

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO
CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM ATCC
4259 UTILIZANDO GLICEROL PA COMO
SUBSTRATO**

Carlos Eduardo de Oliveira Lacerda

**Orientadoras: Prof^a Dr^a Glória Maria Vinhas
Prof^a Dr^a Yêda M. B. de Almeida**

E

Q

Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química
CEP: 50640-901 – Cidade
Universitária- Recife - PE
Telefax: 0-xx-81- 21267289

Recife / PE

Outubro / 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO *CLOSTRIDIUM
ACETOBUTYLICUM* ATCC 4259 UTILIZANDO
GLICEROL PA COMO SUBSTRATO**

Dissertação de Mestrado do aluno Carlos Eduardo de Oliveira Lacerda, como requisito a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Pernambuco, desenvolvido no Laboratório de Materiais Poliméricos e Caracterização em conjunto com o Laboratório de Microbiologia Industrial ambos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, no período de março de 2011 a julho de 2013, sob a orientação da professora Glória Maria Vinhas e da professora Yêda M. B. de Almeida.

Área de concentração: Engenharia Química
Subárea: Processos Biotecnológicos

Recife
2013

Catálogo na fonte
Bibliotecário Vimário Carvalho da Silva, CRB-4 / 1204

L131a	<p>Lacerda, Carlos Eduardo de Oliveira Avaliação do crescimento do <i>Clostridium Acetobutylicum</i> ATCC 4259 utilizando glicerol PA como substrato. / Carlos Eduardo de Oliveira Lacerda. - Recife: O Autor, 2013. X, 73 folhas, il., gráfs., tabs.</p> <p>Orientador: Prof^ª. Dr^ª Glória Maria Vinhas e Prof^ª Dr^ª Yêda M. B. de Almeida. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2013. Inclui Referências, listas de figuras, de tabelas e de anexos.</p> <p>1. Engenharia Química. 2. Glicerina. 3. Glicerol. 4. Propanodiol. 5. Biodiesel. I. Vinhas, Glória Maria (orientadora). II. Almeida, Yêda M. B. de. III. Título.</p> <p>660.2 CDD (22. ed.)</p> <p>UFPE BCTG/2013-314</p>
-------	--

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO *CLOSTRIDIUM*
ACETOBUTYLICUM ATCC 4259 UTILIZANDO GLICEROL
PA COMO SUBSTRATO**

Linha de Pesquisa: Processos Biotecnológicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, defendida e aprovada em 25 de outubro de 2013 pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

Profª. Dra. Glória Maria Vinhas – DEQ / UFPE

Profª. Dra. Yêda Medeiros Bastos de Almeida – DEQ / UFPE

Prof. Dr. José Marcos Francisco da Silva – DEQ / UFPE

Profª. Dra. Janete Magali de Araújo – ANTIBIÓTICOS / UFPE

AGRADECIMENTOS

*Agradeço aos meus pais **Marcos José Lacerda e Daise Conceição de Oliveira** por terem me educado e oferecido as ferramentas necessárias para que eu crescesse e me tornasse uma pessoa íntegra. Pelo amor, carinho e dedicação nesses 26 anos de vida. Agradeço aos meus irmãos **Paulo Gustavo Ramalho e Érika Viviane Ramalho** por toda ajuda oferecida sempre que precisei.*

Agradeço a todos os meus amigos pelo carinho, amizade e companheirismo. Encontros, festas, estudos em grupo e todos os outros suportes essenciais durante esses dois anos de Pós-Graduação. Citar nomes seria injusto, mas posso dizer que todos tiveram sua importância.

*Agradeço as professoras **Glória Maria Vinhas e Yêda Medeiros Bastos de Almeida** pela orientação no projeto, pela dedicação e paciência durante o processo de escrita e correção do trabalho. Agradeço também a ajuda da professora e companheira de pesquisa **Flávia Gonçalves Domingues Ferreira**.*

*Agradeço aos meus colegas de trabalho **Davi e Pollyana** pelo tempo que passamos juntos no laboratório executando os experimentos e pelas horas divertidas que compartilhamos.*

A todos os membros do Laboratório de Materiais Poliméricos e Caracterização e do Laboratório de Microbiologia Industrial por todo o apoio durante o projeto.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos órgãos de auxílio à pesquisa, REUNI e CAPES, pelo auxílio financeiro cedido durante todo o período.

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado”. (J. R. R. Tolkien)

RESUMO

A glicerina bruta, subproduto da produção de biodiesel, vem sendo investigada como fonte de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado. A utilização da glicerina na produção de 1,3-propanodiol por via microbiológica é uma forma bastante viável de utilização dessa substância. O processo microbiano ocorre em anaerobiose, onde bactérias (*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Clostridium*) convertem a glicerina bruta em 1,3-propanodiol e vários outros produtos, como: ácido acético, etanol, ácido succínico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fórmico, CO₂ e H₂, de acordo com as vias metabólicas do seu processo fermentativo. Dentre os micro-organismos estudados, no entanto, destacam-se as bactérias *Clostridium butyricum* e *Klebsiella pneumoniae* como as de maior utilização e provavelmente as melhores produtoras deste composto, devido a sua tolerância ao substrato, seu rendimento e produtividade. O presente trabalho consistiu em avaliar o comportamento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 através de fermentações em batelada utilizando glicerol PA como fonte de carbono. A fermentação foi realizada em meio de cultura próprio para obtenção de 1,3-propanodiol, importante monômero utilizado na síntese de polímeros. Foi realizado um planejamento fatorial 2² em estrela com ponto central para avaliar a influência de duas variáveis (glicerol PA e extrato de levedura) no crescimento do micro-organismo. Foram realizados 10 ensaios no planejamento, sendo 9 ensaios em pontos distintos e uma repetição no ponto central. Também foi realizado um experimento de cinética microbiana para estudar em detalhes o crescimento do micro-organismo. Em ambos os casos a técnica de filtração com peso seco foi utilizada para calcular a concentração celular presente no meio. A cinética microbiana mostrou que, para as condições experimentais da pesquisa, a fase exponencial de crescimento ocorreu até o tempo de 14 horas, e uma produtividade celular (P) de 0,0405 g/L.h, uma velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de 0,0403 h⁻¹ e um tempo de geração (G) de 15,7 h foram alcançados. As melhores respostas obtidas no planejamento fatorial foram 1,42 g/L e 1,40 g/L (30 g/L e glicerol e 2 g/L de extrato de levedura no meio de cultura).

Palavras-chave: 1,3-propanodiol; biodiesel; *Clostridium acetobutylicum*; glicerol; planejamento fatorial.

ABSTRACT

The crude glycerin, a byproduct of biodiesel production, has been investigated as a carbon source for microbial processes for obtaining high-value bioproducts. The use of glycerin for the production of 1,3-propanediol by microbiological ways is quite feasible to use this substance. The microbial process occurs under anaerobic conditions where bacteria (*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*) convert the crude glycerin to 1,3-propanediol and other products such as acetic acid, ethanol, succinic acid, lactic acid, citric acid, formic acid, CO₂ and H₂ in accordance with the metabolic pathways of its fermentation process. Among the micro-organisms studied, however, we highlight the bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* as the most likely use and the best producers of this compound, due to their tolerance to the substrate, its yield and productivity. The present work was to evaluate the behavior of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 through batch fermentations using pure glycerol as carbon source. The fermentation was performed in a culture medium suitable for obtaining 1,3-propanediol, major monomer used in the synthesis of polymers. We conducted a 2² star factorial design with center point to evaluate the influence of two variables (pure glycerol and yeast extract) on the growth of micro-organism. 10 tests were performed in planning, 9 trials at different points and a repeat at the midpoint. Also an experiment of microbial kinetics was conducted to study in detail the growth of micro-organism. In both cases the filtration technique was used to calculate the cell concentration present in the medium. The microbial kinetics showed that, for the experimental conditions of the study, the exponential phase of growth lasted 14 hours, and a cell productivity (P) of 0.0405 g/L.h, a maximum growth speed ($\mu_{\text{m\acute{a}x}}$) of 0.0403 h⁻¹ and generation time (G) of 15.7 h were achieved. The best responses in factorial design were 1.42 g/L and 1.40 g/L (30 g/L of glycerol and 2 g/L of yeast extract in the culture medium).

Keywords: 1,3-propanediol; biodiesel; *Clostridium acetobutylicum*; factorial design; glycerol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal	4
Figura 2 – Aplicações do 1,3-propanodiol	10
Figura 3 – Etapas bioquímicas da fermentação do glicerol por espécies de <i>Clostridium</i>	13
Figura 4 – Células de <i>Clostridium acetobutylicum</i> observadas por microscopia ótica	28
Figura 5 – Vias bioquímicas da fermentação do glicerol pelo <i>Clostridium butyricum</i>	30
Figura 6 – Fases de crescimento celular	34
Figura 7 – Caracterização de $\mu_{\text{máx}}$	35
Figura 8 – Preparação de meio de cultura utilizando chapa aquecedora e gás nitrogênio	40
Figura 9 – Fermentador em batelada	43
Figura 10 – Tubos de penicilina contendo os meios de cultura RCM (a) e Tioglicolato Fluido (b) antes da inoculação do <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259	45
Figura 11 – <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259 após 24 horas de cultivo a 35 °C em RCM (a) e Tioglicolato Fluido (b)	46
Figura 12 – Concentração celular do <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259 nas amostras de meio de cultura para manutenção e crescimento	47
Figura 13 – Crescimento celular ajustado	48
Figura 14 – Caracterização do $\mu_{\text{máx}}$ para o experimento	49
Figura 15 – Efeito das variáveis independentes sobre a concentração celular. (Q) representa o termo quadrático e (L) representa o termo linear	51
Figura 16 – Superfície de resposta (a) e curvas de nível (b) da concentração celular em função do glicerol e extrato de levedura	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração final de 1,3-propanodiol, rendimento (Y_{PD}) e produtividade volumétrica (Q_{PD}) de diferentes linhagens e mutantes em culturas de batelada e batelada alimentada	19
Tabela 2 – Solução salina para diluição	39
Tabela 3 – Composição da solução de elementos traços	39
Tabela 4 – Composição da solução de ferro	40
Tabela 5 – Variáveis e níveis do planejamento experimental 2^2 estrela com ponto central	42
Tabela 6 – Ensaio do planejamento experimental 2^2 estrela com ponto central	42
Tabela 7 – Resultados do teste com os meios de cultura para manutenção e crescimento	46
Tabela 8 – Valores de $\ln(X/X_0)$ para cálculo da velocidade máxima de crescimento	49
Tabela 9 – Concentração celular do <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259 nos 10 ensaios do planejamento fatorial ao fim das 72 horas de fermentação	50

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	2
2.1. Biocombustíveis e biodiesel.....	2
2.2. Glicerol e glicerina.....	6
2.3. 1,3-propanodiol (Produção por via química e aplicações).....	8
2.4. Bioquímica do processo fermentativo do glicerol.....	10
2.5. Produção do 1,3-propanodiol por via fermentativa.....	19
2.6. <i>Clostridium acetobutylicum</i> e sua via de fermentação do glicerol.....	26
2.7. Cinética microbiana.....	32
2.8. Planejamento experimental.....	36
3. Objetivos.....	38
4. Materiais e Métodos.....	39
4.1. O Micro-organismo e suas condições de armazenamento.....	39
4.2. Meios e soluções utilizadas.....	39
4.3. Preparação dos meios – Uma abordagem geral.....	40
4.4. Meio de cultura para manutenção e crescimento.....	41
4.5. Pré-cultura.....	41
4.6. Meio de cultura para fermentação e cinética.....	41
4.7. Avaliação do crescimento microbiano – Biomassa.....	42
4.8. Planejamento fatorial.....	42
4.9. Cinética microbiana.....	43
5. Resultados e Discussões.....	45
5.1. Meio de cultura ideal para manutenção do micro-organismo.....	45
5.2. Cinética Microbiana.....	48

5.3.Planejamento fatorial.....	50
6. Conclusões.....	53
7. Perspectivas de Trabalhos Futuros.....	54
8. Referências Bibliográficas.....	55
9. Anexo.....	73

1. Introdução

O século XX pode ser caracterizado como o século do petróleo. A sociedade moderna acostumou-se a desfrutar do conforto oferecido por esta matéria prima não renovável, na forma de combustíveis e produtos químicos de uso diário, como os plásticos. Materiais derivados do petróleo têm sido largamente utilizados desde meados do século passado, substituindo a madeira, os metais e até mesmo o concreto, dando início ao que chamamos de indústria petroquímica (MOTA, 2006).

A maioria das necessidades energéticas é suprida, atualmente, com a utilização de fontes de energia petroquímicas, carbono e gás natural, mas esses combustíveis fósseis são finitos, e seu uso contínuo tem causado graves consequências ao meio ambiente. Esse fato, aliado a um desenvolvimento socioeconômico mais intenso, sobretudo nos países em desenvolvimento, tem incentivado a utilização de insumos renováveis, que possam substituir, ao menos parcialmente, esses combustíveis de origem fóssil como petróleo, carvão e gás natural. O limite da utilização dos combustíveis fósseis não ocorrerá apenas pelo esgotamento das reservas, mas também pela redução da capacidade ambiental do planeta de absorver os gases (CO_2 , SO_2 e NO_x) oriundos de sua combustão. Como insumos renováveis temos, por exemplo, os óleos vegetais, que podem ser usados para produção de biodiesel (MOTA, 2006; RIBEIRO, 2006; MOTA, SILVA & GONÇALVES, 2009).

Então, a crescente demanda global de energia e uma predileção por combustíveis limpos, biodegradáveis e inesgotáveis, são responsáveis por aumentar a já crescente indústria de biocombustíveis. Da produção de biodiesel, têm-se alguns subprodutos, como por exemplo, a glicerina. Com o aumento dessa produção, um volume cada vez maior dessa glicerina residual é gerado. Então, estudos vêm sendo feitos para realizar a sua bioconversão em produtos de alto valor agregado, como o 1,3-propanodiol.

A avaliação do crescimento do micro-organismo responsável por essa bioconversão é uma importante etapa para compreender todo o mecanismo e otimizar o aproveitamento da glicerina residual.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biocombustíveis e biodiesel

O transporte é um dos maiores responsáveis pela emissão de poluentes atmosféricos, uma vez que depende da combustão de derivados do petróleo como gasolina e óleo diesel. De toda energia primária consumida no mundo em 1999, 43 % é proveniente do petróleo, e desta parcela, 58 % destinou-se ao setor de transporte (RIBEIRO, 2006). Em 2003, cerca de 50 % da energia consumida no Brasil provieram de fontes fósseis, como óleo e seus derivados. O transporte foi a origem de aproximadamente metade desse total (MOTA, SILVA & GONÇALVES, 2009).

A acumulação de dióxido de carbono, e outros gases que provocam o efeito estufa na atmosfera, é considerada a grande responsável pelo aumento da temperatura global e há uma previsão de que no futuro ocorram desastrosas consequências ao planeta (JEGANNATHAN, CHAN & RAVINDRA, 2009).

A preocupação atual pela redução da poluição e a crise energética têm estimulado o mercado mundial de biocombustíveis. A economia global mantém-se em crescimento e a demanda por energia limpa e recursos renováveis encontra-se em contínuo aumento (RIVALDI *et al.*, 2007/2008).

Uma das alternativas mais prementes para minimizar o problema causado pelos combustíveis fósseis são os biocombustíveis, que tem características similares a esses combustíveis, permitindo que eles sejam utilizados em sistemas de combustão. Por serem de origem vegetal, eles contribuem para o ciclo do carbono na atmosfera e por isso são considerados renováveis, já que o CO₂ emitido durante a queima é reabsorvido pelas plantas que irão ser utilizadas em sua produção, causando um impacto muito menor no clima do planeta. O Brasil é um dos pioneiros no uso deste tipo de combustível já utilizando o álcool etílico, oriundo da fermentação da cana de açúcar, desde a década de 1970 (MOTA, SILVA & GONÇALVES, 2009).

A produção de biocombustíveis é resultado de uma convergência de diversos interesses. É uma opção energética sustentável, que proporciona benefícios técnicos ao provir de uma

fonte de energia renovável, não conter enxofre e diminuir as emissões de gases do efeito estufa. Conduz benefícios econômicos e sociais, ao reduzir as importações de energia, gerando empregos, e contribuindo com a população rural proporcionando novas saídas para o setor agrícola (PINTO, 2009).

Nas primeiras décadas do século XX, o inventor alemão Rudolph Diesel apresentou numa exposição internacional de Paris, um motor com um novo sistema de funcionamento, chamado ciclo diesel. O motor era acionado com óleo de amêndoas. Os elevados custos de produção das sementes naquela época foi o maior empecilho para a utilização desse motor. A abundância de petróleo na época e o baixo custo de refino do mesmo, fez com que os óleos vegetais fossem substituídos pelo óleo refinado do petróleo, que então foi chamado de óleo diesel. Porém, nas últimas décadas, o cenário tem mudado, e os biocombustíveis vêm ganhando importância (PINTO, 2009).

O crescente consumo e o aumento dos custos do petróleo bruto, a diminuição da quantidade de sua finita reserva e a preocupação pela redução de emissões de gases do efeito estufa impulsionaram uma busca pela tecnologia ecologicamente sustentável para produção de combustíveis alternativos. O biodiesel aparece como uma boa alternativa, sendo mais seguro que o combustível oriundo do petróleo se for leveda em consideração a inflamabilidade e a toxicidade (PINTO, 2009).

No Brasil, a produção e comercialização de biodiesel possuem importantes vantagens devido à grande disponibilidade de matéria prima para sua produção e ao crescimento contínuo da indústria de óleos vegetais e etanol (OLIVEIRA, 2006).

O biodiesel encontra-se registrado na *Environment Protection Agency* (EPA) - USA, como combustível e como aditivo para combustíveis e pode ser usado puro (B100), em mistura com o diesel de petróleo (20% de biodiesel - B20), ou numa proporção baixa (1 a 5 %) como aditivo (COSTA NETO *et al.*, 2000). Sua utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ciclo diesel, sem haver a necessidade de nenhuma modificação neles.

A partir de 2008, o Brasil incluiu o biodiesel na sua matriz energética quando se tornou obrigatória a adição de 2 % de Biodiesel no óleo diesel mediante a lei 11.097 de 13 de janeiro

de 2005. Essa obrigatoriedade também resultou no aceleração de sua produção (BRASIL, 2005). A partir de 2010, a quantidade de biodiesel a ser adicionada passou a ser 5 % conforme Resolução CNPE nº 6 de 16 de setembro de 2009 (ANP, 2013).

De acordo com o Ministério de Minas e Energia (MME), com o biodiesel, o Brasil vai aumentar a quota de fontes de energia renováveis em sua matriz energética, fatia que atualmente representa aproximadamente 43,8 % (MME, 2012). Vale lembrar que a parcela desse tipo de energia na matriz energética mundial é de 13 % (LEONETI, ARAGÃO-LEONETI & DE OLIVEIRA, 2012).

Para que o biodiesel seja mais do que um aditivo, deve ser produzido a um custo muito mais baixo e de acordo com a regulamentação brasileira, ANP 42/04, e especificações internacionais (QUINTELLA *et al.*, 2009). Além disso, diferentes produtos derivados de sua produção devem ser propostos para compensar os seus custos de produção (JANAUN & ELLIS, 2010).

O biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e não tóxico (DEMIRBAS, 2002; FUKUDA, KONDO & TAMALAMPUDI, 2009). Pode ser definido como sendo um mono-álquil éster de ácidos graxos derivados de fontes renováveis (óleos vegetais e gordura animal) com álcool na presença de um catalisador, obtido através de um processo de transesterificação, no qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos e tendo como subproduto principal, a glicerina (Figura 1) (MONYEM & VAN GERPEN, 2001; ENCINAR *et al.*, 2002; LEONETI, ARAGÃO-LEONETI & DE OLIVEIRA, 2012).



Figura 1 – Esquema de produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal (LEONETI, ARAGÃO-LEONETI & DE OLIVEIRA, 2012).

