, p. 281–289, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00059-9, 1998.

BARRETT, E. L. et al. Production of 2,3-Butylene Glycol from Whey by *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2507–2514, doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)82119-5, 1983.

BARTOWSKY, E. J. e HENSCHKE, P. A. The “buttery” attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 235–252, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.013, 2004.

BIEBL, H. et al. Glycerol conversion to 1, 3-propanediol by newly isolated clostridia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 592–597, 1992.

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, 1998.

BLOMQVIST, K. et al. Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 5, p. 1392–1404, 1993.

BRYN, K.; ULSTRUP, J. C. e STØRMER, F. C. Effect of Acetate upon the Formation of Acetoin in *Klebsiella* and *Enterobacter* and its Possible Practical Application in a Rapid Voges-Proskauer Test. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 511–512, 1973.

CELÍŃSKA, E. e GRAJEK, W. Biotechnological production of 2, 3-butanediol—current state and prospects. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 715–725, 2009.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; et al. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 101–112, doi:10.1007/s00253-011-3247-x, 2011.

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

CHEN, X. et al. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, n. 4, p. 386–394, 2003.

CHEN, Z. et al. Cell physiology and metabolic flux response of *Klebsiella pneumoniae* to aerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. 862–868, doi:10.1016/j.procbio.2009.04.004, 2009.

CHENG, K.;; LIU, H. e LIU, D. Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation. p. 19–22, 2005.

CHENG, K.-K. et al. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 11, p. 911–915, 2004.

CLOMBURG, J. M. e GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. v. 31, n. 1, p. 20–28, 2013.

CORMA, A. et al. Biomass to chemicals: Catalytic conversion of glycerol/water mixtures into acrolein, reaction network. **Journal of Catalysis**, v. 257, n. 1, p. 163–171, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcat.2008.04.016, 2008.

DURGAPAL, M. et al. Production of 1,3-propanediol from glycerol using the newly isolated *Klebsiella pneumoniae* J2B. **Bioresource technology**, v. 159, p. 223–31, doi:10.1016/j.biortech.2014.01.126, 2014.

FORSCHNER, T. C. e GWYN, D. E. **Utilization of 1,3-Propanediol in Thermoplastic Polyurethane Elastomers TPUs**. [S.l: s.n.], 1999.

GARG, S. K. e JAIN, A. Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 2, p. 103–109, 1995.

GONZALEZ, R. et al. A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. **Metabolic engineering**, v. 10, n. 5, p. 234–245, 2008.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.;; ANDRADE, J. C. e VASCONCELOS, I. Production of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 391–396, doi:10.1007/s10295-005-0012-0, 2005.

GÜNZEL, B.;; YONSEL, S. e DECKWER, W.-D. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m³. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 289–294, doi:10.1007/BF00208143, 1991.

GUPTA, A. et al. Anaerobic fermentation of glycerol in *Paenibacillus macerans*: metabolic pathways and environmental determinants. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 18, p. 5871–5883, 2009.

HARDER, W. e DIJKHUIZEN, L. Physiological responses to nutrient limitation. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 1–23, 1983.

HESPELL, R. B. Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. **Current microbiology**, v. 32, n. 5, p. 291–296, 1996.

HIGGINS, J. On the road to fueling the future. **Bioenergy '02 Proceedings Paper 2062**. [S.l.]: Pacific Regional Biomass Energy Program, Boise, ID, 2002. .

HIMMI, E. H.;; BORIES, A. e BARBIRATO, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology**, v. 67, n. 2, p. 123–128, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00109-6, 1999.

HIRSCHMANN, S. et al. Development of an integrated bioconversion process for the production of 1, 3-propanediol from raw glycerol waters. **Landbauforschung Völkenrode**, v. 55, n. 4, p. 261–267, 2005.

HOMANN, T. et al. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 121–126, 1990.

HUANG, Y. et al. Simultaneous production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol by a recombinant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 351–9, doi:10.1016/j.biortech.2011.10.022, 2012.

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.

JARVIS, G. N.;; MOORE, E. R. B. e THIELE, J. H. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 166–174, doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00217.x, 1997.

