PAULA BRUZADELLE VIEIRA

**Estudos de processos para a produção de 1,3-
propanodiol por *Lactobacillus reuteri***

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de doutor em Ciências

Agosto
2014

PAULA BRUZADELLE VIEIRA

**Estudos de processos para a produção de 1,3-
propanodiol por *Lactobacillus reuteri***

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de doutor em Ciências

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Augusto Oller do
Nascimento

Co-orientadora: Dr^a Elen Aquino Perpetuo

Agosto
2014

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 24 de outubro de 2014.

Assinatura do autor _____

Assinatura do orientador _____

Catálogo-na-publicação

Vieira, Paula Bruzadelle

Estudos de processos para a produção de 1,3-propanodiol por *Lactobacillus reuteri* / P.B. Vieira. -- versão corr. -- São Paulo, 2014.

167 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Lactobacillus 2.Batelada repetida 3.Quimiostato 4.Produ-tividade 5.Glicerol I.Universidade de São Paulo. Escola Politéc-nica. Departamento de Engenharia Química II.t.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eliane e Claudino (*in memoriam*), pela oportunidade de vida que me ofereceram e incentivo nesta conquista.

Ao meu marido, Eugênio, pelo amor, carinho, companheirismo e muito incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio Oller do Nascimento, pela amizade e pela oportunidade e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dr.^a Beatriz Vahan Kilikian por toda atenção, ajuda dispensada neste trabalho e pelos momentos de valiosas discussões. A sua ajuda, com certeza, proporcionou o melhor desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dr.^a Elen Aquino Perpetuo pela co-orientação, incentivo e principalmente pela amizade que conquistamos.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Menck pela coordenação do projeto em parceria com a Braskem e a FAPESP que orientou este trabalho.

Aos professores doutores Andreas Karoly Gombert, Aldo Tonso, Elizabeth de F. Augusto e José Gregório Cabrera Gomez pelos ensinamentos e atenção a qualquer hora.

À minha amiga Mariana, pela amizade, por todo conhecimento transmitido ao longo da minha vida acadêmica, pelas noites não dormidas no laboratório e acolhimento em sua casa nas idas a São Paulo.

Ao amigo Zé Paulo, pela amizade e ajuda com a discussão e correção deste trabalho.

À minha amiga Lidiane, que gentilmente me cedeu a sua casa para a continuidade deste trabalho após a minha mudança de cidade.

À Renata, minha parceira de trabalho durante a execução deste trabalho que além de tudo se tornou minha amiga para a vida inteira.

Aos amigos especiais Luis, Meriellen, Anita, Talita e Rodrigo, pela ajuda constante no laboratório nos horários mais improváveis, além das boas risadas e dos momentos de descontração e aprendizado.

Às amigas: Bianca, Kelly, Letícia, Thiago, Arlem, Fernanda, Wesley, Rafael, Bruno, Larissa, Louise e Marcela pelas risadas, conselhos e momentos de reflexão.

À Marinalva que estava trabalhando no mesmo projeto, pela ajuda no laboratório de microbiologia e pelas discussões nos workshops e boa convivência.

Aos funcionários Carminha, Silvia e André pelo apoio e agradável convivência.

Ao CNPq, Fapesp e à Braskem pelo suporte financeiro, principalmente ao Mateus, quem contribuiu bastante para a discussão e direcionamento deste projeto.

À Renata Spinassé, uma grande amiga que mesmo à distância está sempre presente na minha vida.

Aos amigos: Cris, Alex, Andreia, Soraia, Rosário, Isabel, Affonso, Akemi, Louise pelos conselhos e momentos de alegria e descontração.

Aos meus “novos” amigos de Ribeirão Preto, Lívia, Sergio, Gabriela, João, Tassia, Thiago e tantos outros que me apoiaram nesta etapa.

À Sandra, minha sogra, por todo seu amor e carinho.

Aos meus avós, Dirlene e Rubens, por todo amor, incentivo, educação e carinho, sem a qual eu nada seria.

Ao meu pai Claudino que me proporcionou educação e me incentivou muito durante ao longo da minha carreira. Por pouco ele não participa fisicamente desta conquista. Porém, tenho certeza de que de onde estiver continuará torcendo e sentindo o mesmo por mim.

À minha mãe, Eliane, pelo verdadeiro Amor e pela educação transmitida, no qual foi fundamental para esta conquista. Além de me ensinar tantas coisas boas através da sua conduta.