Os ésteres têm características físico-químicas muito semelhantes às do diesel, conforme demonstram as experiências realizadas em diversos países. Esse combustível é uma evolução na tentativa de substituição de óleo diesel por biomassa, iniciada pelo aproveitamento de óleos vegetais “in natura” (OLIVEIRA, 2006).

Na comparação com o diesel de petróleo, o biodiesel também tem significativas vantagens ambientais. Estudos do *National Biodiesel Board* (associação que representa a indústria de biodiesel nos Estados Unidos) demonstraram que a queima de biodiesel pode gerar as seguintes reduções: 48 % de emissão de monóxido de carbono; 47 % de material particulado (que penetra nos pulmões); 67 % de hidrocarbonetos. Como esses percentuais variam de acordo com a quantidade de biodiesel adicionado ao diesel de petróleo, no B5 (5 % de biodiesel) essas reduções ocorrem de modo proporcional (ANP, 2013).

Uma das grandes vantagens do biodiesel é sua adaptação aos motores de ciclo diesel, pois enquanto o uso de outros combustíveis limpos, como o gás natural ou o biogás, necessita de uma adaptação dos motores, a combustão do biodiesel dispensa essa adaptação, o que o torna uma alternativa econômica, tecnicamente viável, capaz de atender a frota movida a óleo diesel. Do ponto de vista econômico, a viabilidade está relacionada ainda à substituição das importações (diesel mineral) e às vantagens ambientais, que possibilitam uma redução da emissão de gases poluentes e de enxofre, que evitará custos com saúde pública no futuro (PARENTE, 2003).

O aproveitamento energético de óleos vegetais se mostra rentável do ponto de vista social, uma vez que gera postos de trabalho e aumenta a oferta da fração proteica das oleaginosas, importante insumo para a indústria de alimentos e ração animal, além de enriquecer em nitrogênio o solo durante o crescimento, viabilizando o plantio de outras culturas (PARENTE, 2003).

Estudos técnicos e econômicos também estão sendo realizados para avaliar a produtividade do consumo de matérias-primas, competitividade econômica, e os impactos ambientais de diferentes processos de produção de biodiesel, incluindo a pureza da glicerina resultante (HIRSCH, BEZDEK & WENDLING, 2006; KERR, 2007).

2.2. Glicerol e glicerina

O Glicerol é um composto químico de enorme importância, tanto como produto final ou como matéria prima para diversos outros produtos de valor agregado (MAERVOET *et al.*, 2011; CLOMBURG & GONZALEZ, 2013). A glicerina bruta é atualmente utilizada em grande escala na indústria de alimentos e de cosméticos, além de ser utilizada como matéria-prima na produção de uma série de compostos de interesse comercial (acroleína, dihidroxiacetona, metanol, ácido propiônico, ácido succínico, etc.) que são produzidos química ou biologicamente (MAERVOET *et al.*, 2011; WENDISCH, LINDNER & MEISWINKEL, 2011).

Nos primeiros anos de produção do biodiesel, a alta percentagem de glicerina obtida era considerada como um aspecto positivo, e com sua venda, o aumento da competitividade econômica global da fabricação de biodiesel parecia seguro, uma vez que a glicerina gerada na produção corresponde a aproximadamente 10 % do volume total de biodiesel produzido (DASARI *et al.*, 2005; KARINEN & KRAUSE, 2006; CHI *et al.*, 2007; YAZDANI & GONZALEZ, 2007). Em 2012, a produção de biodiesel no Brasil foi de aproximadamente 2,8 bilhões de litros, o que gerou aproximadamente 280 milhões de litros de glicerina, tendo como principais produtores os estados de Goiás, Mato Grosso e Rio Grande do Sul que foram responsáveis por 69 % da produção total (ANP, 2013).

Estudos vêm sendo feitos para identificar possíveis aplicações para a glicerina bruta. Estes estudos visam principalmente a produção de diferentes produtos químicos, a produção de hidrogênio, aditivos para combustíveis de automóveis e produção de etanol ou metanol. No entanto, existem outros potenciais usos para essa glicerina, como componente de mistura em ração animal, no tratamento de resíduos, entre outros. A partir dessas possibilidades, a ração animal atraiu a maior atenção, devido à quantidade de glicerina que seria necessária para atender à demanda para a mistura percentual de glicerina / ração (LEONETI, ARAGÃO-LEONETI & DE OLIVEIRA, 2012; CLOMBURG & GONZALEZ, 2013). Segundo as especificações, a glicerina pode ser adicionada na proporção de 10 % na ração e deve ter, pelo menos, 80 % de glicerol a partir da produção de biodiesel de óleos vegetais e até 150 ppm de metanol, de acordo com a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos (MME, 2011).

A glicerina gerada é um bônus, mas a tendência progressiva é de depreciação de preços pelo acúmulo da oferta ocasionado pelo crescimento das indústrias de biocombustíveis. (SHUCHRDT, SERCHELI & VARGAS, 1998; ENCINAR *et al.*, 1999; RAUSCH & BELYEA, 2006; YAZDANI & GONZALEZ, 2007; ASAD-UR-REHMAN *et al.*, 2008). Por exemplo, nos EUA, entre os anos de 2004 e 2011, o preço da glicerina bruta caiu 61 % (CLOMBURG & GONZALEZ, 2013). Portanto, o aumento da oferta de glicerina proveniente da produção do biodiesel, irá gerar um grande problema, pois não haverá mercado consumidor para essa quantidade. Desta forma, essa glicerina oriunda da produção de biodiesel passou de um produto apreciado a um problema de eliminação de resíduo (JOHNSON & TACONI, 2007).

Essa glicerina apresenta impurezas (álcool, sais, metais pesados, compostos mono e diacilgliceróis, ácidos graxos livres, sabão e água) que lhe conferem um baixo valor comercial (OOI *et al.*, 2004). A rentabilidade de vários processos químicos depende em parte, da venda dos subprodutos, permitindo a redução dos custos de produção e conseqüentemente, do preço final do produto. Grande parte do mercado de glicerina (indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos) requer a sua valorização e etapas de limpeza, a fim de estabelecer um processo economicamente viável (ZHAO, CHEN & YAO, 2006; MA *et al.*, 2009; LEONETI, ARAGÃO-LEONETI & DE OLIVEIRA, 2012; POSADA, RINCÓN & CARDONA, 2012). Desta forma, existe um grande interesse em sua purificação ou no seu reaproveitamento direto sem tratamento, proporcionando ao processo de produção de biodiesel maior competitividade e valorização crescente no mercado de biocombustíveis (YONG *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2005; ADHIKARI, FERNANDO & HARYANTO, 2008; KOSMIDER, LEJA & CZACZYK, 2011; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

Além da depreciação de preço, a purificação da glicerina é um processo oneroso, principalmente para pequenas e médias indústrias (JOHNSON & TACONI, 2007; SLINN *et al.*, 2008). Sendo assim, a glicerina bruta não purificada ou com purificação parcial vem sendo investigada como fonte de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado como 1,3-propanodiol, ácido acético, etanol, ácido succínico, ácido lático, ácido cítrico, ácido fórmico, CO₂ e H₂ (REHMAN *et al.*, 2008; ANAND, SAXENA & MARWAH, 2011; CLOMBURG & GONZALEZ, 2013). Atenção deve ser dada a utilização dessa glicerina bruta, já que as impurezas podem afetar a formação dos produtos e o crescimento da biomassa durante a fermentação (JENSEN *et al.*, 2012).

2.3.1,3-Propanodiol (Produção por via química e aplicações)

O 1,3-propanodiol ($C_3H_8O_2$) é um composto orgânico viscoso, incolor e não inflamável. É um líquido que possui baixa toxicidade e é miscível em água, álcoois e éter, e que pode ser transportado com facilidade (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

Inicialmente, o 1,3-propanodiol era produzido por via química. A DuPont começou com a acroleína, que era convertida em 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) através de uma hidratação. Então, o 3-HPA sofria uma hidrogenação na segunda etapa e o 1,3-propanodiol era formado (LAWRENCE & SULLIVAN, 1972; BIEBL *et al.*, 1992). A Shell, por outro lado, seguiu o caminho da hidroformilação do óxido de etileno a 3-hidroxi propanal. Este foi subsequentemente extraído e hidrogenado para a produção do 1,3-propanodiol (SULLIVAN, 1993).

O 1,3-propanodiol pode potencialmente ser usado em diversas reações de síntese, em particular, como um monômero para policondensações na produção de poliéster, poliéter e poliuretanos, substituindo outros glicóis clássicos (CAROLE, PELLEGRINO & PASTER, 2004; JOHNSON & TACONI, 2007; LIU *et al.*, 2011; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012). Ainda assim, o elevado custo no passado e baixa disponibilidade, quando era utilizado em sínteses químicas, faziam com que o 1,3-propanodiol não pudesse competir com dióis mais baratos, como o 1,2-propanodiol, 1,2-etanodiol e 1,4-butanodiol (MILLET, 1993; SULLIVAN, 1993).

Esta situação começou a mudar no período de 1995-1998, quando duas das principais empresas químicas, Shell e DuPont, anunciaram a comercialização de um novo poliéster baseado no 1,3-propanodiol, o poli(tereftalato de trimetileno) – PTT, conhecido como CORTERRATM (Shell) ou SORONATM (DuPont) (SHELL, 1995; ZENG & BIEBL, 2002; KURIAN, 2005).

O PTT é resultado da condensação do 1,3-propanodiol e do ácido tereftálico. Possui excelentes propriedades tais como boa resistência à tração, baixa geração de eletricidade estática e é adequado para aplicações têxteis e de fibras, proporcionando uma boa solidez na cor e resistência a manchas (ZENG & BIEBL, 2002; KURIAN, 2005; ZENG & SABRA, 2011). Apresenta também promissoras propriedades como plástico para engenharia, com

grande potencial para substituir o poli(tereftalato de etileno) – PET, e o poli(tereftalato de butileno) – PBT.

O PTT pode ser produzido sem prejudicar o meio-ambiente a um preço muito competitivo com o PET e o PBT. Segundo a Shell, o PPT pode ser oferecido a um preço de cerca de 1 US\$/Kg. O preço do PET oscila entre 0,9 e 1,8 US\$/Kg e do PBT entre 1,1 e 1,9 US\$/Kg (ZENG & BIEBL, 2002).

Então, em poucos anos, o 1,3-propanodiol passou a ser produzido em grande escala. O volume de produção no ano de 2000 foi entre 70000 e 80000 t/ano. Segundo uma projeção da empresa CONDUX (USA), o volume de produção do PTT ultrapassará a marca de 1 milhão t/ano nos próximos anos (ZENG & BIEBL, 2002).

O 1,3-propanodiol tem inúmeras outras aplicações interessantes além de constituinte de polímeros. Melhora as propriedades de solventes na forma de aditivo (aumento da flexibilidade na mistura do éster quats e outros aditivos), adesivos, resinas de poliéster (baixa viscosidade), detergentes (prevenção da separação de suas fases e perda da atividade enzimática), tintas (alto poder de tingimento), lubrificantes, anticongelantes (estabilidade térmica, menor corrosão e menor toxicidade que os derivados do etileno glicol) até a produção de cosméticos (KÖPNICK *et al.*, 1992; DECKWER, 1995; ZENG & BIEBL, 2002; EATON, BOON & SMITH, 2004; KATRLÍK *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2011; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012). Pode também ser utilizado pra produzir biocidas para as indústrias de desinfecção e no tratamento industrial para reuso da água, e agentes para manter o frescor de flores recém-cortadas (PINTO, 2009).

Solventes compostos por poliésteres baseados em 1,3-propanodiol são de natureza biodegradável, possuem maior estabilidade à luz e boa solubilidade, sendo assim, mais essa interessante aplicação pode ser adicionada à lista já crescente (WITT *et al.*, 1994; UMARE, CHANDURE & PANDEY, 2007). Exemplos de solventes incluem tintas à base de água, tais como as usadas em impressoras jato de tinta e tintas serigráficas. O 1,3-propanodiol é também um importante intermediário na síntese orgânica gerando vários tipos de medicamentos (vitamina H e imunossuppressores), repelentes de insetos, fragrâncias, ente outros (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

O mercado do 1,3-propanodiol está em crescimento e oferece uma grande oportunidade para o desenvolvimento de novos processos competitivos para sua produção. Esses novos processos evitam o uso de mais petróleo, proporcionando economias substanciais de energia (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012). A Figura 2 resume as principais aplicações do 1,3-propanodiol.

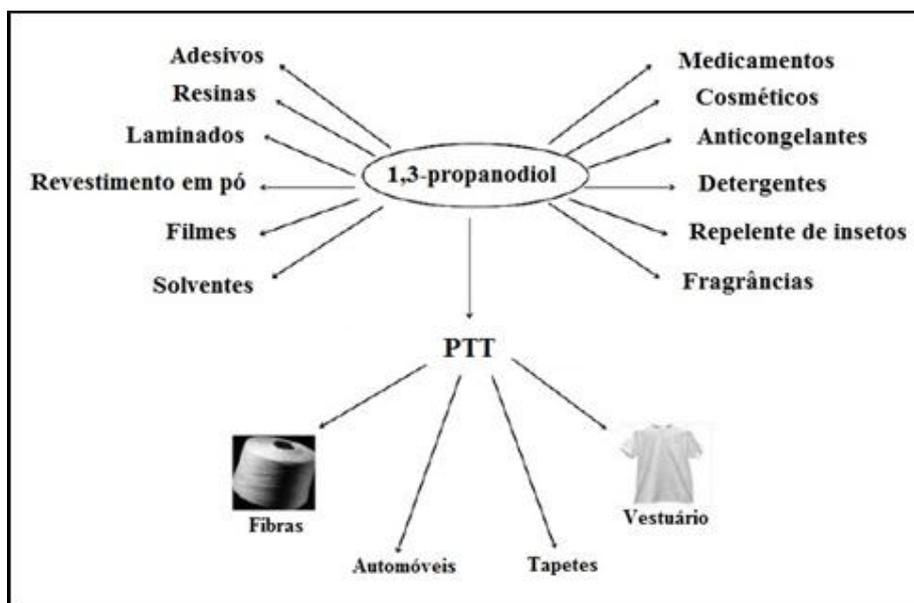


Figura 2 – Aplicações do 1,3-propanodiol (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

2.4. Bioquímica do processo fermentativo do glicerol

Vários inconvenientes cercam as rotas químicas de obtenção do 1,3-propanodiol, como alta pressão e temperatura necessárias, o uso de catalisadores caros, liberação de intermediários tóxicos, dependência de materiais não renováveis, baixo rendimento e alta complexidade (IGARI, MORI & TAKIKAWA, 2000). Esses fatores fazem com que maior atenção seja dada a via bioquímica de obtenção do 1,3-propanodiol, sendo essa uma alternativa mais fácil, gerando um produto limpo e sem intermediários tóxicos (ARNTZ *et al.*, 1991; DECKWER, 1995; NAKUMURA & WHITED, 2003; MU *et al.*, 2006; ZHAO, CHEN & YAO, 2006; MA *et al.*, 2009). O aumento crescente de novas aplicações para o 1,3-propanodiol também faz com que a demanda por sua produção biológica esteja em ascensão (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

Além disso, os custos envolvendo a via microbiana tem se reduzido. Matérias-primas para o meio de cultura para a fermentação (como a glicerina) são os principais fatores que contribuíam para o elevado custo e são responsáveis por mais de 50% do valor total (HIRSCHMANN *et al.*, 2005). Uma vez que a glicerina bruta não requer múltiplos passos de purificação (muitos deles caros), pode ser usada em substituição ao glicerol PA, significando uma redução no preço do processo de fermentação (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012; WILKENS *et al.*, 2012)

Os primeiros estudos mostram que desde os anos 50 o glicerol pode ser convertido por bactérias anaeróbicas facultativas, e anaeróbicas restritas em 1,3-propanodiol, etanol, 2,3-butanodiol, ácido acético, ácido láctico, ácido butírico e outros subprodutos de valor agregado. (DECKWER, 1995; SAUER, MAR & MATTANOVICH, 2008; TOKUMOTO & TANAKA, 2012).

Dentre os bioprodutos obtidos na fermentação, o 1,3-propanodiol é um dos mais conhecidos. Ele foi identificado pela primeira vez em 1881 por August Freund, a partir da fermentação do glicerol em uma cultura de *Clostridium pasteurianum* (BIEBL *et al.*, 1999; SAXENA *et al.*, 2009).

Além de ser um produto de fonte renovável, o desenvolvimento de novos processos biológicos, seleção de novas linhagens e declínio dos preços dos insumos fizeram com que o 1,3-propanodiol produzido por via microbiológica pudesse competir com o produzido pela via petroquímica (ZHU, LAWMAN & CAMERON, 2002; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012). Recentemente, uma atenção maior tem sido dada para a produção de substâncias químicas a partir de micro-organismos, como fungos e bactérias. No entanto, a produção microbiológica do 1,3-propanodiol só foi conhecida a partir da fermentação de vários gêneros de bactérias, dentre as quais podemos destacar: *Klebsiella* (*Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oryzocia*), *Citrobacter* (*Citrobacter freundii*), *Enterobacter* (*Enterobacter agglomerans*), *Clostridium* (*Cl. butyricum*, *Cl. acetobutylicum*, *Cl. freundii*, *Cl. pasteurianum* e recentemente *Cl. bif fermentans*) e *Lactobacilli* (*Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri*) (BIEBL *et al.*, 1999; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012; MYSZKA *et al.*, 2012).

Sob condições de anaerobiose esses micro-organismos convertem o glicerol em 1,3-propanodiol e vários outros produtos, como: ácido acético, etanol, ácido succínico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fórmico, CO₂ e H₂, de acordo com as vias metabólicas do seu processo fermentativo (BIEBL *et al.*, 1992; BARBIRATO *et al.*, 1998; GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2006; XIU *et al.*, 2007; OTTE *et al.*, 2009; PINTO, 2009). As bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium freundii* são linhagens classificadas como patógenas oportunistas, requerendo técnicas de biossegurança para o seu manuseio (BIEBL *et al.*, 1999).

Atualmente, as bactérias *Clostridium butyricum* e *Klebsiella pneumoniae* são as mais utilizadas e provavelmente são as melhores produtoras deste composto, devido a sua tolerância ao substrato, seu rendimento e produtividade (SAINT-AMANS *et al.*, 1994; ZENG *et al.*, 1994; GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2005; GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2006; XIU *et al.*, 2007).

Espécies encontradas na natureza normalmente não produzem grandes quantidades de metabólitos, e por isso muitas vezes é necessário melhorar essa produção para poder aplicá-la em escala industrial. Esse melhoramento é feito pela seleção dos componentes do meio de cultura, bem como suas concentrações e outros parâmetros envolvidos na fermentação, como temperatura, pH e agitação (CLOMBURG & GONZALEZ, 2013).

Embora a produção biológica do 1,3-propanodiol seja ecologicamente amigável, alguns obstáculos precisam ser vencidos para torná-la também economicamente viável. Baixo rendimento, inibição tanto pelo substrato como pelo produto, formação simultânea de subprodutos são exemplos dessas dificuldades (BIEBL, 1991; SAINT-AMANS *et al.*, 1994; BARBIRATO *et al.*, 1998; HAO *et al.*, 2008; OTTE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; CELINSKA, 2010). Esses inconvenientes têm sido investigados por diversos pesquisadores e esforços vêm sendo feitos para alcançar altos desempenhos no processo (GOTTSCHALK & AVERHOFF, 1990; ABBAD-ANDALOUSSI *et al.*, 1996b; PETITDEMANGE *et al.*, 1995; REIMANN & BIEBL, 1996; BARBIRATO *et al.*, 1998; CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011a; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

A Figura 3 mostra as possíveis etapas bioquímicas da fermentação do glicerol e seus diversos produtos, sendo o 1,3-propanodiol um deles. As reações após a etapa de formação do piruvato são comuns a todos os micro-organismos (BIEBL *et al.*, 1999).