JI, X.-J. et al. Efficient 1,3-propanediol Production by Fed-Batch Culture of *Klebsiella Pneumoniae*: The Role of pH Fluctuation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 3, p. 605–613, doi:10.1007/s12010-008-8492-9, 2009.

JIN, P. et al. Improved 1,3-propanediol production with hemicellulosic hydrolysates (corn straw) as cosubstrate: Impact of degradation products on *Klebsiella pneumoniae* growth and 1,3-propanediol fermentation. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1815–21, doi:10.1016/j.biortech.2010.09.048, 2011.

JONKER, J. G. G. et al. Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030 , for different biomass crops and industrial technologies. **Applied Energy**, v. 147, p. 593–610, doi:10.1016/j.apenergy.2015.01.090, 2015.

KAUR, G.;; SRIVASTAVA, a. K. e CHAND, S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 106–118, doi:10.1016/j.bej.2012.03.002, 2012.

KHANNA, S.;; GOYAL, A. e MOHOLKAR, V. S. Microbial conversion of glycerol: present status and future prospects. **Critical reviews in biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 235–262, 2012.

KOSARIC, N.;; MAGEE, R. J. e BLASZCZYK, R. Redox potential measurement for monitoring glucose and xylose conversion by *K. pneumoniae*. **Chemical and biochemical engineering quarterly**, v. 6, n. 3, p. 145–151, 1992.

KOUTINAS, A. A.;; WANG, R.-H. e WEBB, C. The biochemurgist –Bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 1, p. 24–38, doi:10.1002/bbb.6, 2007.

KRAUS, G. A. Synthetic Methods for the Preparation of 1, 3-Propanediol. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 36, n. 8, p. 648–651, 2008.

KURIAN, J. A New Polymer Platform for the Future — Sorona® from Corn Derived 1,3-Propanediol. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 13, n. 2, p. 159–167, doi:10.1007/s10924-005-2947-7, 2005.

EUA. LAWRENCE, F. R. e SULLIVAN, R. H. **Process for making a dioxane, US Patent 3,687,981**. n. [s.n.], 1972.

LEE, H. K. e MADDOX, I. S. Microbial production of 2, 3-butanediol from whey permeate. **Biotechnology letters**, v. 6, n. 12, p. 815–818, 1984.

LIMAYEM, A. e RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.

LONG, S. K. e PATRICK, R. Production of 2,3-Butylene Glycol from Citrus Wastes: I. The *Aerobacter aerogenes* Fermentation. **Applied Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 244–248, 1961.

MACRELLI, S.;; MOGENSEN, J. e ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1–18, 2012.

MADDOX, I. S. Microbial Production of 2, 3-Butanediol. **Biotechnology Set, Second Edition**, p. 269–291, 1996.

MAERVOET, V. E. T. et al. Enhancing the Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol Using Metabolic Engineering. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 189–202, doi:10.1021/op1001929, 2011.

MANNAZZU, I. et al. Utilization Of Raw Glycerol From Biodiesel Industry For The Production Of Yeast Biomass and Secondary Metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 150, Supplement, p. 323 –, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.316, 2010.

MARKETSANDMARKETS. **Global 1,3-propanediol (1,3-PDO) market worth \$560 million by 2019**. . [S.l: s.n.], 2012.

MCCALL, K. B. e GEORGI, C. E. The production of 2, 3-butanediol by fermentation of sugar beet molasses. **Applied microbiology**, v. 2, n. 6, p. 355, 1954.

MELERO, J. A. et al. Etherification of biodiesel-derived glycerol with ethanol for fuel formulation over sulfonic modified catalysts. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 142–151, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.105, 2012.

MENZEL, K.; ZENG, A.-P. e 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, doi:10.1016/S0141-0229(96)00087-7, 1997.

METSOVITI, M.; PARASKEVAIDI, K.; et al. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1872–1882, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.011, 2012.

METSOVITI, M.; PARAMITHIOTIS, S.; et al. Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 1, p. 57–68, doi:10.1002/elsc.201100058, 2012.