Aos meus irmãos queridos Raul e Artur, pelo amor e por me trazerem tantas alegrias.

À pessoa que escolhi para viver ao meu lado, Eugênio, pelo grande amor, amizade e pelo incentivo constante para a realização deste objetivo.

Ao Dr. Celso Charuri, meu Mestre de Filosofia. Agradeço em cada segundo da minha vida pelo Amor, Compreensão, Respeito e Conhecimento transmitidos.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

“Para construir um mundo melhor basta seguir o que você reconhece como certo, cumprindo com Coragem e acionando a Verdade que é a razão da sua vida. Basta seguir o que você já sabe ser certo, e não ficar procurando o que é certo para seguir”.

(Dr. Celso Charuri)

RESUMO

O 1,3-propanodiol (PDO) é um composto químico com muitas aplicações industriais, como síntese de polímeros de tereftalatos, cosméticos e lubrificantes, dentre outros. Este composto pode ser produzido biotecnologicamente a partir do glicerol em condições de anaerobiose. Os principais produtores naturais de PDO são bactérias dos gêneros *Klebsiella* e *Clostridium*. No entanto, estes microrganismos podem apresentar riscos à saúde humana, sendo considerados oportunistas e, por isso, requerendo cuidados especiais que dificultam seu emprego em escala industrial. Uma alternativa está no uso de *Lactobacillus sp.*, bactérias que realizam altas conversões de glicerol a PDO e não apresentam estes inconvenientes. Neste estudo, buscou-se melhorar a produtividade da transformação de glicerol em PDO por *Lactobacillus reuteri*, através de diferentes tipos de bioprocessos. Para isso, o microrganismo foi cultivado em meio MRS (com glicose) contendo glicerol como cosubstrato. Realizaram-se experimentos em batelada, batelada repetida e em processo contínuo (quimiostato) sob diferentes condições. Os melhores resultados foram obtidos nos processos em batelada repetida e em quimiostato. Nos ensaios em batelada repetida, a melhor condição foi nos cultivos em que houve decantação de células. Nesta condição, a produtividade (Q_{PDO}) superou em quase 3 vezes o ensaio em batelada comum ($4,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Em quimiostato, a produtividade alcançada sob a taxa de diluição de $0,5 \text{ h}^{-1}$ foi 20% maior do que o melhor resultado em batelada repetida ($4,88 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Estes valores de produtividade são os maiores reportados na literatura até o momento. Além disso, os resultados indicam que o processo em quimiostato não é limitado pelo substrato, mas sim pela concentração de lactato produzido.

Palavras-chave: *Lactobacillus*. Batelada repetida. Quimiostato. 1,3-propanodiol. Produtividade. Glicerol.

ABSTRACT

1,3-propanediol (PDO) is a high-value chemical compound which has many industrial applications, such as synthesis of polymers of terephthalates, cosmetics and lubricants, among others. This compound can be produced biotechnologically from glycerol in anaerobiosis. The main natural producers of PDO are bacteria from genera *Klebsiella* and *Clostridium*. However, these microorganisms could be dangerous to human health, considered opportunistic and therefore require special care when manipulated on an industrial scale. An alternative is the use of *Lactobacillus* sp., bacteria which achieve high conversions of glycerol to PDO and do not present these problems. In this study, we aimed to improve the yield of PDO by *Lactobacillus reuteri* through different types of bioprocesses. For this, the microorganism was grown in MRS medium (with glucose) containing glycerol as co-substrate. Experiments were performed in batch run, repeated batch and continuous mode (chemostat) under different conditions. The best results were found in repeated batch run and chemostat mode. In repeated batch runs, the best condition was found in cultures with settling of cells. In this condition, the productivity (Q_{PDO}) reached almost 3 times the value of the simple batch run ($4.12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). In chemostat mode, the productivity reached, in the dilution rate of 0.5 h^{-1} , was 20% higher than the best result obtained in repeated batch mode ($4.88 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). These productivity values are the highest reported in the literature until this date. Furthermore, the results indicate that the chemostat process is not limited by the substrate, but by the concentration of produced lactate.