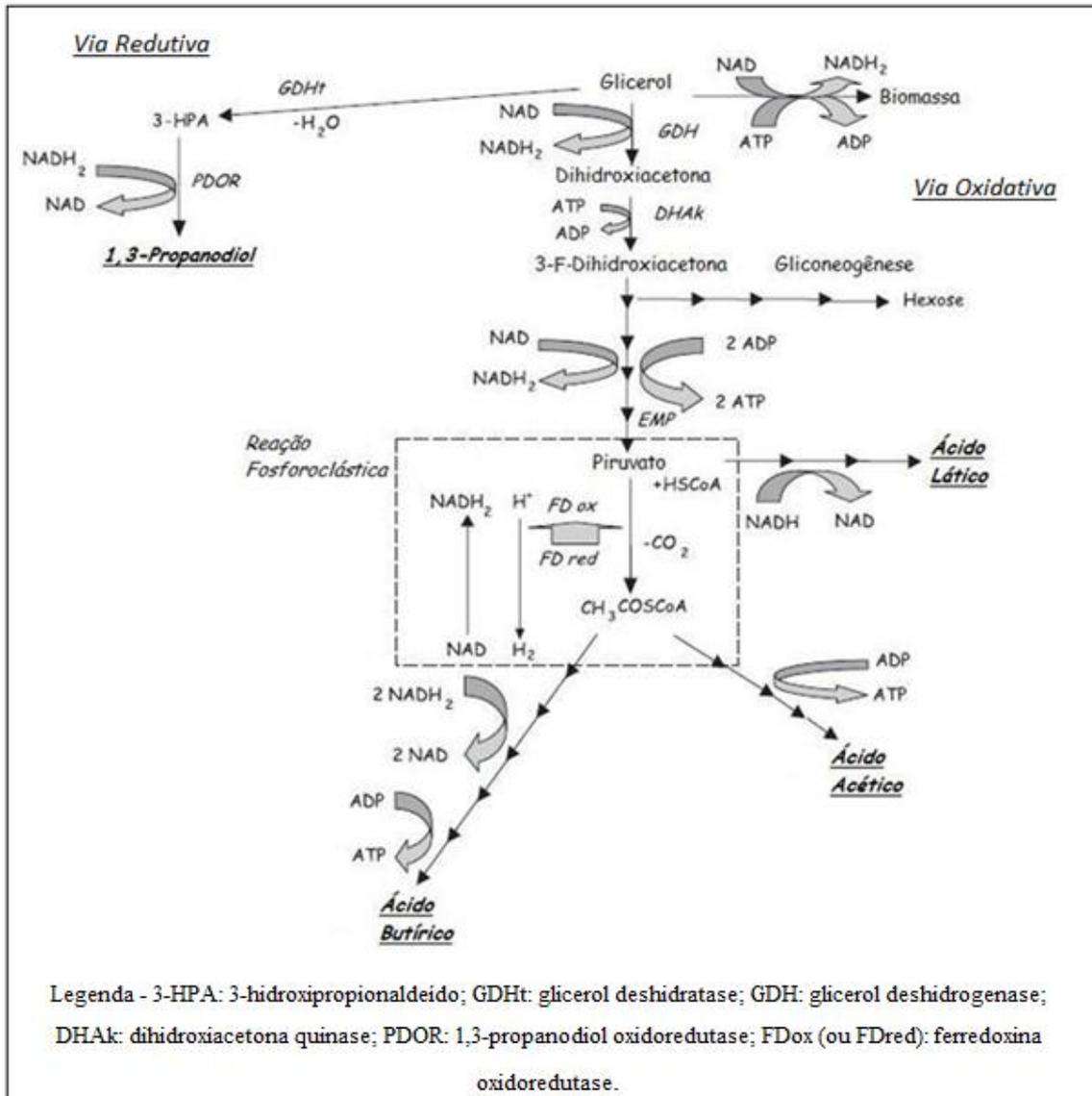


Figura 3 – Etapas bioquímicas da fermentação do glicerol por espécies de *Clostridium* (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011b).

Os micro-organismos degradam moléculas energéticas (como carboidratos) como forma de obter energia livre, a qual é transformada em ATP (adenosina trifosfato), que é o principal transportador de energia química em todas as células. O substrato é degradado na primeira fase da fermentação em uma série de reações catalisadas por enzimas para liberar o piruvato e produzir ATP.

Os elétrons gerados nessas reações são transferidos para coenzimas especializadas no transporte de elétrons, no caso o NAD⁺ (dinucleotídeo de adenina nicotinamida), que passa para sua forma reduzida, NADH. Quando um composto é oxidado, perde um elétron ou hidrogênio, o NAD⁺ é o carregador desse elétron. O NADH formado durante a degradação deve ser regenerado a NAD⁺. Na segunda fase da fermentação o ácido pirúvico é, então, reduzido pelo hidrogênio do NADH em outros compostos (CHENG & CHEN, 2007; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

Em condições anaeróbicas o glicerol é utilizado como fonte de energia para o crescimento de vários micro-organismos sofrendo desidratação pela enzima glicerol desidratase (GDHt) para produzir 3-hidroxiacetaldeído (3-HA). Posteriormente, este intermediário é transformado pela enzima 1,3-propanodiol oxidoreductase (PDOR) dependente do NADH para gerar o 1,3-propanodiol (Figura 3) (GONZÁLEZ- PAJUELO *et al.*, 2006; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

O glicerol é o substrato específico para a produção do 1,3-propanodiol, que não pode ser obtido por outra conversão anaeróbica (DECKWER, 1995; BIEBL *et al.*, 1999). Vários micro-organismos (combinação deles, ou geneticamente modificados) podem fermentar os açúcares a glicerol. Outros podem ainda fermentar misturas de glicerol e açúcares a 1,3-propanodiol. No entanto, nenhum micro-organismo pode fermentar os açúcares diretamente a 1,3-propanodiol (CAMERON *et al.*, 1998; NAKUMURA & WHITED, 2003; TANG *et al.*, 2009). Na literatura encontram-se trabalhos onde vários micro-organismos podem fermentar uma mistura de substrato contendo açúcar e glicerol para produzir o 1,3-propanodiol (FORAGE & FOSTER, 1982; TONG & CAMERON, 1992; HARTLEP *et al.*, 2002; SAXENA *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011).

O glicerol é um substrato mais redutor que a glicose. Para a mesma quantidade de carbono, o metabolismo do glicerol libera duas vezes mais NADH que a glicose (DECKWER, 1995; YAZDANI & GONZALEZ, 2007; CLOMBURG & GONZALEZ, 2013). A análise dos produtos da fermentação do glicerol mostra que parte dos produtos formados pela sua bioconversão são os mesmos produtos formados na fermentação do açúcar (VEIGA & FOSTER, 1992).

O transporte do glicerol através da membrana celular constitui a primeira etapa para o seu metabolismo. De uma forma geral, a assimilação de glicerol por parte dos microorganismos envolve transporte passivo (sem gasto de energia celular) e transporte ativo (com gasto de energia celular) através da membrana plasmática (GANCEDO, GANCEDO & SOLS, 1968; LAGES, SILVA-GRAÇA & LUCAS, 1999). Como a difusão simples não requer gasto de energia caracteriza-se como um tipo de transporte passivo, e apenas requer um gradiente de concentração para o transporte do substrato através da membrana, a fim de estabelecer a isotonia, ou seja, alcançarem a mesma concentração do substrato no interior da célula (RIVALDI *et al.*, 2007/2008).

O glicerol é um dos poucos substratos que atravessa a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas. Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática pelos possíveis mecanismos citados, o glicerol pode ser catabolizado, ou seja, pode ser quebrado em moléculas mais simples, por várias rotas metabólicas independentes. Uma vez que o glicerol é assimilado no interior da célula, numerosos compostos são produzidos como consequência do seu metabolismo (Figura 3) (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011b).

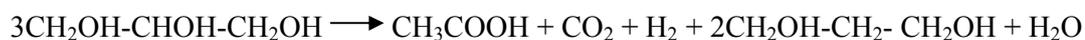
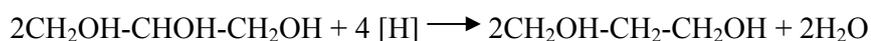
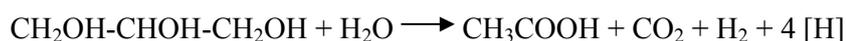
Desde meados de 1980 os estudos têm se voltado para as vias metabólicas e a cinética enzimática para a produção do 1,3-propanodiol. Esses estudos têm sido facilitados pelo avanço da bioquímica e tem contribuído muito na compreensão da via metabólica para a produção do 1,3-propanodiol. A absorção do glicerol envolve dois caminhos paralelos, a redução e a oxidação. O caminho da redução é realizado em duas etapas enzimáticas, resultando no 1,3-propanodiol (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

Outra possível via metabólica do glicerol corresponde a sua oxidação e consequente formação da dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase (GDH). Em seguida, a dihidroxiacetona é fosforilada a 3-F-dihidroxiacetona pela enzima dihidroxiacetona quinase (DHAK) dependente de ATP (CELINSKA, 2010). A 3-F-dihidroxiacetona é considerada uma importante molécula intermediária para a gliconeogênese (síntese de hexoses), assim como para a obtenção de numerosos compostos através da via oxidativa, incluindo, ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, etanol e outros compostos de interesse comercial (Figura 3) (FORAGE & LIN, 1982; MOAT, FOSTER & SPECTOR, 2002; CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011b).

Levando-se em consideração os micro-organismos, cada um produz de maneira majoritária determinados metabólitos. Ácido butírico e ácido acético são obtidos preferencialmente pelo *Clostridium butyricum* (HIMMI, BORIES & BARBIRATO, 1999); butanol é obtido pelo *C. pasteurianum* (LUERS *et al.*, 1997); enquanto que etanol, ácido láctico, ácido succínico e 2,3-butanodiol são obtidos por *Enterobacteria* (ZENG & BIEBL, 2002).

Do ponto de vista químico a conversão microbiológica do 1,3-propanodiol é desproporcional. Parte do glicerol é desidratado e transformado em 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA) e em seguida ocorre a hidrogenação a 1,3-propanodiol pelo NADH (Figura 3). Outra parte é convertida em dihidroxiacetona (DHA), transformada em 3-F-dihidroxiacetona e posteriormente em piruvato, o qual gera os vários metabólitos e NADH (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011b). As moléculas de NADH geradas ao longo do metabolismo que não foram transferidas a um aceptor de elétrons, são oxidadas na primeira etapa do metabolismo levando a produção do 1,3-propanodiol (Figura 3) (DECKWER, 1995).

O rendimento do 1,3-propanodiol depende da combinação e estequiometria das vias oxidativa e redutora. Tem-se demonstrado que a combinação da geração de 1,3-propanodiol com ácido acético como único subproduto da elaboração da via oxidativa resulta no rendimento máximo de 0,72 mol de 1,3-propanodiol produzido por mol de glicerol consumido (ZENG, 1996). Para esta combinação, as reações de fermentação podem ser representadas como:



O rendimento do 1,3-propanodiol nessa reação é de 67 % (mol/mol). Considerando-se a formação de biomassa como a máxima teórica, o rendimento reduz para 64 % (PINTO, 2009). Em cada reação, inicialmente com três moléculas de glicerol, uma é usada para a produção do ácido acético e durante a reação duas moléculas de NADH são formadas. Essas duas moléculas de NADH são utilizadas na produção de 1,3-propanodiol. Isso só é válido se não considerarmos a formação de biomassa (GÜNZEL, YONSEL & DECKWER, 1991).

Geralmente pode-se considerar que a maior disponibilidade de NADH é para a produção de 1,3-propanodiol. A função fisiológica da formação do 1,3-propanodiol é regenerar os equivalentes redutores que são liberados durante a formação da dihidroxiacetona (DHA) e durante a oxidação adicional do 3-F-dihidroxiacetona (ZHU, LAWMAN & CAMERON, 2002).

Sob condições de limitação de glicerol, o hidrogênio produzido é encontrado em maior quantidade que o máximo que pode ser gerado a partir da conversão do piruvato a acetil-CoA. No entanto, em condições onde o glicerol está em excesso, a formação de hidrogênio é significativamente reduzida e um excedente de NADH é gerado para a formação de 1,3-propanodiol. Portanto, o aumento da produtividade de 1,3-propanodiol está relacionado com o decréscimo de produtividade de hidrogênio (ABBAD-ANDALOUSSI *et al.*, 1996a; BIEBL *et al.*, 1999). Essas condições indicam a existência de enzimas produtoras de 1,3-propanodiol que transferem os equivalentes redutores do NADH para o hidrogênio e 1,3-propanodiol (Figura 3) (DECKWER, 1995). Outros estudos mostram que a elevada concentração inicial de glicerol também impede o crescimento normal das bactérias e diminui a eficiência da biossíntese do 1,3-propanodiol. Concentração de glicerol inicial de 20 g/L foi determinada como ótima em alguns estudos (COLIN, BORIES & MOULIN, 2000; BIEBL, 2001; RINGEL *et al.*, 2012).

A fim de evitar os problemas que surgem a partir de concentrações elevadas de glicerol, culturas em batelada alimentada são empregadas por muitos autores (SAINT-AMANS *et al.*, 1994; REIMANN *et al.*, 1998; HIRSCHMANN *et al.*, 2005; WILKENS *et al.*, 2012). Este método permite a utilização de quantidades elevadas de glicerol (levando a altas concentrações finais de 1,3-propanodiol) e permite a redução de tensões resultantes da alta osmolalidade dos meios de produção e o efeito inibitório.

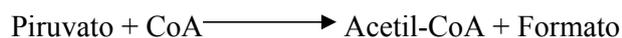
A formação de 1,3-propanodiol é favorecida pela grande quantidade de glicerol desidratase, o qual também contribui para o letal acúmulo de 3-hidroxiacetaldeído (3-HPA), sendo este um intermediário tóxico para a célula (SLININGER & BOTHAST, 1985). Para minimizar esse problema de intoxicação da célula, foi adotado por Zheng *et al.* (2007) a estratégia de dois estágios de batelada alimentada. Nesse trabalho, com uma cultura de *Klebsiella pneumoniae*, a batelada foi conduzida com uma concentração inicial de glicerol de 40 g/L e com agitação de 250 rpm. Posteriormente a cultura alimentada foi conduzida em alta

agitação (300 rpm), o qual resultou em alta produtividade (3,08 g/L.h) e alta concentração de 1,3-propanodiol (74,07 g/L), juntamente com a desintoxicação do 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA). O uso da agitação funcionou como catalizador para a reação global, diminuindo o tempo do intermediário.

Em processos fermentativos anaeróbicos típicos, o hidrogênio é produzido pela ação de hidrogenases durante a fase de crescimento exponencial da maioria dos micro-organismos como meio de eliminar o excesso de elétrons gerados durante a degradação de um substrato orgânico, quando o piruvato é formado (HALLENBECK & BENEMANN, 2002). Quando a população atinge o estado estacionário, inicia-se a produção de solventes e cessam as reações de produção de ácidos e hidrogênio (KHANAL *et al.*, 2004).

A degradação do piruvato é catalisada por um dos dois sistemas de enzimas a seguir:

1. Piruvato Formato Lípase (PFL):



2. Piruvato Ferredoxina Redutase (PFOR):



Em ambos os sistemas biológicos o piruvato gerado é usado, na ausência de oxigênio, para produzir acetil-CoA e/ou formar formiato ou ferredoxina reduzida (Fd_{red}) a partir da qual o hidrogênio pode ser produzido. O rendimento global de hidrogênio nesses organismos é relativamente baixo e é produzido de um a dois moles de hidrogênio por mol de piruvato consumido. Isso ocorre naturalmente na fermentação, que tem sido otimizada com o passar do tempo e descoberta de novas tecnologias para produção de biomassa com pouca produção de hidrogênio. Desta forma, o piruvato é usado nos dois casos para produzir ATP e ácido acético, o qual é excretado da célula. Em alguns organismos o hidrogênio produzido é reduzido pelo reciclo de hidrogênio devido à presença de hidrogenases reversas, a qual consome esse hidrogênio produzido (HALLENBECK & BENEMANN, 2002).

2.5. Produção do 1,3-propanodiol por via fermentativa

A Tabela 1 apresenta um resumo de alguns resultados de produção biotecnológica de 1,3-propanodiol, para diferentes micro-organismos, encontrados na literatura.

Tabela 1 – Concentração final de 1,3-propanodiol, rendimento (Y_{PD}) e produtividade volumétrica (Q_{PD}) de diferentes linhagens e mutantes em culturas de batelada e batelada alimentada (BIEBL *et al.*, 1999).

Micro-organismo	Linhagem	Fermentação	1,3-PD (g L ⁻¹)	$Y_{1,3-PD}$ (mol/mol)	$Q_{1,3-PD}$ (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referência
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 15380	Batelada	57,7	0,56	2,4	TAG (1990)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 25955	Batelada alimentada	58,1	0,44	1,0	HELD (1996)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 25955	Batelada alimentada	73,3	0,48	1,5	HELD (1996)
<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 5431	Batelada	56,0	0,62	1,9	BIEBL <i>et al.</i> (1992)
<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 5431	Batelada alimentada	58,0	0,68	2,7	GUNZEL <i>et al.</i> (1991)
<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 5431	Batelada alimentada	57,0	0,64	2,8	REIMANN & BIEBL (1996)
<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 5431	Batelada alimentada	70,3	0,68	1,5	ABBAD-ANDALOUSSI <i>et al.</i> (1995)
<i>Clostridium butyricum</i>	Mutante 2/2	Batelada alimentada	70,5	0,66	0,9	REIMANN & BIEBL (1996)
<i>Clostridium butyricum</i>	VPI 3266	Batelada	35,0	0,65	0,6	SAINT-AMANS <i>et al.</i> (1994)
<i>Clostridium butyricum</i>	VPI 3266	Batelada alimentada	65,0	0,69	1,0	SAINT-AMANS <i>et al.</i> (1994)
<i>Clostridium butyricum</i>	E5	Batelada alimentada	65,6	0,65	1,2	PETITDEMANGE <i>et al.</i> (1995)

Observa-se pela Tabela 1 que o rendimento por substrato é mais baixo para o gênero *Klebsiella*. Isso se dá devido à formação de subprodutos, como ácido lático e etanol, que não gera quase nenhum equivalente redutor para a formação do 1,3-propanodiol. Entre as linhagens da *Klebsiella*, a ATCC 15380 exibiu a maior taxa de fermentação. A linhagem *Clostridium butyricum* DSM 5431 foi a que cresceu mais rapidamente. A alta concentração de 1,3-propanodiol alcançada por outras linhagens foi obtida devido a um maior tempo de fermentação (SAINT-AMANS *et al.*, 1994; PETITDEMANGE *et al.*, 1995).

Como indicado pela Tabela 1, grande parte dos estudos encontrados na literatura utilizam bactérias do gênero *Clostridium* e *Klebsiella*. Seguindo isso, Zeng *et al.* (1994) propôs modelos matemáticos que descrevem o crescimento do *C. butyricum* e da *K. pneumoniae* em condições de inibição pelo substrato e/ou produto. As concentrações críticas

que conduzem a ausência de crescimento de micro-organismos foram: 0,35 g/L de ácido acético; 10,1 g/L de ácido butírico; 16,6 g/L de etanol; 71,4 g/L de 1,3-propanodiol; 187,6 g/L de glicerol. A Tabela 1 mostra que as concentrações de 1,3-propanodiol obtidas em culturas de batelada e batelada alimentada são similares para ambas as bactérias, confirmando a validade do modelo de crescimento comum para as duas espécies de bactérias.

2.5.1. Inibição

Condições de inibição são estudadas largamente por serem um dos principais fatores que influenciam nos resultados da fermentação. Além de Zeng *et al.* (1994), Nicolaou, Gaida & Papoutsakis (2010) também estudaram a toxicidade dos ácidos acético e butírico em bactérias do gênero *Clostridium*. A ação prejudicial de ácidos fracos resulta não só de um aumento da concentração de íons de hidrogênio em torno das células, mas também na penetração destes ácidos no interior da célula e a sua dissociação intracelular. Esses íons de hidrogênio têm de ser imediatamente removidos da célula por meio de bombas de prótons, o que requer grandes quantidades de energia.