MOOTABADI, H. et al. Ultrasonic-assisted biodiesel production process from palm oil using alkaline earth metal oxides as the heterogeneous catalysts. **Fuel**, v. 89, n. 8, p. 1818–1825, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2009.12.023, 2010.

MOTWANI, M. et al. Microbial production of 2, 3-butanediol from water hyacinth. **Bioresource technology**, v. 44, n. 3, p. 187–195, 1993.

NAKASHIMADA, Y. et al. Enhanced 2, 3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 661–664, 2000.

NEUMANN, W. Glycerin and its history. **Cosmetic science and technology series 11**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1991. p. 7–14.

OH, B.-R. et al. The production of 1,3-propanediol from mixtures of glycerol and glucose by a *Klebsiella pneumoniae* mutant deficient in carbon catabolite repression. **Bioresource technology**, v. 130, p. 719–24, doi:10.1016/j.biortech.2012.12.076, 2013.

OLSON, B. H. e JOHNSON, M. J. The Production of 2,3-Butylene Glycol by *Aerobacter aerogenes* 199. **Journal of Bacteriology**, v. 55, n. 2, p. 209–222, 1948.

PAGLIARO, M. e ROSSI, M. **The Future of Glycerol**. [S.l.]: The Royal Society of Chemistry, 2008. p. P001–P127

PEREGO, P. et al. 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 6, p. 613–620, doi:10.1007/s004490000210, 2000.

REIMANN, A. e BIEBL, H. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and product tolerant mutants in fedbatch culture: Feeding strategy for glycerol and ammonium. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 7, p. 827–832, doi:10.1007/BF00127897, 1996.

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, n. 1, p. 223–227, doi:10.1016/j.renene.2011.08.005, 2012.

ROSSI, D. M. et al. Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Renewable Energy**, v. 55, p. 404–409, doi:10.1016/j.renene.2012.12.048, 2013.

ROSSI, D. M.; SOUZA, E. A. DE e 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. 1952–64, doi:10.1007/s12010-013-0114-5, 2013.

SAINT-AMANS, S. et al. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 8, p. 831–836, doi:10.1007/BF00133962, 1994.

SALAMATINIA, B. et al. Optimization of ultrasonic-assisted heterogeneous biodiesel production from palm oil: A response surface methodology approach. **Fuel Processing Technology**, v. 91, n. 5, p. 441–448, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2009.12.002, 2010.

SAXENA, R. K. et al. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 895–913, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.07.003, 2009.

SEABRA, J. E. A. et al. Life cycle assessment of Brazilian sugarcane products: GHG emissions and energy use. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 5, n. 5, p. 519–532, 2011.

SHELL. **Shell Chemical Company Shell Chemical Company announces commercial- ization of new polymer (Press Release)**. . [S.l: s.n.], 1995.

SILVA, G. P. DA;; LIMA, C. J. B. DE e CONTIERO, J. Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. **Catalysis Today**, doi:10.1016/j.cattod.2014.05.016, 2014.

SOLTYS, K. A.;; BATTA, A. K. e KONERU, B. Successful Nonfreezing, Subzero Preservation of Rat Liver with 2,3-Butanediol and Type I Antifreeze Protein. **Journal of Surgical Research**, v. 96, n. 1, p. 30–34, doi:http://dx.doi.org/10.1006/jsre.2000.6053, 2001.

SUNDER, A. et al. Controlled synthesis of hyperbranched polyglycerols by ring-opening multibranching polymerization. **Macromolecules**, v. 32, n. 13, p. 4240–4246, 1999.

SYU, M.-J. Biological production of 2, 3-butanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 10–18, 2001.

TANZI -, M. C. et al. Polyurethane-maleamides for cardiovascular applications: synthesis and properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine (USA)**, v. 10, n. 12, p. 711–714, 1999.

THOMPSON, J. C. e HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, n. 2, p. 261, 2006.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **1,3-Propanediol market: global industry analysis, size, share, growth, trends and forecasts 2013–2019**. . [S.l: s.n.], 2012.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Glycerin; GRAS status as a direct human food ingredient**. . [S.l: s.n.], 1979.