Keywords: *Lactobacillus*. Repeated batch. Chemostat. 1,3-propanediol. Productivity. Glycerol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais.....	20
Figura 2: Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP no país. Fonte: ANP, 2014.....	21
Figura 3: Rota metabólica do glicerol em <i>K. pneumoniae</i> . Fonte: (ZHUGE et al., 2010). ...	24
Figura 4: Utilização da glicose e do glicerol por <i>Lactobacillus reuteri</i>	31
Figura 5: Foto do biorreator e seus acessórios para o funcionamento do processo contínuo e da batelada repetida.	39
Figura 6: Influência do tempo de cultivo do Pré-inóculo no crescimento celular.....	48
Figura 7: Curva de crescimento em meio MRS com diferentes fontes de carbono.	50
Figura 8: Concentração celular, consumo de substratos e formação de produtos ao longo do cultivo em meio MRS original e adicionado de glicerol.	52
Figura 9: (a) Concentração celular de <i>L. reuteri</i> , (b) Consumo de glicerol e (c) Concentração de glicose residual em função do tempo de cultivo em meio MRS original ou modificado.	55
Figura 10: Metabolismo do glicerol e da glicose em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	57
Figura 11: Curva de consumo de substratos e produção de metabólitos ao longo do cultivo em meio MRS com diferentes concentrações de glicose e glicerol.	61
Figura 12: Consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do experimento de tolerância a glicose.	63
Figura 13: Consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do experimento de tolerância a glicerol.	64
Figura 14: Consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do experimento de toxicidade ao lactato.	66
Figura 15: Curva de crescimento de <i>L. reuteri</i> em meio MRS (Lab + GLR) na presença e ausência de acetato.....	67
Figura 16: Consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do tempo no experimento de toxicidade ao acetato.	68
Figura 17: Consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do tempo no experimento de toxicidade ao etanol.	70
Figura 18: Curva de crescimento e concentrações de substratos e produtos ao longo de B2.....	73

Figura 19: Absorbância, concentração de substratos e produtos ao longo da batelada B1.	75
Figura 20: Absorbância, concentração de substratos e produtos ao longo da batelada B3.	76
Figura 21: Concentrações de glicose, glicerol e metabólitos ao longo da batelada B4.....	78
Figura 22: Curva de crescimento, consumo de glicose e formação de produtos ao longo de B5.....	79
Figura 23: Cálculo dos fatores de conversão para a batelada B1(1).....	80
Figura 24: Comparação entre os experimentos em batelada B3 e B5.....	83
Figura 25: Absorbância, a produção de CO ₂ , concentrações dos substratos e dos metabólitos e produtividade ao longo do cultivo BR1.....	90
Figura 26: A influência da fração do volume de meio retirado na produtividade de PDO do processo em Batelada repetida.	91
Figura 27: Absorbância, a produção de CO ₂ , concentrações dos substratos e dos metabólitos e produtividade ao longo do cultivo BR2.....	92
Figura 28: Influência de “r” na produção de biomassa, na produtividade e nos fatores de conversão.	95
Figura 29: Cultivo em batelada repetida com decantação de células (BR3).....	96
Figura 30: Foto do biorreator no momento da decantação celular.....	97
Figura 31: Concentrações dos substratos residuais e dos produtos em uma das condições C2.....	100
Figura 32: Concentrações dos substratos residuais e dos produtos nas condições C2, C9, C10 e C11.....	100
Figura 33: Concentrações dos substratos residuais e dos produtos nas condições C1, C3, C4, C5, C6, C7 e C8.	101
Figura 34: Concentrações dos substratos residuais e dos produtos nas condições C2 e C12.	102
Figura 35: Mapa metabólico do experimento C1.....	105
Figura 36: Mapa metabólico do experimento C2.....	109
Figura 37: Mapa metabólico do experimento C3.....	110
Figura 38: Mapa metabólico do experimento C4.....	113
Figura 39: Mapa metabólico experimento C5.....	115
Figura 40: Mapa metabólico do experimento C6.....	117