Nessa mesma linha de estudos, Colin *et al.* (2001) relataram resultados confirmando a influência da razão de produção de acetato e butirato no rendimento do 1,3-propanodiol em cultura em batelada do *Clostridium butyricum* suplementado com qualquer um destes ácidos. Quando o butirato foi adicionado ao meio, a produção deste foi reduzida e o rendimento de 1,3-propanodiol melhorado. Estudos semelhantes foram feitos por Heydrickx *et al.* (1991) para o *Clostridium butyricum* e o *Clostridium pasteurianum*. No *Clostridium butyricum* a suplementação com acetato levou a um acréscimo na produção de butirato e hidrogênio, e decréscimo do rendimento de 1,3-propanodiol.

Além da inibição provocada pelo substrato e pelos produtos, é importante investigar também os possíveis efeitos inibitórios das impurezas que são encontrados na glicerina bruta. Este fato foi estudado por Chatzifragkou *et al.* (2010), que analisaram o impacto de sais (NaCl, K₂HPO₄, Na₂HPO₄), ácidos graxos (oléico, esteárico) e metanol (presentes na glicerina bruta) no crescimento e produção de 1,3-propanodiol pelo *C. butyricum* VP1718.

Como esse processo de inibição afeta bastante a fermentação, estudos são feitos para encontrar formas de evita-la. Um das formas é executar a fermentação continuamente. Essa

fermentação contínua elimina a inibição por parte do produto gerado. (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012). Abbad-Andaloussi *et al.* (1996a) apresentaram um dos primeiros estudos com fermentação contínua para entender a regulação da bioconversão do glicerol usando o *Clostridium butyricum* DSM5431.

2.5.2. Metabolismo

Além da inibição, outro ponto bastante estudado é a interferência de componentes no metabolismo do micro-organismo. Abbad-Andaloussi *et al.* (1998) estudaram o efeito complementar da glicose no metabolismo do glicerol na fermentação do *C. butyricum* DSM 5431. Tag (1990) obteve altas concentrações de 1,3-propanodiol na fermentação contínua da *K. pneumoniae* sob variação do fluxo de entrada de glicerol.

Lin *et al.* (2005) investigaram o efeito do fumarato, outro aceptor de elétrons para a respiração, na produção do 1,3-propanodiol. Verificou-se que com 5mM de fumarato adicionado, a taxa específica de consumo do glicerol e a produtividade do 1,3-propanodiol aumentaram em 34 e 36 % respectivamente. As possíveis reações identificadas pelos autores foram: (i) a adição do fumarato pode acelerar o fluxo metabólico da produção de 1,3-propanodiol aumentando a atividade das enzimas glicerol desidrogenase (GDH), glicerol desidratase (GDHt) e 1,3-propanodiol oxidoreductase (PDOR); (ii) a razão $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ pode ser diminuída pela adição do fumarato, de modo que aumente a conversão de 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA) em 1,3-propanodiol.

Em outro estudo, o papel do metabolismo do piruvato na regulação de equivalentes reduzidos da bioconversão de glicerol pela *K. pneumoniae* DSM2026 foi investigado através de um processo contínuo. Esse estudo determinou o envolvimento da piruvato desidrogenase (PDH) e a ausência da piruvato ferredoxina oxidoreductase na fermentação do 1,3-propanodiol por meio de ensaios enzimáticos (MENZEL, ZENG & DECKWER, 1997a).

Posteriormente Menzel, Zeng e Deckwer (1997b) também investigaram o efeito da concentração de entrada de glicerol e da taxa de diluição (D) em um cultura contínua de *K. pneumoniae* DSM2026. O estudo mostrou que a produção de 1,3-propanodiol pela *K. pneumoniae* era uma função de D, uma vez que diminui com o aumento deste. A

concentração elevada de 35,2 - 48,5 g/L de 1,3-propanodiol com uma produtividade entre 4,9 e 8,8 g/L.h puderam ser obtidos com um D variando de 0,1 h⁻¹ a 0,25 h⁻¹.

2.5.3. Tipos de processo

Fermentação em batelada é simples e geralmente é utilizada em investigação preliminar. Himmi, Bories e Barbirato (1999) realizaram fermentações em batelada utilizando glicerol PA e glicerina bruta como fonte de carbono. Mostraram que 129 g/L de glicerol PA e 121 g/L de glicerina bruta foram convertidos em 67 g/L e 65 g/L de 1,3-propanodiol, respectivamente.

González-Pajuelo *et al.* (2006) avaliaram a capacidade de produção de 1,3-propanodiol pelo *Clostridium butyricum* VPI 3266 em cultura contínua. Esta foi capaz de produzir 30g/L de 1,3-propanodiol utilizando meio sintético e 60 g/L de glicerina bruta, obtendo um valor bem próximo ao teórico esperado, alcançando 0,58 mol/mol de rendimento com um consumo de 41 % da glicerina bruta.

Em outro trabalho, González-Pajuelo *et al.* (2005) conseguiram a produção de até 84 g/L com uma combinação de linhagens de *Clostridium acetobutylicum* em batelada alimentada num processo otimizado, o que resultou numa produção bastante alta se comparada as demais produções.

Saint-Amans *et al.* (1994) mostraram que a relação inversa entre a concentração de substrato inicial elevada e a taxa de crescimento do micro-organismo demonstra que o processo de batelada alimentada poderia ser usada para atingir concentrações elevadas e/ou alta produtividade de 1,3-propanodiol.

Ji *et al.* (2009) também estudaram largamente o processo contínuo. Desenvolveram e analisaram três diferentes estratégias de alimentação e de controle de pH para alcançar a maior produção de 1,3-propanodiol utilizando a *K. pneumoniae* ME-308. As duas primeiras tentativas de alimentação de glicerol e NH₃ em duas linhas separadas e em seguida em conjunto, como uma mistura, não alcançaram resultados benéficos, pela limitação ou inibição do glicerol ou por uma concentração relativamente elevada de 2,3-butanodiol (pH 6,3) ou de lactato (pH 7,3). Finalmente, o terceiro método de batelada alimentada alcançou um valor de pH oscilando entre 6,3 e 7,3 através da alimentação periódica de uma mistura de glicerol e

NH₃ junto com 30 % de H₂SO₄, limitado a formação de subprodutos, fornecendo uma concentração elevada de 70 g/L de 1,3-propanodiol.

Ainda na linha de processos contínuos, Papanikolaou *et al.* (2000) realizaram uma fermentação contínua em dois estágios com uma linhagem recentemente isolada de *C. butyricum*, a F2b, utilizando glicerina bruta (pureza de 65 % m/m). Esta estratégia de cultivo utilizou uma taxa de diluição elevada no primeiro fermentador a fim de aumentar a produtividade volumétrica de 1,3-propanodiol e uma menor taxa de diluição na segunda fase para obter uma alta concentração de produto. Os resultados apresentaram uma elevada produtividade de 7,2 g/L.h, uma quantidade significativa (31-45 g/L) de glicerina não utilizada no caldo de fermentação do primeiro fermentador e uma concentração inferior de biomassa no segundo (em comparação com o primeiro), independentemente da taxa de diluição. Isto foi atribuído à autólise bacteriana no segundo estágio. A produtividade global de 3,4 g/L.h foi obtida empregando este método.

Wilkens *et al.* (2012) obtiveram ótimos resultados trabalhando num processo de batelada alimentada, onde a fonte de carbono era glicerina bruta (55 % de glicerol) ou glicerol puro na concentração de 25 g/L para o fermentador de 1 L e 20 g/L para o fermentador de 200 L (para a glicerina bruta, essas são as concentrações finais de glicerol, considerando os 55 % de concentração). O micro-organismo utilizado foi o *Clostridium butyricum* AKR102a. Eles alcançaram as seguintes produções máximas: 93,7 g/L na escala de 1 L com glicerol puro em 28 horas de fermentação; 76,2 g/L na escala de 1 L com glicerina bruta em 32,5 horas de fermentação; 61,5 g/L na escala de 200 L com glicerina bruta em 30 horas de fermentação (na escala de 200 L, só a glicerina bruta foi utilizada). Esses resultados mostram que a produção em larga-escala foi bastante parecida com a produção em pequena escala. Somados aos rendimentos obtidos, esses são os maiores resultados obtidos em produção natural encontrados até o momento.

2.5.4. Glicerina bruta

Cárdenas *et al.* (2006) mostraram a capacidade de produção de 1,3-propanodiol por uma cultura mista constituída por uma linhagem de *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) e duas linhagens de *Clostridium butyricum* (DSM 2478 e DSM 523), utilizando dois meios de fermentação distintos, um com o glicerol PA e o outro com a glicerina bruta. O rendimento

molar em 1,3-propanodiol para o meio contendo a glicerina bruta foi 0,204 mol/mol de glicerol consumido, e o meio contendo o glicerol PA foi de 0,232 mol/mol de glicerol consumido, mostrando resultados satisfatórios para a produção de 1,3-propanodiol a partir da glicerina bruta sem purificação, proveniente da produção do biodiesel.

Hirschmann *et al.* (1995) estudaram a produção do 1,3-propanodiol por uma linhagem isolada de *Clostridium butyricum* IK124, que é altamente tolerante ao substrato e ao produto, utilizando baixas concentrações de substrato. Uma alta concentração final de 1,3-propanodiol de 87 g/L com uma produtividade de 1,9 g/L.h foi alcançada com glicerol PA. Além disso, a utilização da glicerina bruta também apresentou uma concentração de 1,3-propanodiol e produtividade elevadas, sendo 80,1 g/L e 1,8 g/L.h respectivamente.

2.5.5. Aeração e micro-aeração

Apesar da formação do 1,3-propanodiol ocorrer por fermentação anaeróbia, sob condições de micro aeração ou baixa aeração, verificou-se que o 1,3-propanodiol pode ser obtido pela *Klebsiella pneumoniae* (WANG, XIU & FAN, 2001; HUANG, GONG & TSAO, 2002; CHENG & CHEN, 2007, MA *et al.*, 2009).

Chen *et al.* (2003) relataram que a produção micro-aeróbica de 1,3-propanodiol pela *Klebsiella pneumoniae* teve uma melhora da produtividade de 0,8 para 1,57 g/L.h, alterando a fermentação de micro-organismos anaeróbicos para micro-organismos micro-aeróbicos. Em outro trabalho Cheng *et al.* (2004) aumentaram a produção de 1,3-propanodiol pela *Klebsiella pneumoniae* para 70 g/L usando a estratégia anaeróbia-aeróbica. Estes estudos indicaram que a presença de oxigênio como um acceptor de elétrons poderia melhorar a produção de 1,3-propanodiol.

Hao *et al.* (2008) relataram a produção de 1,3-propanodiol sob condições aeróbicas por 8 diferentes cepas de *Citrobacter* e *Klebsiella*. O processo de fermentação aeróbica pode não apenas reduzir o custo de produção, mas também minimizar o acúmulo de 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA). A fermentação do glicerol geralmente resulta em uma baixa concentração do produto, isso é muitas vezes causado pela inibição devido ao produto, substrato, ou ambos. Em um dos casos, o crescimento de *Clostridium butyricum* foi totalmente inibido em 788 mM de 1,3-propanodiol e 1,053 mM de glicerol.

2.5.6. Outras estratégias

Günzel, Yonsel e Deckwer (1991) estudaram a produção de 1,3-propanodiol pelo *Clostridium butyricum* DSM 5431 em reatores do tipo tanque agitado e *airlift* em escalas de 2 m³ e 1,2 m³ respectivamente. O tipo de reator e a escala do mesmo não tiveram nenhum efeito significativo no processo. A inibição inicial pela concentração de substrato mostrou que a operação em batelada alimentada apresenta resultados melhores para esse tipo de linhagem.

Chatzifragkou *et al.* (2011a) realizaram um experimento em batelada alimentada sem esterilização do meio de cultura utilizando o *Clostridium butyricum* VPI1718 e glicerina bruta em alta concentração obtendo uma produção máxima de 67,9 g/L após 87 horas de fermentação.

Em outro estudo, Chatzifragkou *et al.* (2011b) realizaram experimentos com diferentes estratégias de anaerobiose e em biorreatores de tamanhos diferentes para analisar a influência dessas variáveis na fermentação dessa mesma linhagem. Foram observados resultados diferentes de produção de 1,3-propanodiol e formação de ácidos considerando o caso de borbulhamento contínuo de nitrogênio durante a batelada e o caso de anaerobiose autogerada. Na condição de borbulhamento, 70,8 g/L de 1,3-propanodiol foi produzida. Esta concentração diminuiu significativamente para 30,5 g/L utilizando a segunda estratégia.

Em um recente estudo, Mendes *et al.* (2011) relataram os valores mais elevados obtidos até agora para a produção de 1,3-propanodiol usando um processo em duas etapas. Conversão de açúcares (glucose) ou melaço de cana de açúcar em glicerol pela levedura *S. cerevisiae* (tolerante ao substrato) seguida por sua biotransformação em 1,3-propanodiol pela bactéria *Clostridium acetobutylicum* DG1 (pSPD5) no mesmo biorreator. Com a concentração inicial de glucose de 103 g/L, uma concentração final de 1,3-propanodiol de 25,5 g/L e uma produtividade de 0,16 g/L.h foram obtidas. Os pesquisadores também destacaram a utilização potencial de melaço para a conversão de glicerol por leveduras, o que forneceu resultados comparáveis a glucose, exceto a inibição do crescimento do *Clostridium* no segundo estágio mediante a utilização de concentrações elevadas de açúcar (77,8 e 101,3 g/L) na primeira etapa.

Moon *et al.* (2011) apresentaram resultados de otimização de meio de cultura baseados em experimentos estatísticos. O objetivo era determinar as concentrações de componentes do meio que favoreciam a produção de butanol e 1,3-propanodiol em fermentações com *Clostridium pasteurianum*. A partir de uma série de componentes, sulfatos de ferro, de amônio e extrato de levedura foram os que tiveram um impacto mais significativo sobre esses produtos na fermentação.

Todos os exemplos acima citados mostram que para se obter, então, uma melhoria na produção de 1,3-propanodiol através da fermentação do glicerol, deve ser feita uma boa seleção da linhagem a ser utilizada e consequentes modificações no meio de cultura e nas condições de cultivo (ZENG, 1996; CLOMBURG & GONZALEZ, 2013).

2.6. *Clostridium acetobutylicum* e sua via de fermentação do glicerol

As primeiras informações sobre as bactérias do gênero *Clostridium* apareceram em 430-370 AC. Em seu livro, *Epidemics III*, Hipócrates descreveu uma doença chamada gangrena gasosa, causada pela *Costridum hystoliticum* (MAYR, 1969). Mais tarde, em 1824, em *Essays on the Anatomy and Philosophy of Expression*, Charles Bell descreveu outra doença, o tétano, causada por *Clostridium* spp. No entanto, o reconhecimento de clostrídios como bactérias começou com o trabalho pioneiro de Louis Pasteur (DÜRRE, 1998). Em 1861, ele descreveu um mmicro-organismo capaz de crescer sem ar, isto foi uma revolução na época. Os estudos de Pasteur sugeriram que ele trabalhou com duas espécies de *Clostridium*, *Cl. butyricum* e *Cl. acetobutylicum*. No entanto, ele pensou que estava trabalhando com uma cultura pura e, portanto, chamou-a de *Vibrion butyrique*. Na literatura taxonômica atual, o cientista polonês, Adam Prazmowski, é normalmente creditado por introduzir o nome *Cl. butyricum* para o organismo acima mencionado. Prazmowski, em sua dissertação de doutorado, deu uma descrição detalhada da bactéria e a forma de isolamento informando a sua capacidade de formar esporos (DÜRRE, 1998).

As bactérias do gênero *Clostridium* são frequentemente descritas como sendo ameaças biológicas e inimigas da humanidade. É verdade que, dentro de mais de 150 espécies validadas de clostrídios descritas nesse gênero heterogêneo, há alguns que produzem as mais potentes toxinas naturais conhecidas na Terra. Por outro lado, na literatura é possível

encontrar muitos estudos sobre a utilização do *Clostridium*, na produção de 1,3-propanodiol e outros compostos de interesse comercial (DÜRRE, 1998).

Clostridium é uma espécie de bactéria que tem cerca de 2.700 milhões de anos. Existe desde antes do aparecimento de oxigênio na terra. Por isso, é um micro-organismo anaeróbio estrito e, portanto, não resistente à presença de oxigênio (PINTO, 2009; DROZDYNSKA, LEJA & CZACZYK, 2011). Essas bactérias são conhecidas também como "Organismo Weizmann", em homenagem a Chaim Weizmann, que ajudou a descobrir como culturas de *Clostridium acetobutylicum* podem produzir acetona, butanol e etanol em processos industriais a partir de amido (WEIZMANN & ROSENFELD, 1937).

Micro-organismos desse gênero são bactérias gram-positivas, heterotróficas e móveis, que foram agrupadas no gênero *Clostridium* pelas suas similaridades morfológicas e seus ensaios de coloração. São caracterizadas por terem um crescimento lento e uma capacidade de formar esporos em resposta a condições desfavoráveis do meio ambiente, ou quando submetidas a um aumento de temperatura ou à falta de nutrientes. A maioria delas são mesofílicas, embora algumas sejam psicotróficas e outras sejam termofílicas (GIRBAL *et al.*, 1995; GERDING, 2009; PINTO, 2009; SIEGRIST, 2010; SONGER, 2010).

Estas bactérias podem ser encontradas no solo, sedimentos aquáticos e no trato gastrointestinal de animais e do homem (que contém nutrientes orgânicos), onde podem sobreviver e se multiplicar (PINTO, 2009; DROZDYNSKA, LEJA & CZACZYK, 2011).

Quanto à morfologia é um bacilo com tamanho de 0,6 µm por 3 a 7 µm de comprimento (PELCZAR JR, CHAN & KRIEG, 1997). A Figura 4 mostra uma colônia de *Clostridium acetobutylicum* observada por microscopia ótica.

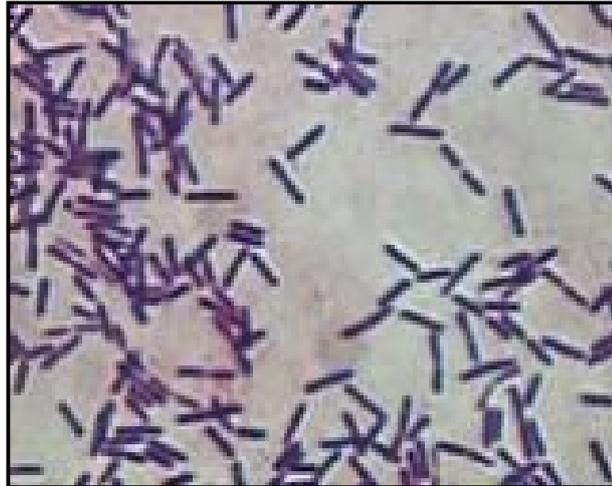


Figura 4 – Células de *Clostridium acetobutylicum* observadas por microscopia ótica
(Fonte: [http:// www.napier.ac.uk](http://www.napier.ac.uk), acesso em 2013).

Os clostrídios não patogênicos têm grandes aplicações industriais. Esse gênero de bactéria fermenta compostos orgânicos como carboidratos e excreta grande quantidade de CO₂ e H₂, assim como ácidos orgânicos (entre eles o butírico, láctico, acético e succínico), solventes (butanol, acetona e isopropanol) e o já mencionado 1,3-propanodiol (LEHNINGER, NELSON & COX, 2000; EZEJI, QURESHI & BLASCHEK, 2005; EZEJI, QURESHI & BLASCHEK, 2007; SKONIECZNY & YARGEAU, 2009; KOTHARI, TYAGI & PATHAK, 2010; NICOLAOU, GAIDA & PAPOUTSAKIS, 2010).