UMARE, S. S.; CHANDURE, A. S. e PANDEY, R. A. Synthesis, characterization and biodegradable studies of 1, 3-propanediol based polyesters. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, n. 3, p. 464–479, 2007.

VLYSIDIS, A. et al. Glycerol utilisation for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58–59, p. 1–11, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.07.004>, 2011.

VOLOCH, M. et al. 2,3-butanediol. In: BLANCH, H.; DREW, S.; WANG, D. (Eds.). **Comprehensive biotechnology; the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. [S.l.]: Oxford: Pergamon/Elsevier, 1985. p. 933–44.

WANG, K.; HAWLEY, M. C. e DEATHOS, S. J. Conversion of glycerol to 1, 3-propanediol via selective dehydroxylation. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 42, n. 13, p. 2913–2923, 2003.

WANG, Z. et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 201–223, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00060-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00060-X), 2001.

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

WILSON, E. K. BIODIESEL REVS UP. **Chemical & Engineering News Archive**, v. 80, n. 21, p. 46–49, doi:[10.1021/cen-v080n021.p046](https://doi.org/10.1021/cen-v080n021.p046), 2002.

XIAO, Z. e XU, P. Acetoin metabolism in bacteria. **Critical reviews in microbiology**, v. 33, n. 2, p. 127–140, 2007.

XU, Y.-Z. et al. Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 5, p. 965–972, doi:10.1002/bit.22455, 2009.

YANG, F.; HANNA, M. A. e SUN, R. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 13, doi:10.1186/1754-6834-5-13, 2012.

YAZDANI, S. S. e GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 213–219, 2007.

YAZDANI, S. S. e GONZALEZ, R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 340–351, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2008.08.005, 2008.

YEN, H.; LI, F. e CHANG, J. Bioresource Technology The effects of dissolved oxygen level on the distribution of 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol produced from glycerol by an isolated indigenous *Klebsiella* sp . Ana-WS5. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 374–378, doi:10.1016/j.biortech.2013.12.005, 2014.

YU, E. K. C. e SADDLER, J. N. Power solvent production by *Klebsiella pneumoniae* grown on sugars present in wood hemicellulose. **Biotechnology Letters**, v. 4, n. 2, p. 121–126, doi:10.1007/BF01091347, 1982.

ZENG, A. et al. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 44, n. 8, p. 902–911, 1994.

ZENG, A.-P. et al. Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 9, p. 770–779, doi:10.1016/0141-0229(93)90008-P, 1993.

ZENG, A.-P. e BIEBL, H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1, 3-propanediol production and the new trends. **Tools and Applications of Biochemical Engineering Science**. [S.l.]: Springer, 2002. p. 239–259.

ZHANG, G. et al. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 3, p. 256–260, doi:10.1016/j.bej.2007.05.003, 2007.

ZHANG, Y. et al. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1, 3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. **Metabolic Engineering**, v. 8, n. 6, p. 578–586, 2006.

ZHAO, Y.-N.; CHEN, G. e YAO, S.-J. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 2, p. 93–99, doi:10.1016/j.bej.2006.09.007, 2006.

ZHENG, Y.; CHEN, X. e SHEN, Y. Commodity chemicals derived from glycerol, an important biorefinery feedstock. **Chemical Reviews**, 2008.

ZHOU, C.-H. (Clayton) et al. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chem. Soc. Rev.**, v. 37, n. 3, p. 527–549, doi:10.1039/B707343G, 2008.

ZHOU, L.; AL-ZAINI, E. e ADESINA, A. A. Catalytic characteristics and parameters optimization of the glycerol acetylation over solid acid catalysts. **Fuel**, v. 103, p. 617–625, 2013.

ZHOU, L.; NGUYEN, T.-H. e ADESINA, A. A. The acetylation of glycerol over amberlyst-15: Kinetic and product distribution. **Fuel Processing Technology**, v. 104, p. 310–318, 2012.

ZHU, J.-G. et al. Enhanced 1,3-propanediol production in recombinant *Klebsiella pneumoniae* carrying the gene *yqhD* encoding 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1217–1223, doi:10.1007/s11274-009-0005-7, 2009.