O complexo metabolismo do *Clostridium acetobutylicum*, assim como de outros micro-organismos, tem sido estudado em detalhes nas últimas décadas, e frequentemente mostra um padrão de fermentação com duas vias metabólicas (TERRACCIANO & KASHKET, 1986; GIRBAL & SOUCAILLE, 1994; GIRBAL *et al.*, 1995; GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2005). Após produzir ácido acético, ácido butírico e hidrogênio, durante a fase de crescimento exponencial, inicia-se a formação de solventes (etanol, acetona e butanol), a qual ocorre bem próxima à fase estacionária. O mecanismo no início da fase de formação de solventes atualmente tem sido foco de muitas pesquisas científicas e tem mostrado uma associação ao efeito do pH ácido (BOWLES & ELLEFSON, 1985; JONES & WOODS, 1986; TERRACCIANO & KASHKET, 1986; GIRBAL & SOUCAILLE, 1994; VASCONCELOS, GIRBAL & SOUCAILLE, 1994; GIRBAL *et al.*, 1995).

Durante a fermentação é gerado menos ATP e mais NADH do que o necessário para a biossíntese e o crescimento. A produção dos ácidos resulta da geração de ATP adicional necessária para a célula. Entretanto, somente uma parcela dos equivalentes redutores produzidos é consumida durante a produção dos ácidos. Estas bactérias têm a habilidade de produzir hidrogênio, que fornece à célula uma rota eficiente para a eliminação de prótons e de elétrons adicionais (JONES & WOODS, 1986). A hidrogenase é a enzima que permite usar prótons como receptores terminais de elétrons. A ferredoxina possui papel chave no transporte e na distribuição de elétrons na célula. Sob condições apropriadas, a ferredoxina reduzida é capaz de transferir elétrons para o ferro contido na hidrogenase, o que permite o uso dos prótons como um receptor final de elétrons, resultando na produção do hidrogênio molecular. Durante essa etapa a ferredoxina é reoxidada e o gás hidrogênio é liberado da célula. Outra enzima importante na distribuição de elétrons é a NADH ferredoxina redutase, que atua na oxidação ou na redução do NAD^+ pelo equilíbrio de elétrons entre NAD^+ e ferredoxina (Figura 5) (KUBIAK *et al.*, 2012).

Durante o metabolismo da produção de ácidos há um fluxo rápido de elétrons decorrente tanto da quebra do piruvato quanto da regeneração do NADH por meio da ferredoxina para produzir hidrogênio (Figura 5) (KUBIAK *et al.*, 2012).

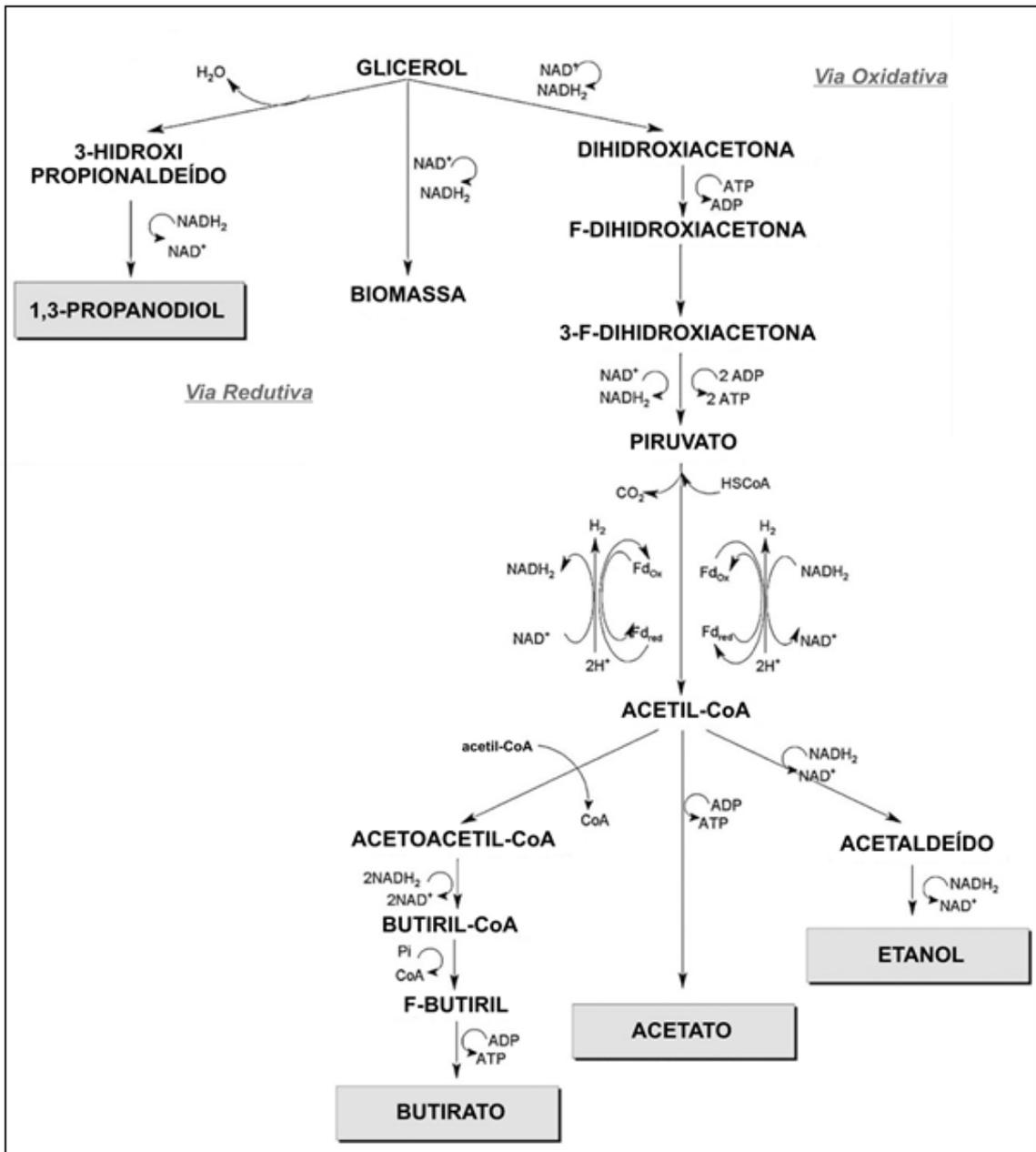


Figura 5 – Vias bioquímicas da fermentação do glicerol pelo *Clostridium butyricum* (KUBIAK *et al.*, 2012).

A conversão de piruvato em acetil-CoA é catalisada pelo complexo de piruvato desidrogenase. Esse complexo é um dispositivo altamente integrado, composto de três classes de enzimas (STRAYER, 1996). Outras denominações para essa enzima podem ser encontradas, como: piruvato oxidoreductase, piruvato sintase, piruvato ferredoxina oxidoreductase e pirúvico-ferredoxina oxidoreductase.

Além da conversão do piruvato para acetil-CoA, o *Clostridium acetobutylicum* pode também converter o piruvato em ácido láctico sob determinadas circunstâncias. A via do ácido láctico em circunstâncias normais parece ocorrer somente como alternativa para permitir que a geração da energia e a oxidação do NADH continuem quando os mecanismos para a eliminação dos prótons e elétrons pela geração de hidrogênio molecular são obstruídos. A produção de ácido láctico foi observada na diminuição da atividade da hidrogenase, por meio da inibição por monóxido de carbono ou da ausência de ferro, devido aos baixos níveis da ferredoxina e da hidrogenase (JONES & WOODS, 1986).

O fluxo de carbono a partir das ramificações do acetil-CoA conduz à formação dos ácidos e dos solventes, como mostra a Figura 5. Esses pontos de bifurcação ocorrem em três metabólitos intermediários: acetil-CoA, acetoacetil-CoA e butiril-CoA. Durante a fase de produção de ácidos, o ácido acético e o ácido butírico são produzidos a partir do acetil-CoA e butiril-CoA por meio de duas etapas análogas que resultam na produção de acetil-fosfato e butiril-fosfato, seguidas pela geração de ATP. A butiratoquinase do *Clostridium acetobutylicum* foi observada exibindo atividade reversível.

Além da tiolase, enzima que catalisa a condensação do acetil-CoA a acetoacetil-CoA, mais três enzimas estão envolvidas na via metabólica para a formação de butiril-CoA a partir do acetil-CoA, como 3-hidroxi-butilil-CoA deshidrogenase, crotonase e butiril-CoA deshidrogenase.

O início da produção de solventes envolve uma interrupção no fluxo de carbono nas vias de produção de ácidos para as vias de produção de solventes. Durante a produção de solventes, acetil-CoA e butiril-CoA atuam como intermediários para a produção de etanol e de butanol. Essas vias produzem o acetaldeído e o butiraldeído, respectivamente, como intermediários, e requerem duas deshidrogenases que atuam nas reduções necessárias para produzir etanol e butanol. A redução de butiril-CoA a butanol é mediada pelo butiraldeído deshidrogenase e pela butanol deshidrogenase (ANDERSCH, BAHL & GOTTSCHALK, 1983).

Em culturas em batelada o início e a manutenção da produção de solventes estão associados ao baixo pH extracelular e intracelular e a alta concentração de ácido butírico não dissociado (TERRACCIANO & KASHKET, 1986). Em cultura contínua, ATP e NADH

disponíveis revelam papel determinante na seletividade dos produtos. Altas concentrações de ATP relacionadas com a baixa demanda de ATP ou à alta eficiência de geração de ATP conduz para o aumento da produção de solventes.

2.7.Cinética Microbiana

Um aspecto importante a ser considerado neste trabalho é um estudo cinético do consumo do glicerol como substrato limitante para a produção de 1,3-propanodiol, sendo uma etapa indispensável no desenvolvimento do processo de fermentação, pois pode ser utilizado na otimização das condições de operação para a produção de um metabólito de interesse (SUN *et al.*, 2008).

A complexidade da descrição cinética que é requerida e apropriada depende das situações físicas e da aplicação pretendida. Não é possível a formulação de um modelo que inclua todas as características e detalhes celulares. O modelo deve ser formulado a partir de algumas aproximações (STREMEL, 2001).

Para Neto (1999), o estudo cinético de um determinado fenômeno ou processo, significa avaliar sua evolução com o tempo, através da quantificação de grandezas que definem adequadamente esta evolução. Para o caso de degradação de material orgânico, as grandezas medidas são: tempo, concentração do micro-organismo presente, concentração do substrato limitante e a concentração do produto de interesse.

Para formular os modelos cinéticos, a partir de dados experimentais, é necessário executar três etapas básicas. Inicialmente o tratamento dos dados experimentais, que é a correção ou transformação dos mesmos, buscando adequá-los a análise desejada. Em seguida, calcular as velocidades específicas de crescimento e de geração de produtos necessários para identificar o comportamento cinético da população microbiana, e por último a identificação dos fenômenos, nesta etapa busca-se definir os principais fenômenos que interferem no processo produtivo (BORZANI *et al.*, 2001).

Foresti *et al.* (1999) relataram que as velocidades devem ser expressas em termos matemáticos por modelos que representem com clareza a eficácia dos processos. Então, para definir as diferentes velocidades de reação que ocorrem em processos fermentativos em geral,

executa-se um cultivo em batelada (sistema fechado com uma carga inicial de micro-organismos inoculada numa quantidade limitada de nutrientes).

Num processo em batelada é possível, a partir de amostras retiradas ao longo do cultivo, visualizar os perfis de concentração de células (X), substrato (S) e de produto (P) e determinar as taxas de transformação (BASTOS, 2010). As inclinações das curvas descritas nos perfis definem as velocidades instantâneas de transformação, ou seja, crescimento celular (r_x), de consumo de substrato (r_s) e de formação de produto (r_p):

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (2)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

A concentração celular varia durante um processo descontínuo, aumentando na maioria dos casos, e as células trabalham como catalisadoras das reações microbianas, então, o aumento da concentração celular acarreta também na variação das taxas. Sendo assim, é mais correto analisar as velocidades instantâneas em relação à concentração celular (X) (BASTOS, 2010). Portanto, torna-se necessária a definição das velocidades específicas de crescimento celular (μ_x ou μ), consumo de substrato (μ_s) e de formação de produto (μ_p):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad (5)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (6)$$

Quando uma quantidade de micro-organismos é colocada num meio com concentração limitada de nutrientes, o crescimento passa por diferentes fases. Essas fases são mostradas na Figura 6.

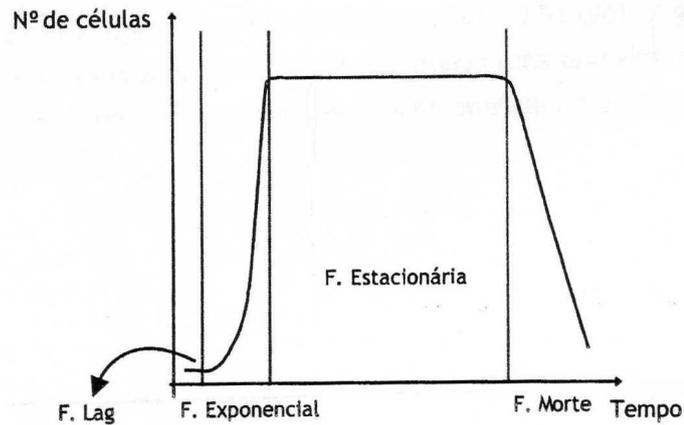


Figura 6 – Fases de crescimento celular (BASTOS, 2010).

Na Figura 6 tem-se a fase lag, conhecida também como fase de adaptação, em que nenhum crescimento aparente ocorre, uma vez que ocorre uma adaptação das células ao novo meio de cultivo; Tem-se a fase exponencial, também conhecida como fase logarítmica ou fase log, em que ocorre um aumento exponencial do número de células, atingindo-se a sua velocidade máxima; A fase estacionária, onde a população atinge seu máximo e constante crescimento; E a fase da morte, onde, devido ao acúmulo de metabólitos e limitação de nutrientes, eventualmente poderá ocorrer um declínio do número de células, característico dessa fase (BASTOS, 2010).

Ao final da fase de adaptação, a população de micro-organismos começa a multiplicar-se rapidamente, dobrando seu número em intervalos regulares de tempo. Assim, após N gerações, teremos uma quantidade de células (X) relacionada com a quantidade inicial ou inóculo (X_0) de $X = X_0 2^N$ (BASTOS, 2010). Então tem-se:

$$\mu = \left(\frac{1}{X}\right) \frac{dX}{dt} \rightarrow \mu \cdot dt = \frac{dX}{X} \rightarrow \mu = \frac{\ln(X/X_0)}{t-t_0} \quad (7)$$

Nessa última relação, μ é a velocidade específica de crescimento na fase exponencial, conhecida como máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), correspondente à máxima inclinação obtida na parte linear da curva, como ilustrado na Figura 7. O intervalo de tempo $t-t_0$ corresponde exatamente ao período da fase exponencial; X_0 seria a concentração

celular no início da fase log, enquanto X seria a concentração celular no final da fase log (BASTOS, 2010).

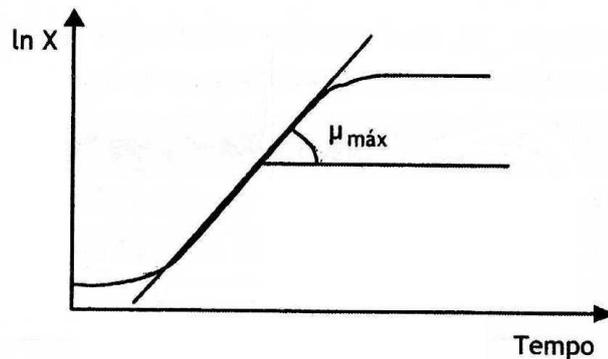


Figura 7 – Caracterização de $\mu_{\text{máx}}$ (BASTOS, 2010).

Outro parâmetro importante pode ser definido para a fase exponencial do crescimento, o tempo de geração (G), ou seja, o tempo que os micro-organismos levam para duplicar a sua biomassa. Voltando para a Equação 7, e substituindo X por $2X_0$, temos:

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln(2X_0/X_0)}{G} = \frac{\ln 2}{G} \rightarrow G = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (8)$$

O tempo de geração é importante na interpretação do crescimento celular, uma vez que dá uma ideia mais prática de quão rápido ocorre o crescimento do micro-organismo (BASTOS, 2010).

Pode-se ainda determinar a produtividade celular (P) que é a relação entre a variação da concentração celular pela variação do tempo de cultivo englobando todas as fases de crescimento (BORZANI *et al.*, 2001). Este valor é determinado pela Equação 9:

$$P = \frac{(X - X_0)}{(t - t_0)} \quad (9)$$

Muitas tentativas têm sido realizadas no sentido de se interpretar resultados experimentais com auxílio de modelos matemáticos visando, por um lado, colaborar na elucidação de mecanismos envolvidos no processo e, por outro lado, estabelecer um conjunto

de equações que possibilitem o adequado controle do sistema e sua otimização. O modelo cinético baseia-se sempre em hipóteses fundamentais, a partir das quais se procura deduzir expressões que relacionem as variáveis escolhidas no estudo experimental (BORZANI *et al.*, 2001).

2.8.Planejamento Experimental

Um dos problemas mais comuns num experimento é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre a resposta de interesse. O principal objetivo ao realizar os experimentos é descobrir a função que governa a maneira como o sistema opera essas variáveis de entrada gerando as respostas na saída. Ao conhecer essa função, pode-se entender melhor como o experimento ocorre, e então escolher as melhores condições de operação para otimizar o processo e até mesmo desenvolver produtos dentro das especificações (RODRIGUES & IEMMA, 2009; BARROS NETO, SCARMINO & BURNS, 2010).

No planejamento de qualquer experimento, o primeiro passo que se deve tomar é decidir quais são os fatores e as respostas de interesse. Os fatores são as variáveis que se pode controlar, sendo elas qualitativas, como o tipo de catalisador de uma reação, ou quantitativas, como a temperatura. As respostas são as variáveis de saída do sistema e que são afetadas (ou não) por modificações provocadas nos fatores. O planejamento dos experimentos vai depender do objetivo particular que se quer atingir. Objetivos diferentes precisarão de planejamentos diferentes (BARROS NETO, SCARMINO & BURNS, 2010).

Para executar um planejamento fatorial, inicialmente deve-se especificar os níveis em que cada fator deve ser estudado, isto é, os valores das variáveis usadas no experimento. Para fazer um planejamento fatorial completo, deve-se realizar experimentos em todas as possíveis combinações desses níveis. Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta, os níveis devem ser manipulados e a variação produzida na resposta deve ser observada. Então, os fatores devem aparecer em pelo menos dois níveis diferentes. Para k fatores, um planejamento completo de dois níveis exige a realização de 2^k experimentos, sendo chamado de planejamento fatorial 2^k (BARROS NETO, SCARMINO & BURNS, 2010).

Num planejamento fatorial, podemos aumentar a área estudada transformando-o em um planejamento em estrela aumentando a quantidade de experimentos. Para fazer o

planejamento fatorial 2^k em estrela, simplesmente acrescenta-se ao planejamento inicial um planejamento idêntico, porém girado de 45° em relação à orientação de partida (BARROS NETO, SCARMINO & BURNS, 2010).

Um das principais formas de apresentar os resultados obtidos com o planejamento fatorial é a superfície de resposta. A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX, HUNTER & HUNTER, 1978).

A metodologia de superfícies de respostas tem duas etapas distintas, a modelagem e o deslocamento, que são repetidas tantas vezes forem necessárias, com o objetivo de atingir a região ótima da superfície investigada. A modelagem é feita ajustando-se modelos simples a respostas obtidas no planejamento e o deslocamento se dá ao longo do caminho de máxima inclinação do modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (BARROS NETO, SCARMINO & BURNS, 2010).

Desenvolver produtos e processos através de procedimentos de tentativa e erro, conforme registros do início do século passado foram, de fato, importantes naquele momento. No entanto, a forte competitividade, a difusão da tecnologia, bem como a competência e a responsabilidade dos pesquisadores atuais inviabiliza tais procedimentos. Portanto, o planejamento consciente dos experimentos é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas. (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

3. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 no meio de cultura para produção de 1,3-propanodiol, utilizando o glicerol PA como fonte de carbono.

Como objetivos específicos, têm-se:

- Determinar em qual meio para manutenção e crescimento o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 apresentou melhores resultados;
- Estudar o crescimento celular e determinar os parâmetros cinéticos;
- Avaliar a influência do glicerol PA e do extrato de levedura no meio de cultura para fermentação do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, determinando o crescimento microbiano.

4. Materiais e Métodos

4.1.O micro-organismo e suas condições de armazenamento

O micro-organismo utilizado no trabalho foi o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259. Essa linhagem foi cedida pela coleção de micro-organismos UFPEDA do Departamento de Antibióticos da UFPE. Foi adquirido em tubos contendo meio RCM (Caldo Clostridial Reforçado) semissólido e uma camada de óleo mineral sobre este. Foi mantido em estufa a 37 °C até ser inoculado e/ou repicado.

4.2.Soluções utilizadas

As soluções utilizadas no experimento são as seguintes: Solução salina para diluição (Tabela 2), solução de elementos traços (Tabela 3) e solução de ferro (Tabela 4).

Tabela 2 – Composição da solução salina para diluição.

Solução A	
KH ₂ PO ₄	34,0 g
Água destilada	1000,0 mL
Solução B	
MgSO ₄ .7H ₂ O	50,0 g
Água destilada	1000,0 mL
Solução Salina	
Solução A	1,25 mL
Solução B	5,0 mL
Água destilada	1000,0 mL

Tabela 3 – Composição da solução de elementos traços.

Componentes	Concentração
ZnCl ₂	0,070 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,100 g/L
H ₃ BO ₃	0,060 g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,200 g/L
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,020 g/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,025 g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,035 g/L
HCl 37 %	0,900 mL/L

Tabela 4 – Composição da solução de ferro.

Componentes	Concentração
FeSO₄.7H₂O	5,0 g/L
HCl 37%	4,0 mL/L

4.3.Preparação dos meios – Uma abordagem geral

Os meios de cultura para manutenção e crescimento, pré-cultura, ensaios para fermentação e o meio de cultura para cinética foram preparados de acordo com o procedimento a seguir:

- Os nutrientes do meio de cultura foram pesados e diluídos em água destilada;
- Com o meio pronto, este foi insuflado com gás nitrogênio enquanto foi aquecido a T = 55 °C durante 20 minutos (Figura 8);
- O meio então foi transferido para tubos de penicilina, selados e lacrados, de acordo com a metodologia apresentada nos itens 4.4, 4.5, 4.6 e 4.9;
- Os tubos seguiram para a esterilização em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.



Figura 8 – Preparação de meio de cultura utilizando chapa aquecedora e gás nitrogênio.

4.4.Meio de cultura para manutenção e crescimento

O meio de cultura para manutenção e crescimento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 foi o Caldo Clostridial Reforçado – RCM (HIMEDIA) e o Meio de Tioglicolato Fluido (DIFCO). Ambos foram diluídos em água destilada e prosseguiu-se como descrito no item 4.3. Depois de preparados, 90 mL foram transferidos para tubos de penicilina de 100 mL.

Utilizando uma seringa (c/ agulha) estéril, o micro-organismo foi inoculado nos tubos de penicilina contendo os meios de cultura para manutenção e crescimento na proporção de 10 % v/v e cultivado a 35 °C.

4.5.Pré-cultura

Composição (GÜNZEL, YONSEL & DECKWER, 1991): K₂HPO₄ (3,4 g/L), KH₂PO₄ (1,3 g/L), (NH₄)₂SO₄ (2,0 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), CaCl₂.2H₂O (0,02 g/L), CaCO₃ (2,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L), glicerol (20 g/L), solução de elementos traços (Tabela 3) (1,0 mL/L) e solução de ferro (Tabela 4) (2,0 mL/L).

Após o crescimento celular proveniente da etapa anterior (24 horas de cultivo), foram utilizados 10 % v/v para inocular a pré-cultura. A pré-cultura também foi preparada de acordo com a metodologia mostrada no item 4.3, onde 90 mL foram transferidos para um tubo de penicilina de 100 mL.

4.6.Meio de cultura para fermentação e cinética

A concentração dos nutrientes do meio de cultura para fermentação e cinética é igual a concentração dos nutrientes da pré-cultura, com exceção de: K₂HPO₄ (1,0 g/L), KH₂PO₄ (0,5 g/L), (NH₄)₂SO₄ (1,0 g/L) e solução de ferro (1,0 mL/L).

O meio de cultura para a fermentação também segue a metodologia apresentada no item 4.3. Após preparado, 9 mL de meio foram transferidos para tubos de penicilina de 10 mL, onde a fermentação foi conduzida, acrescidos de 10 % v/v do inóculo crescido na pré-cultura por 24 horas. A temperatura do experimento foi de 35°C. Foram retiradas amostras para determinação de biomassa formada ao fim da fermentação (72 horas) (GÜNZEL, YONSEL & DECKWER, 1991; PAPANIKOLAU *et al.*, 2000; CÁRDENAS *et al.*, 2006).

4.7. Avaliação do crescimento microbiano – Biomassa

Para avaliar o crescimento do micro-organismo foi utilizada a técnica do peso seco, para a concentração da biomassa em g/L ser calculada (PELCZAR JR, CHAN & KRIEG, 1997). As amostras foram filtradas com o auxílio de um conjunto para filtração e membranas de 2 µm previamente taradas, utilizando água de diluição (Tabela 2) para lavagem.

4.8. Planejamento fatorial

Foi realizado um planejamento fatorial 2² estrela com ponto central. As variáveis independentes foram o glicerol e o extrato de levedura e a variável dependente foi o crescimento celular. Os níveis codificados e decodificados encontram-se na Tabela 5 e os ensaios executados no planejamento encontram-se na Tabela 6.

Tabela 5 – Variáveis e níveis do planejamento experimental 2² estrela com ponto central.

Variáveis Independentes	Níveis				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$\sqrt{2}$
Glicerol (g/L)	15,86	20	30	40	44,14
Extrato de Levedura (g/L)	0,59	1,0	2,0	3,0	3,41

Tabela 6 – Ensaios do planejamento experimental 2² estrela com ponto central.

Ensaio	Glicerol	Extrato de Levedura
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	$-\sqrt{2}$	0
6	$\sqrt{2}$	0
7	0	$-\sqrt{2}$
8	0	$\sqrt{2}$
9	0	0
10	0	0

4.9. Cinética microbiana

O experimento cinético foi executado de forma semelhante à fermentação do planejamento fatorial. O micro-organismo cultivado em meio de cultura para manutenção e crescimento foi inoculado na pré-cultura (10% v/v) e incubado a 35 °C por 24 horas. Após as 24 horas, o micro-organismo adaptado na pré-cultura foi inoculado no meio de fermentação para realização da cinética. A cinética foi conduzida em um frasco biorreator de 500 mL, sem controle de pH, temperatura e agitação, contendo 300 mL de meio de cultura (preparado de acordo com o item 4.3) que foi inoculado com 34 mL de inóculo vindo da pré-cultura (correspondendo a 10 % v/v). Em intervalos de 1 hora, amostras de 10 mL foram retiradas do frasco e filtradas, utilizando membranas previamente taradas. Antes de cada filtração, o frasco foi levemente agitado para homogeneizar o meio e a retirada das amostras foi realizada de maneira estéril, com o auxílio da chama do bico de Bunsen. A filtração foi executada como descrito no item 4.7. O esquema do biorreator encontra-se na Figura 9.

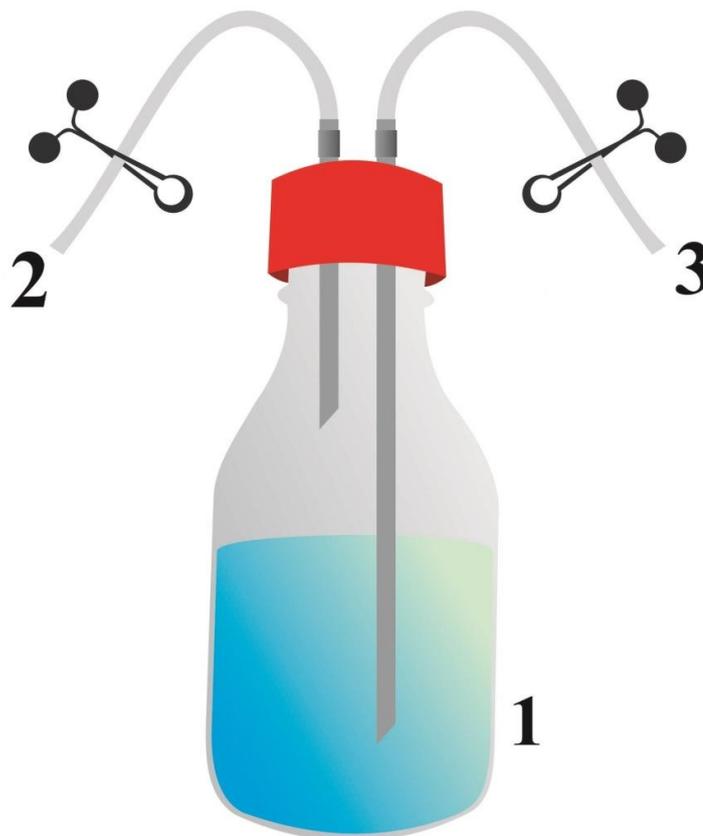


Figura 9 – Fermentador em batelada.

O fermentador é composto por três partes principais: o frasco de vidro que contém o meio de cultura acrescido do inóculo (1); tubo usado para inoculação do micro-organismo (2); tubo para retiradas das amostras (3). Ambos os tubos ficaram fechados com a ajuda de pinças de metal para evitar entrada de oxigênio e contaminação do meio de cultura.

5. Resultados e Discussões

5.1. Meio de cultura ideal para manutenção do micro-organismo

Inicialmente, foi observado visualmente o crescimento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 em RCM e em Tioglicolato Fluido para avaliar em qual dos dois, o micro-organismo se adaptou de maneira mais eficaz. A Figura 10 mostra os frascos antes de serem inoculados e a Figura 11 mostra esses mesmos frascos inoculados com o micro-organismo após 24 h de cultivo a 35 °C.

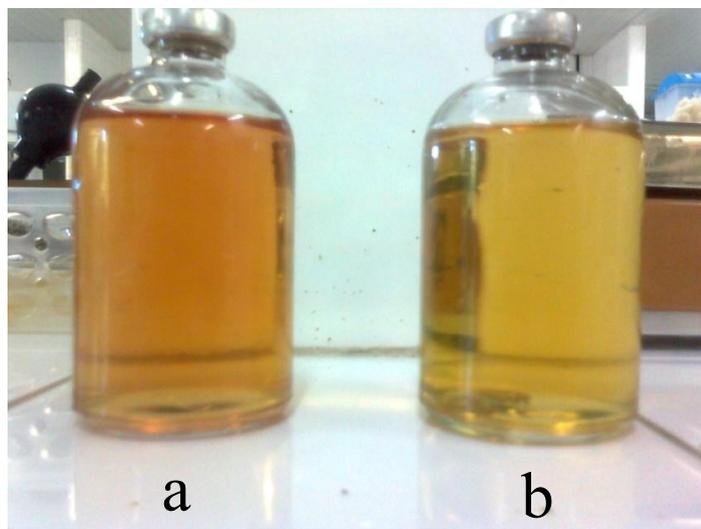


Figura 10 – Tubos de penicilina contendo os meios de cultura RCM (a) e Tioglicolato Fluido (b) antes da inoculação do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259.

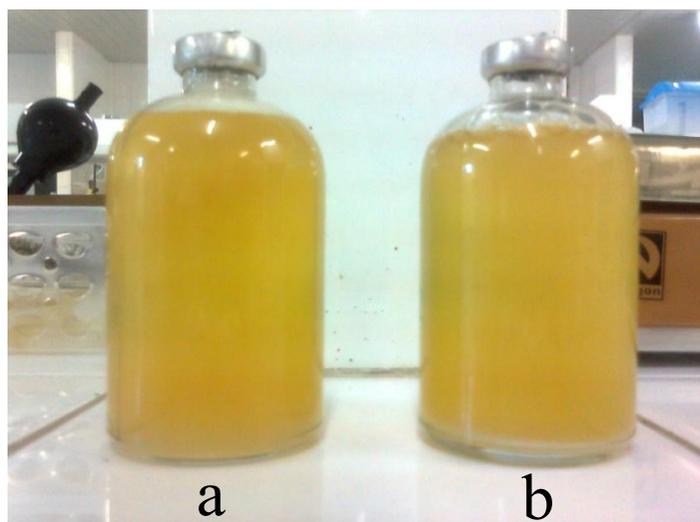


Figura 11 – *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 após 24 horas de cultivo a 35 °C em RCM (a) e Tioglicolato Fluido (b).

Pode ser observado na Figura 11 que o tubo (b) apresentou maior turbidez no meio, indicando que o micro-organismo cresceu mais no meio de Tioglicolato Fluido.

Em seguida, um teste quantitativo foi realizado, onde foram utilizados oito amostras de meio de cultura (sendo quatro de Tioglicolato Fluido e quatro de RCM) inoculadas com o micro-organismo e conservadas em geladeira a 5 °C após 24 horas de cultivo na incubadora a 35 °C. As oito amostras foram filtradas em membranas previamente taradas como descrito no item 4.7. Os resultados encontram-se na Tabela 7 e no gráfico da Figura 12.

Tabela 7 – Resultados do teste com os meios de cultura para manutenção e crescimento.

	Ensaio	Concentração Celular (g/L)
1	Tioglicolato	1,04
	RCM	1,38
2	Tioglicolato	2,56
	RCM	1,36
3	Tioglicolato	1,59
	RCM	1,27
4	Tioglicolato	1,46
	RCM	1,33

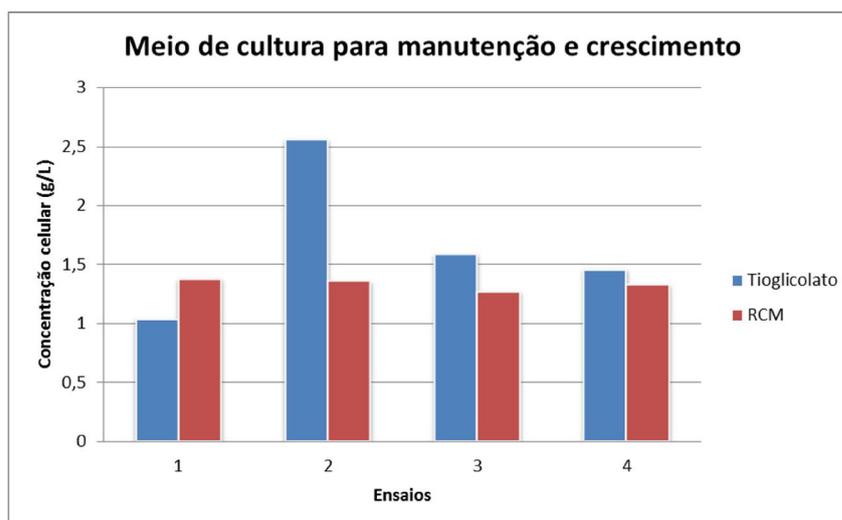


Figura 12 – Concentração celular do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 nas amostras de meio de cultura para manutenção e crescimento.

Foi possível observar com esses resultados que o micro-organismo cresce de maneira mais satisfatória no meio de Tioglicolato Fluido (cuja média de crescimento é de 1,66 g/L), havendo apenas uma exceção que ocorre no ensaio 1. Na execução do experimento, ocorreu um erro na filtração, o que pode ter ocasionado essa exceção. Nos demais casos, vemos uma considerável diferença de valores. Esse teste confirma o que foi observado visualmente nos tubos de penicilina.

Observamos também que a diferença no ensaio 2 é maior que nos outros. Este fato mostra que o crescimento do micro-organismo não ocorre da mesma forma sempre. Mas essa diferença só é observada no Tioglicolato Fluido, sendo um crescimento mais padronizado no RCM.

Testes estatísticos são necessários para verificar se essas diferenças são significativas, mas o número de amostras não permitiu a repetição do experimento, necessária para tal.

5.2. Cinética microbiana

Os resultados da cinética microbiana encontram-se na Tabela 1 em anexo. Com os valores encontrados nessa tabela, foi calculada a produtividade celular $P = 0,0405 \text{ g/L.h}$. Esse valor representa diretamente o crescimento celular em g/L a cada hora de experimento.

Na Figura 13 podemos verificar uma regressão quadrática do crescimento celular em função do tempo.

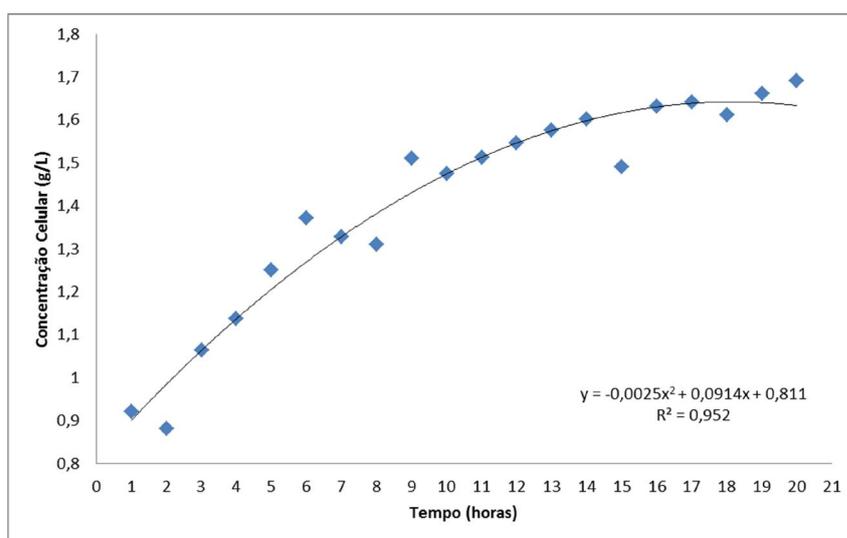


Figura 13 – Crescimento celular ajustado.

Inicialmente observa-se através da Figura 13 que a fase lag de crescimento não é visualizada, o que mostra que o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 se adaptou bem ao meio de cultura. Pode-se identificar a fase de crescimento exponencial para as nossas condições experimentais. Essa fase exponencial ocorre até o ponto de 14 horas. Além disso, temos a fase estacionária de crescimento a partir de 14 horas.

Podemos encontrar a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) através da Equação 7, calculando o logaritmo neperiano de X/X_0 e construindo o gráfico da Figura 14. Na Tabela 8 encontra-me os resultados desses cálculos.

Tabela 8 – Valores de $\ln (X/X_0)$ para cálculo da velocidade máxima de crescimento.

Tempo (h)	X (g/L)	$\ln (X/X_0)$
1	0,92	0
2	0,88	-0,04445
3	1,06	0,141651
4	1,14	0,21441
5	1,25	0,306525
6	1,37	0,398192
7	1,33	0,368561
8	1,31	0,353409
9	1,51	0,495491
10	1,47	0,468644
11	1,51	0,495491
12	1,55	0,521637
13	1,57	0,534457
14	1,60	0,553385

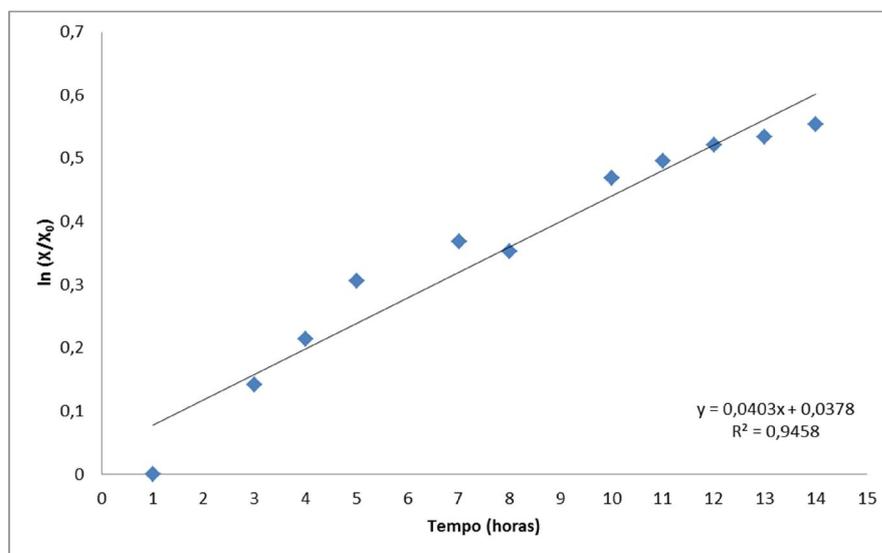


Figura 14 – Caracterização do $\mu_{\text{máx}}$ para o experimento.

De acordo com a teoria apresentada em 2.7, o coeficiente angular da equação da reta do gráfico da Figura 14 representa a velocidade máxima de crescimento celular, portanto $\mu_{\text{máx}} = 0,0403 \text{ h}^{-1}$.

De posse do valor da velocidade máxima, podemos calcular G, o tempo de geração, através da Equação 8. Então, temos que $G = 15,7$ h. Esse valor representa o tempo necessário para que o micro-organismo duplique a sua biomassa. Então, quanto menor o valor de G, mais rápido é o crescimento.

5.3.Planejamento fatorial

Os resultados do planejamento fatorial encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentração celular do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 nos 10 ensaios do planejamento fatorial ao fim das 72 horas de fermentação.

Ensaio	Concentração Celular (g/L)	Ensaio	Concentração Celular (g/L)
1	1,00	6	0,74
2	0,76	7	0,91
3	0,85	8	1,16
4	0,26	9	1,42
5	0,59	10	1,40

Através dos resultados da Tabela 9, foi observado que os ensaios que geraram melhores respostas foram os ensaios 9 e 10, ou seja, 30 g/L de glicerol e 2 g/L de extrato de levedura. Este fato está de acordo com os estudos encontrados na literatura, que apontam concentrações menos elevadas de glicerol como sendo ótimas em processos de batelada simples (RINGEL *et al.*, 2012).

Através do programa Statistica® (versão 7.0), o planejamento fatorial foi avaliado estatisticamente. Na figura 15 encontra-se o gráfico de pareto. A superfície de resposta e as curvas de nível podem ser vistas na Figura 16.

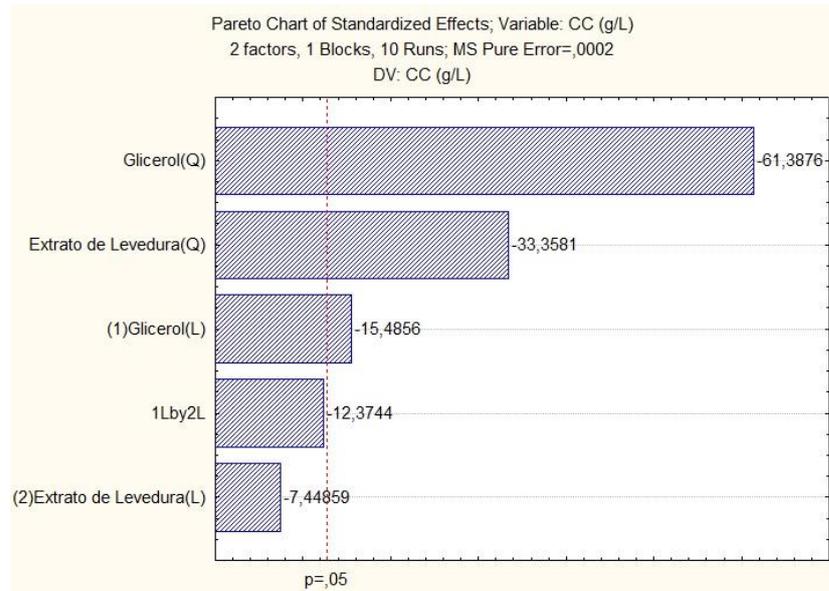


Figura 15 – Efeito das variáveis independentes sobre a concentração celular. (Q) representa o termo quadrático e (L) representa o termo linear.

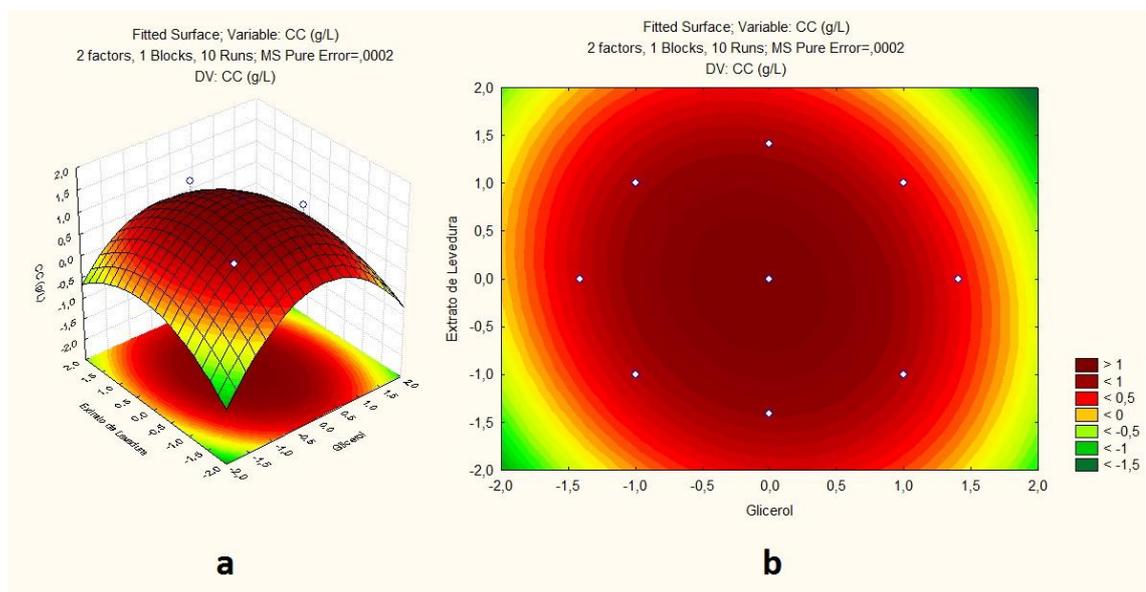


Figura 16 – Superfície de resposta (a) e curvas de nível (b) da concentração celular em função do glicerol e do extrato de levedura.

Analisando a Figura 15, podemos constatar que o termo quadrático do glicerol e do extrato de levedura, além do termo linear do glicerol, são estatisticamente significativos, num nível de 95 % de confiança. Além disso, esses efeitos são negativos, fato verificado na Figura 16 pela concavidade da superfície de resposta voltada para baixo.

A Figura 15 mostra também que o efeito do glicerol é maior que o efeito do extrato de levedura, estando de acordo com o esperado, já que o glicerol é a principal fonte de carbono do micro-organismo.

Ainda de acordo com a Figura 15 foi observado que, para planejamentos futuros, os níveis da variável glicerol devem ser explorados de maneira mais ampla que os níveis da variável extrato de levedura, levando em consideração o maior impacto que a concentração de glicerol no meio de cultura causa no crescimento do micro-organismo.

Através da Figura 16 verificamos que a concentração máxima de crescimento celular do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 no experimento é obtida quando a concentração do glicerol no meio de cultura está entre 25 e 35 g/L e a concentração do extrato de levedura entre 1,5 e 2,5 g/L.

Apesar de encontrada a região ótima desse planejamento, não podemos afirmar que o experimento foi otimizado. Para isso, outros planejamentos devem ser feitos, dentro dos limites do conhecimento da literatura (concentrações de glicerol e extrato de levedura no meio de cultura), para que outras regiões sejam exploradas. A execução desse planejamento aqui apresentado é apenas o primeiro passo dessa otimização.

6. Conclusões

As condições operacionais para manutenção e crescimento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 foram alcançadas, produzindo inóculos com alta viabilidade e respostas satisfatórias.

Apesar de o RCM ser um meio próprio para o gênero *Clostridium*, o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 se adaptou de forma mais positiva ao meio de Tioglicolato Fluido, que é um meio utilizado para manutenção de micro-organismos anaeróbios. Os resultados apresentaram o meio de cultura Tioglicolato Fluido como uma alternativa bastante eficaz.

Foi possível observar que o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 alcançou o fim da fase exponencial de crescimento em 14 horas de fermentação. Então, estudando apenas essa fase, dados cinéticos que caracterizam o crescimento do micro-organismo foram coletados. Os dados serviram para compreender o seu comportamento diante do meio de cultura próprio para a produção de 1,3-propanodiol.

O primeiro dado importante foi o tempo de geração ($G = 15,7$ horas). Através desse valor conclui-se que o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 leva aproximadamente toda a fase exponencial de crescimento para duplicar a sua biomassa. Fato esse que pôde ser observado também pela baixa velocidade de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}} = 0,0403 \text{ h}^{-1}$), característica do gênero *Clostridium*.

A variável de maior efeito sobre o crescimento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 foi o glicerol e as concentrações ideais de glicerol e extrato de levedura no meio de cultura, responsáveis pelos melhores resultados, foram respectivamente 30 g/L e 2 g/L.

7. Perspectivas de Trabalhos Futuros

- Abranger o planejamento fatorial explorando outras concentrações das variáveis independentes;
- Quantificação dos metabólitos (1,3-propanodiol e outros) obtidos na fermentação do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 seguida de avaliações estatísticas desses resultados;
- Execução da fermentação em batelada alimentada em um biofermentador com controle de temperatura, agitação e pH;
- Utilização de outros micro-organismos para comparação dos resultados;
- Utilização de glicerina bruta oriunda da produção de biodiesel.

8. Referências Bibliográficas

ABBAD-ANDALOUSSI, S.; MANGINOT-DÜRR, C.; AMINE, J.; PETIDEMANGE, E.; PETIDEMANGE, H. *Isolation and characterization of Clostridium butyricum DSM 5431 and mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids*. Applied Environmental Microbiology 61:4413-4417, 1995.

ABBAD-ANDALOUSSI, S.; MANGINOT-DÜRR, C.; RAVAL, G.; PETIDEMANGE, H. *Carbon and electron flow in Clostridium butyricum grown in chemostat culture on glycerol and on glucose*. Microbiology 142:1149-1158, 1996a.

ABBAD-ANDALOUSSI, S.; GUEDON, E.; SPIESSER, E.; PETITDEMANGE, H. *Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-propanediol production by Clostridium butyricum*. Letters in Applied Microbiology 22:311-314, 1996b.

ABBAD-ANDALOUSSI, S.; AMINE, J.; FERARAD, P.; PETITDEMANGE, H. *Effect of glucose on glycerol metabolism by Clostridium butyricum*. Applied Environmental Microbiology 84:512-522, 1998.

ADHIKARI, S.; FERNANDO, S. D.; HARYANTO, A. *Hydrogen production from glycerin by steam reforming over nickel catalysts*. Renewable Energy 33(5):1097-1100, 2008.

ANAND, P.; SAXENA, R. K.; MARWAH, R. G. *A novel downstream process for 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation*. Applied Microbiology Biotechnology 90(4):1267-1276, 2011.

ANDERSCH, W.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. *Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by Clostridium acetobutylicum*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 18:327-332, 1983.

ANP. AGENCIA NACIONAL DE PETROLEO. *Produção Mensal do Biodiesel*. Disponível em: <www.anp.gov.br/?dw=8739>. Acesso em: Jun. 2013.

ARNTZ, D.; HAAS, T.; MÜLLER, A.; WIEGAND, N. *Kinetische untersuchung zur hydratisierung von acrolein*. Chemie Ingenieur Technik 63:733-735, 1991.

- ASAD-UR-REHMAN; MATSUMURA, M.; NOMURA, N.; SATO, S. *Growth and 1,3-propanediol production on pre-treated sunflower oil biodiesel raw glycerol using a strict anaerobe Clostridium butyricum*. Current Research in Bacteriology 1(1):7-16, 2008.
- BARBIRATO, F.; HIMMI, H. E.; CONTE, T.; BORIES, A. *1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries*. Industrial Crops and Products 7:281-289, 1998.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BURNS, R. E. *Como Fazer Experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Campinas: Editora Unicamp, 2001.
- BASTOS, R. G. *Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos*. São Carlos: EdUFSCar, 2010.
- BIEBL, H. *Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by Clostridium butyricum. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxoast*. Applied Microbiology and Biotechnology 35:701-705, 1991.
- BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. *Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia*. Applied Microbiology Biotechnology 36:592-597, 1992.
- BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. *Microbial production of 1,3-propanediol*. Applied Microbiology and Biotechnology 52:289-297, 1999.
- BIEBL, H. *Fermentation of glycerol by Clostridium pasteurianum - batch and continuous culture studies*. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology 27:18-26, 2001.
- BOWLES, L. K.; ELLEFSON, W. L. *Effects of butanol on Clostridium acetobutylicum*. Applied and Environmental Microbiology 50(5):1165-1170, 1985.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E. *Biotechnologia Industrial*. Volume 2, São Paulo: Edgar Bülcher, 2001.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building*. Wiley. New York, 1978.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. *Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira.* Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/Ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em: Out. 2012.

CAMERON, D. C.; ALTARAS, N. E.; HOFFMAN, M. L.; STRAW, A. J. *Metabolic engineering of propanediol pathways.* Biotechnology Progress 14:116-125, 1998.

CÁRDENAS, D. P.; PULIDO, C.; ARAGON, O. L.; ARISTIZÁBAL, F. A.; SUÁREZ, Z. R.; MONTOYA, D. *Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de Clostridium sp. mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiésel.* Revista Colombiana Ciências Químico-Farmacéuticas 35:120-137, 2006.

CAROLE, T. M.; PELLEGRINO, J.; PASTER, M. D. *Opportunities in the industrial biobased products industry.* Applied Biochemistry Biotechnology 113-116:871-885, 2004.

CELINSKA, E. *Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering.* Biotechnology Advances 28:519-530, 2010.

CHATZIFRAGKOU, A.; DIETZ, D.; KOMAITIS, M.; ZENG, A.; PAPANIKOLAOU, S. *Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of Clostridium butyricum VPI 1718.* Biotechnology and Bioengineering 107(1):76-84, 2010.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; DIETZ, D.; DOULGERAKI, A. I.; NYCHAS, G-J. E.; ZENG, A. P. *Production of 1,3-propanediol by Clostridium butyricum growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process,* Applied Microbiological Biotechnology 91:101-112, 2011a.

CHATZIFRAGKOU, A.; AGGELIS, G.; KOMAITIS, M.; ZENG, A.; PAPANIKOLAOU, S. *Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of Clostridium butyricum VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation.* Bioresource Technology 102:10625-10632, 2011b.

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

CHENG, K. K.; LIU, D. H.; SUN, Y.; LIU, W. B. *1,3-Propanediol production by Klebsiella pneumonia under different aeration strategies*. Biotechnology Letters 26:911-915, 2004.

CHENG, J. J.; CHEN, Y. *Anaerobic waste treatment processes*. Water Environment Research 79(10): 1430-1450, 2007.

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

CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. *Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals*. Trends in Biotechnology 31:20-28, 2013.

COLIN, T.; BORIES, A.; MOULIN, G. *Inhibition of Clostridium butyricum by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation*, Applied Microbiological Biotechnology 54:201-205, 2000.

COLIN, T.; BORIES, A.; LAVIGNE, C.; MOULIN, G. *Effect of acetate and butyrate during glycerol fermentation by Clostridium butyricum*. Current Microbiology 43:238-243, 2001.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. *Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras*. Química Nova 23:531-537, 2000.

DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. *Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol*. Applied Catalysis A: General 281:225-231, 2005.

DECKWER, W. D. *Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol*. FEMS Microbiology Reviews, 16:143-149, 1995.

DEMIRBAS, A. *Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol*. Energy Conversion and Management 43:2349-2356, 2002.

DÜRRE, P. *New insights and novel developments in clostridial acetone / butanol / isopropanol fermentation*. Applied Microbiological Biotechnology 49:639-648, 1998.

DROZDYNSKA, A.; LEJA, K.; CZACZYK, K.; *Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol*. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology 92(1):92-100, 2011.

EATON, R. E.; BOON, W. H.; SMITH, C. J. *Chemical base for engine coolant/antifreeze with improved thermal stability properties*. Patent Number US 6818146 B2 Shell Oil Company, 2004.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; SABIO, E.; RAMIRO, M. J. *Preparation and properties of biodiesel from Cynaracardunculus L. Oil*. Industrial & Engineering Chemistry Research 38:2927-2931, 1999.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRÍGUEZ, J. J.; TEJEDOR, A. *Biodiesel Fuels from Vegetable Oils: Transesterification of Cynaracardunculus L. Oils with Ethanol*. Energy & Fuels 16:443-450, 2002.

EZEJI, T. C. L.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. *Industrially relevant fermentations*. Boca Raton: CRC Press LLC. 87-125, 2005.

EZEJI, T. C. L.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. *Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors*. Current Opinion in Biotechnology 18:220-227, 2007.

FORAGE, R. G.; FOSTER, M. A. *Glycerol Fermentation in Klebsiella pneumoniae: Functions of the Coenzyme B12-Dependent Glycerol and Diol Dehydratases*. Journal of Bacteriology 149(2):413-419, 1982.

FORAGE, R. G.; LIN, E. C. *DHA system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in Klebsiella pneumoniae NCIB 418*. Journal of Bacteriology 151(2):591-599, 1982.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; VAN HAANDEL, A.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P. F. F. *Fundamentos do Tratamento Anaeróbio*. In: CAMPOS, J. R. (Coord.). Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo. Rio de Janeiro: ABES: 29-52, 1999.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. *Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts*. Biochemical Engineering Journal 44:2-12, 2009.

GANCEDO, C.; GANCEDO, J. M.; SOLS, A. *Glycerol Metabolism in Yeasts. Pathways of Utilization and Production*. European Journal Biochemistry 5:165-172, 1968.

GERDING, D. N. *In vitro susceptibility of Clostridium difficile clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Quebec, Canada*. International Journal of Antimicrobial Agents 33:339-342, 2009.

GIRBAL, L.; SOUCAILLE, P. *Regulation of Clostridium acetobutylicum metabolism as revealed by mixed substrate steady-state continuous culture: role of NADH/NAD ratio and ATP pool*. Journal of Bacteriology 176(21):6433-6438, 1994.

GIRBAL, L.; VASCONCELOS, I.; SAINT-AMANS, S.; SOUCAILLE, P. *How neutral red modified carbon and electron flow in Clostridium acetobutylicum grown in chemostat culture at neutral pH*. FEMS Microbiology Reviews 16(2-3):151-162, 1995.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P. *Metabolic engineering of Clostridium acetobutylicum for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol*. Metabolic Engineering 7:329-336, 2005.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P. *Microbiol Conversion of to 1,3-propanediol: Physiological Comparison of a Natural Producer, Clostridium butyricum VPI 3266, and an Engineered Strain, Clostridium acetobutylicum DC1(pSPD5)*. Applied and Environmental Microbiology 72:96-101, 2006.

- GOTTSCHALK, G.; AVERHOFF, B. *Process for the microbiological preparation of 1,3-propanediol from glycerol*. European Patent, 0 373 230 A1, 1990.
- GÜNZEL B.; YONSEL, S.; DECKWER, W. D. *Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by Clostridium butyricum up to a scale of 2m³*. Applied Microbiology 36:289-294, 1991.
- HALLENBECK, P. C.; BENEMANN, J. R. *Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes*. International Journal of Hydrogen Energy 27(11-12):1185-1193, 2002.
- HAO, J.; WANG, W.; TIAN, J.; LI, J.; LIU, D. *Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing dha T gene in Klebsiella pneumoniae TUAC01*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35:735-741, 2008.
- HARTLEP, M.; HUSSMAN, W.; PRAYITNO, N.; MEYNIAL-SALLES, I.; ZENG, A. P. *Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-propanediol from glycerol*, Applied Microbiology Biotechnology 60:60-66, 2002.
- HELD, A. M.; *The fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by Klebsiella pneumoniae*. Master's thesis. Madison-WI. University of Wisconsin, 1996.
- HEYNDRICKX, M.; DEVOS, P.; VANCANNEYT, M.; DE LEY, J. *The fermentation of glycerol by Clostridium butyricum LMG 1212 t2 and 1213 t1 and Clostridium pasteurianum LMG 3285*. Applied Microbiology and Biotechnology 34:637-642, 1991.
- HIMMI, E. H.; BORIES, A.; BARBIRATO, F. *Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by Clostridium Butyricum*. Bioresource Technology 67(2):123-128, 1999.
- HIRSCH, R. L.; BEZDEK, R.; WENDLING, R. *Peaking of world oil production and its mitigation*. AIChE Journal 52:2-8, 2006.
- HIRSCHMANN, S.; BAGANZ, K.; KOSCHIK, I.; VORLOP, K. D. *Development of an integrated bioconversion process for the production of 1,3-propanediol from raw glycerol waters*. Landbauforsch Volkenrode 55:261-267, 2005.

- HUANG, H.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. *Production of 1,3-propanediol by Klebsiella pneumoniae*. Applied Biochemistry and Biotechnology 98-100:687-698, 2002.
- IGARI, S.; MORI, S.; TAKIKAWA, Y. *Effects of molecular structure of aliphatic diols and polyalkylene glycol as lubricants on the wear of aluminum*. Wear, 244:180-184, 2000.
- ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. *Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process*. Journal of Bioscience and Bioengineering 100(3):260-265, 2005.
- JANAUN, J.; ELLIS, N. *Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14(4):1312-1320, 2010.
- JEGANNATHAN, K. R.; CHAN, E.; RAVINDRA, P. *Harnessing biofuels: A global renaissance in energy production*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 13:2163-2168, 2009.
- JENSEN, T. Ø.; KVIST, T.; MIKKELSEN, M. J.; CHRITENSEN, P. V.; WESTERMANN, P. *Fermentation of crude glycerol from biodiesel production by Clostridium pasteurianum*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 39:709-717, 2012.
- JI, X-J.; HUANG, H.; ZHU, J-G.; HU, N.; LI, S. *Efficient 1,3-propanediol production by fed-batch culture of Klebsiella pneumoniae: the role of ph fluctuation*, Applied Biochemical Biotechnology 159:605-613, 2009.
- JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. *The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production*. Environment Progress 26:338-348, 2007.
- JONES, D. T.; WOODS, D. R. *Acetone-butanol fermentation revisited*. Microbiology Reviews 50(4):484-524, 1986.
- KARINEN, R. S.; KRAUSE, A. O. I. *New biocomponents from glycerol*. Applied Catalysis 306:128-133, 2006.

- KATRLIK, J.; VOSTIAR, I.; SEFCOVICOVA, J.; TKAC, J.; MASTIHUBA, V.; VALACH, M.; STEFUCA, V.; GEMEINER, P. *A novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacter oxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 388:287-295, 2007.
- KAUR, G.; SRIVASTAVA, A. K.; CHAND, S. *Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol*. Biochemical Engineering Journal 64:106-118, 2012.
- KERR, R. A. *Global warming is changing the world*. Science 316:188-190, 2007.
- KHANAL, S. K.; CHEN, W. H.; LI, L.; SUNG, S. *Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products*. International Journal of Hydrogen Energy 29(11):1123-1131, 2004.
- KÖPNICK, H.; SCHMIDT, M.; BRÜGGING, W.; RÜTER, J.; KAMINSKY, W. *Polyesters*, In ELVERS, B.; HAWKINS, S.; RUSSEY, W.; SCHULZ, G. editors. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, vol. A21 p. 227-250. VCH Publishers, Inc., New York, NY, 1992.
- KÓSMIDER, A.; LEJA, K.; CZACZYK, K. *Improved utilization of crude glycerol byproduct from biodiesel production*. In: MONTERO, G.; STOYTICHEVA, M. editors. Biodiesel: quality, emissions and by-products. Rijeka: InTech. 341-357, 2011.
- KOTHARI, R.; TYAGI, V. V.; PATHAK, A. *Renewable and sustainable energy reviews*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14:1744-1751, 2010.
- KUBIAK, P.; LEJA, K.; MYSZKA, K.; CELINSKA, E.; SPYCHALA, M.; SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, D.; CZACZYK, K.; GRAJEK, W. *Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol*. Process Biochemistry 47:1308-1319, 2012.
- KURIAN, J. V. *A new polymer platform for the future-Sorona^R from corn-derived 1,3-propanediol*. Journal of Polymers and Environment 13:159-167, 2005.

- LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. *Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species*. Microbiology 145:2577-2585, 1999.
- LAWRENCE, F. R.; SULLIVAN, R. H. *Process for making a dioxane*. US Patent 3,687,981, 1972.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. Tradução de W. R. Loodi, e A. A. Simões. Ed. Sarvier. São Paulo, 2000.
- LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; DE OLIVEIRA, S. V. W. B. *Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol*. Renewable Energy 45:138-145, 2012.
- LIN, R.; LIU, H.; HAO, J.; CHENG, K.; LIU, D. *Enhancement of 1,3-propanediol production by Klebsiella pneumoniae with fumarate addition*. Biotechnology Letters 27:1755-1759, 2005.
- LIU, H.; XU, Y.; ZHENG, Z.; LIU, D. *1,3-propanediol and its copolymers: research, development and industrialization*. Biotechnology Journal 5:1137-1148, 2011.
- LUERS, F.; SEYFRIED, M.; DANIEL, R.; GOTTSALK, G. *Glycerol conversion to 1,3-propanediol by Clostridium pasteurianum: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase*, FEMS Microbiology Letters 154:337-345, 1997.
- MA, B. B.; XU, X. L.; ZHANG, G. L.; WANG, L. W.; WU, M.; LI, C. *Microbial production of 1,3-propanediol by Klebsiella pneumoniae XJPD-Li under different aeration strategies*. Applied Biochemistry and Biotechnology 152(1):127-134, 2009.
- MAERVOET, V. E. T.; MEY, M. D.; BEAUPREZ, J.; MAESENEIRE, S. D.; SOETAERT, W. K. *Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering*. Organic Process Research and Development 15:189-202, 2011.
- MAYR, E. *Principles of systematic zoology*. New York: McGraw-Hill. 34-37, 1969.
- MENDES, F. S.; GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; CORDIER, H.; FRANCOIS, J. M.; VASCONCELOS, I. *1,3-Propanediol production in a two-step process fermentation from renewable feedstock*. Applied Microbiological Biotechnology 92(3):519-527, 2011.

- MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. *Enzymatic evidence for an involvement of pyruvate dehydrogenase in the anaerobic glycerol metabolism of Klebsiella pneumonia*. Journal of Biotechnology 56:135-142, 1997a.
- MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. *High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by Klebsiella pneumonia*. Enzyme and Microbial Technology 20:82-86, 1997b.
- MILLET, P. *Retournement de la situation de la glycérine*. Information Chimie 345:102-104, 1993.
- MME. Ministério de Minas e Energia. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/site/menu/select_main_menu_item.do?channelId=971>. Acesso em: Out. 2011.
- MME. Ministério de Minas e Energia. *Biodiesel: O novo combustível do Brasil*. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br>>. Acesso em: Out. 2012.
- MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. *Microbial Physiology*. 4ª Edição. New York: Editora Wiley-Liss, 2002.
- MONYEM, A.; VAN GERPEN, J. H. *The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions*. Biomass and Bioenergy 20:317-325, 2001.
- MOON, C.; LEE, C. H.; SANG, B. I.; UM, Y. *Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by Clostridium pasteurianum*. Bioresource Technology 102:10561-10568, 2011.
- MOTA, C. J. A. *Gliceroquímica: A petroquímica renovável*. Tchê Química 3(6): 26-31, 2006.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. *Gliceroquímica: Novos Produtos e Processos a partir da Glicerina de produção de Biodiesel*, Química Nova 32:639-649, 2009.
- MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D. J.; WANG, W.; XIU, Z. L. *Microbial production of 1,3-propanediol by Klebsiella pneumoniae using crude glycerol from biodiesel preparations*. Biotechnology Letters 28:1755-1759, 2006.

- MYSZKA, K.; LEJA, K.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; CZACZYK, K. *Isolation process of industrially useful Clostridium bif fermentans from natural samples*. Journal of Bioscience and Bioengineering 113:631-633, 2012.
- NAKUMURA, C. E.; WHITED, G. M. *Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol*. Current Opinion in Biotechnology 14:454-459, 2003.
- NETO, W. S. *Cinética de processos fermentativos*. In: Curso fermentation technology. Florianópolis, 1999.
- NICOLAOU, S.; GAIDA, M.; PAPOUTSAKIS, E. T. *A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation*. Metabolic Engineering 12:307-331, 2010.
- OLIVEIRA, L. B. *Biodiesel - Combustível limpo para transporte sustentável*. In: Ribeiro, S. K. *Transporte sustentável: alternativas para ônibus urbanos*. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 2006.
- OOI, T. L.; YOUNG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W. M. Z. *Glycerol residue - A rich source of glycerol and medium chain fatty acids*. Journal of Oleo Science, 53:29-33, 2004.
- OTTE, B.; GRUNWALDT, E.; MAHMOUND, O.; JENNEWEIN, S. *Genome shuffling in Clostridium diolis for improved 1,3-propanediol production*, Applied Environment Microbiology 75:7610-7616, 2009.
- PAPANIKOLAOU, S.; RIUZ-SANCHEZ, P.; PARISSET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. *High production of 1,3-propanediol from glycerol by a newly Clostridium butyricum strain*. Journal of Biotechnology 77:191-208, 2000.
- PARENTE, E. J. S. *Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado*. Fortaleza, 2003. Disponível em: <<http://www.xitizap.com/Livro-Biodiesel.pdf>>. Acesso em: Out. 2010.
- PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e aplicações*. 2ª Edição. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997.

- PETITDEMANGE, E.; DÜRR, C.; ABBAD-ANDALOUSSI, S.; RAVAL, G. *Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of Clostridium butyricum*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 15:498-502, 1995.
- PINTO, M. M. L. *Obtención bioquímica de 1,3-propanodiol a partir de Glicerina*. Universidad de Valladolid, 2009.
- POSADA, J. A.; RINCÓN, L. E.; CARDONA, C. A. *Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: addressing the glycerol problem*. Bioresource Technology 111:282-293, 2012.
- QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; NETO, P. R. C.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. C. *Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I*. Química Nova 32(3):793-808, 2009.
- RAUSCH, K. D.; BELYEA, R. L. *The future of coproducts from corn processing*. Applied Biochemical Biotechnology 128:47-86, 2006.
- REHMAN, A.; WIJESEKARA, R. G.; NOUMURA, S.; SATO, S.; MATSUMURA, M. *Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by Clostridium butyricum*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 83:1072-1080, 2008.
- REIMANN, A.; BIEBL, H. *Production of 1,3-propanediol by Clostridium butyricum DSM 5431 and product tolerant mutants in fed-batch culture: feeding strategy for glycerol and ammonium*. Biotechnology Letters 18:827-832, 1996.
- REIMANN, A.; ABBAD-ANDALOUSSI, S.; BIEBL, H.; PETITDEMANGE, H. *1,3-Propanediol formation with product-tolerant mutants of Clostridium butyricum DSM 5431 in continuous culture: productivity, carbon and electron flow*. Journal of Applied Microbiology 84:1125-1130, 1998.
- RIBEIRO, S. K. *Combustível à base de grãos pode aliviar a demanda por diesel e diminuir o impacto no efeito estufa*. Scientific American Brasil, 53, 2006.

- RINGEL, A. K.; WILKENS, E.; HORTIG, D.; WILLKE, T.; VORLOP, K. D. *An improved screening method for microorganisms able to convert crude glycerol to 1,3-propanediol and to tolerate high product concentrations*. Applied Microbiology and Biotechnology 93:1049-1056, 2012.
- RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, F.; SILVA, S. S. *Glicerol de biodiesel*. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento 37:44-51, 2007/2008.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. *Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos*. 2ª Edição, Campinas, São Paulo, 2009.
- SAINT-AMANS, S.; PERLOT, P.; GOMA, G.; SOUCAILLE, P. *High production of 1,3-propanediol from glycerol by Clostridium butyricum VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system*. Biotechnology Letters 16:832-836, 1994.
- SAUER, M.; MAR, H.; MATTANOVICH, D. *Microbial production of 1,3-propanediol*. Recent Patents on Biotechnology 2:191-197, 2008.
- SAXENA, R. K.; ANAND, P.; SARAN, S.; ISAR, J. *Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities*. Biotechnology Advances 27:895-913, 2009.
- SHELL CHEMICAL COMPANY. *Shell Chemical Company announces commercialization of new polymer* (Press Release), 1995.
- SHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. *Transesterification of Vegetable Oils: a Review*. Journal of the Brazilian Chemical Society 9(1):199-210, 1998.
- SIEGRIST, J. *Launch of a new generation of organic certified reference materials*. Analytix, 4:2-12, 2010.
- SKONIECZNY, M. T.; YARGEAU V. *Biohydrogen production by Clostridium beijerinckii: effect of pH and substrate concentration*. International Journal of Hydrogen Energy 34:3288-3294, 2009.

- SLINIGER, P. J.; BOTHAST, R. J. *Optimizing aerobic conversion of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde*. Applied Environmental Microbiology 50:1444-1450, 1985.
- SLINN, M.; KENDALL, K.; MALLON, C.; ANDREWS, J. *Steam reforming of biodiesel byproduct to make renewable hydrogen*. Bioresource Technology 99(13): 5851-5858, 2008.
- SONGER, J. G. *Clostridia as agent of zoonotic disease*. Veterinary Microbiology 140:399-404, 2010.
- STREMEL, D. P. *Desenvolvimento de modelos estruturados alternativos para o processo de produção de etanol*. Tese de Doutorado. Campinas-SP, Brasil. Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- SULLIVAN, C. J. *Propanediols Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. vol. A22, VCH, Weinheim 163-171, 1993.
- SUN, Q. Y.; QI, T. W.; TENG, H.; XIU, L. Z.; ZENG, P. A. *Mathematical modeling of glycerol fermentation by Klebsiella pneumonia: Concerning enzyme-catalytic reductive pathway and transport of glycerol and 1,3-propanediol across cell membrane*. Biochemical Engineering Journal 38:22-32, 2008.
- STRAYER, L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1996.
- TAG, C. G. *Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol*. Dissertation. Germany. University of Oldenburg, 1990.
- TANG, X.; TAN, Y.; ZHU, H.; ZHAO, K.; SHEN, W. *Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of Escherichia coli*. Applied Environment Microbiology 75:1628-1634, 2009.
- TERRACCIANO, J. S.; KASHKET, E. R. *Intracellular Conditions Required for Initiation of Solvent Production by Clostridium acetobutylicum*. Applied and Environmental Microbiology 52(1):86-91, 1986.

- TOKUMOTO, H.; TANAKA, M. *Novel anaerobic digestion induced by bacterial components for value-added byproducts from high-loading glycerol*. *Bioresource Technology* 107:327-332, 2012.
- TONG, I. T.; CAMERON, D. C. *Enhancement of 1,3-propanediol production by co-fermentation in Escherichia coli expressing genes from Klebsiella pneumonia dha regulon genes*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34/35:149-159, 1992.
- UMARE, S. S.; CHANDURE, A. S.; PANDEY, R. A. *Synthesis characterization and biodegradable studies of 1,3-propanediol based polyesters*. *Polymer Degradation and Stability* 92:467-497, 2007.
- VASCONCELOS, I.; GIRBAL, L.; SOUCAILLE, P. *Regulation of carbon and electron flow in Clostridium acetobutylicum grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol*. *Journal of Bacteriology* 176(5):1443-1450, 1994.
- VEIGA, M. C.; FOSTER, M. A. *1,3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase of Lactobacillus brevis and Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology* 174:1013-1019, 1992.
- WANG, J. F.; XIU, Z. L.; FAN, S. D. *Study on microaerobic conversion of glycerin to 1,3-propanediol by Klebsiella pneumoniae*. *Modern Chemical Industry* 21:28-37, 2001.
- WEIZMANN, C.; ROSENFELD, B. *The activation of the butanol-acetone fermentation of carbohydrates by Clostridium acetobutylicum (Weizmann)*. *Biochemical Journal* 319(4):619-39, 1937.
- WENDISCH, V. F.; LINDNER, S. N.; MEISWINKEL, T. M. *Use of glycerol in biotechnological applications*, in: MONTERO, G.; MARGARITA, M. editors. *Biodiesel-Quality, Emissions and By-Products*, InTech, 305-340, 2011.
- WILKENS, E.; RINGEL, A. K.; HORTIG, D.; WILKE, T.; KLAUS-DIETER, V. *High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by Clostridium butyricum AKR102a*. *Applied Microbiology Biotechnology* 93:1057-1063, 2012.

WITT, U.; MUÈLLER, R. J.; WIDDECKE, H.; DECKWER, W. D. *Syntheses, properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol*, Macromolecular Chemistry and Physics 195:793-802, 1994.

XIU, Z. L.; CHEN, X.; SUN, Y. Q.; ZHANG, D. J. *Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose co-fermentation in Klebsiella pneumoniae under microaerobic conditions*. Biochemical Engineering Journal 33:42-52, 2007.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. *Anaerobic fermentation of glycerol: a path economic viability for the biofuels industry*. Current Opinion Biotechnology 18:213-219, 2007.

YOUNG, K. C.; OOI, T. L.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W. M. Z.; HAZIMAH, A. H. *Refining of crude glycerin recovered from glycerol residue by simples distillation*. Journal of Oil Palm Research 13(2):39-44, 2001.

YU, C.; CAO, Y.; ZOU, H.; XIAN, M. *Metabolic engineering of Escherichia coli for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols*. Applied Microbiology Biotechnology 89:573-583, 2011.

ZHANG, Y.; HUANG, Z.; DU, C.; LI, Y.; CAO, Z. *Introduction of an NADH regeneration system into Klebsiella oxytoca leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol*. Metabolic Engineering 11:101-106, 2009.

ZHAO, Y. N.; CHEN, G.; YAO, S. J. *Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated Klebsiella pneumonia*. Biochemical Engineering Journal 32:93-99, 2006.

ZENG, A. P.; ROSS, A.; HIBEL, H.; TAG, C.; GÜNZEL, B.; DECKER, W. D. *Multiple product inhibition and growth modeling of Clostridium butyricum and Klebsiella pneumoniae in glycerol fermentation*. Biotechnology and Bioengineering 44:902-911, 1994.

ZENG, A. P. *Pathway and kinetic analysis of 1-3-propanediol production from glycerol fermentation by Clostridium butyricum*. Bioprocess Engineering 14:169-175, 1996.

ZENG, A. P.; BIEBL, H. *Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the news trends*. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology 74:239-259, 2002.

ZENG, A. P.; SABRA, W. *Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses*. Current Opinion in Biotechnology 22:749-757, 2011.

ZHENG, Z. M.; CHENG, K. K.; HU, Q. L.; LIU, H. J.; GUO, N. N.; LIU, D. *Effect of culture conditions on 3-hydroxypropionaldehyde detoxification in 1,3-propanediol fermentation by Klebsiella pneumoniae*. Biochemical Engineering Journal 39(2):305-310, 2007.

ZHU, M. M.; LAWMAN, P. D.; CAMERON, D. C. *Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered Escherichia coli by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate*. Biotechnology Program 18:694-699, 2002.

<<http://www.napier.ac.uk/randkt/rktcentres/bfrc/Pages/ABEhistory.aspx>>. Acesso em: 20 de julho de 2013.

9. Anexo

Tabela 1 – Construção da curva de crescimento por peso seco.

Tempo (h)	Concentração (g/L)	Tempo (h)	Concentração (g/L)
1	0,92	11	1,37
2	0,88	12	0,20
3	1,18	13	1,22
4	0,16	14	1,60
5	1,25	15	1,49
6	1,37	16	1,45
7	0,14	17	1,43
8	1,31	18	1,61
9	1,51	19	1,66
10	1,18	20	1,69