Figura 41: Frequência de agitação e porcentagens de OD e de CO ₂ ao longo do experimento C7.....	119
Figura 42: Mapa metabólico do experimento C7.....	121
Figura 43: Mapa metabólico do experimento C8.....	123
Figura 44: Mapa metabólico experimento C9.....	125
Figura 45: Mapa metabólico experimento C10.....	127
Figura 46: Mapa metabólico experimento C11.....	129
Figura 47: Mapa metabólico experimento C12.....	131
Figura 48: Perfis dos consumos de glicose e glicerol, produção de biomassa, lactato, acetato, etanol, CO ₂ e PDO nas diferentes taxas de diluição.....	135
Figura 49: Razão entre glicose e glicerol consumidos, produtividade de PDO e velocidades de consumo de glicose e glicerol nas diferentes taxas de diluição.....	136
Figura 50: Fatores de conversão de substratos a produtos dos estados estacionários nas diferentes taxas de diluição.....	137
Figura 51: Fatores de conversão de substratos a carbono corrigidos pelo balanço nos estados estacionários nas diferentes taxas de diluição.....	138
Figura 52: Relação entre q_{PDO} e q_{GLR} para cálculo do valor experimental verdadeiro de $Y_{PDO/GLR}$	139
Figura 53: Cálculo de m_S e $Y_{X/GLC}$ nos quimiostatos com diferentes D.....	140
Figura 54: Correlações entre as velocidade específica de formação de produtos e consumo de glicerol e as taxas de diluição testadas.....	141
Figura 55: Fatores de conversão corrigidos pelo balanço de carbono e $Y_{PDO/GLR}$ dos experimentos em quimiostato.....	149
Figura 56: Consumo de substratos e formação de produtos dos experimentos em quimiostato.....	151
Figura 57: Relação entre as produções de PDO e acetato no ensaios em quimiostato...	152
Figura 58: Produtividade específica global e produtividade de PDO dos estados estacionários.....	153
Figura 59: Comparação entre os diferentes tipos de processo.....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais Fermentações em diferentes tipos de processos encontradas na literatura para a produção de PDO em microrganismos.	26
Tabela 2: Experimentos realizados em frascos em <i>shaker</i>	38
Tabela 3: Experimentos realizados em biorreator em Batelada.	40
Tabela 4: Experimentos realizados em Batelada repetida.	41
Tabela 5: Experimentos realizados em processo contínuo (quimiostato).	42
Tabela 6: Influência no tempo de cultivo do pré-inóculo na velocidade máxima específica de crescimento.	49
Tabela 7: Comparação entre bateladas realizadas em frascos com diferentes razões entre glicose e glicerol.	59
Tabela 8: Concentrações de consumo de glicose e glicerol e de produção de LAC, PDO, ACE, CO ₂ e ETH alcançadas em B1.	73
Tabela 9: Concentrações de consumo de glicose e glicerol e de produção de LAC, PDO, ACE, CO ₂ e ETH alcançadas em B2.	75
Tabela 10: Concentrações de consumo de glicose e glicerol e de produção de LAC, PDO, ACE, CO ₂ e ETH alcançadas em B3.	77
Tabela 11: Concentrações de consumo de glicose e glicerol e de produção de LAC, PDO, ACE, CO ₂ e ETH alcançadas em B4.	78
Tabela 12: Consumo de glicose e produção de lactato, acetato, CO ₂ e etanol alcançados na batelada B5.	79
Tabela 13: Parâmetros e variáveis do processo das bateladas B1, B2, B3, B4 e B5 em biorreator.	81
Tabela 14: Balanço de carbono dos experimentos em batelada.	87
Tabela 15: Principais resultados do experimento BR2 em diferentes concentrações de glicerol.	94
Tabela 16: Principais parâmetros calculados no BR3.	98
Tabela 17: Principais resultados de C1 - Consumo de substratos e formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	104
Tabela 18: Principais resultados de C2 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	107
Tabela 19: Principais resultados de C3 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	110

Tabela 20: Principais resultados de C4 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	113
Tabela 21: Principais resultados de C5 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	115
Tabela 22: Principais resultados de C6 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	117
Tabela 23: Principais resultados de C7 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	121
Tabela 24: Principais resultados de C8 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	123
Tabela 25: Principais resultados de C9 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	125
Tabela 26: Principais resultados de C10 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	127
Tabela 27: Principais resultados de C11 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	129
Tabela 28: Principais resultados de C12 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.	131
Tabela 29: Equações estequiométricas encontradas para os doze quimiostatos.	133
Tabela 30: Fatores de conversão corrigidos pelo balanço de carbono dos experimentos em quimiostatos.	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PDO	1,3-Propanodiol
3-HPA	3-Hidroxipropionaldeído
X	Concentração Celular em massa seca (g/L)
Abs ₆₀₀	Absorbância em 600 nm
GLR	Glicerol
GLC	Glicose
LAC	Lactato
ACE	Acetato
ETH	Etanol
q _{PDO}	Produtividade específica global de PDO ($g_{PDO}/g_X \cdot h$)
Q _{GLC}	Consumo específica global de glicose ($g_{GLC}/g_X \cdot h$)
Q _{PDO}	Produtividade do 1,3-propanodiol (g/L.h)
Q _{GLC}	Velocidade de consumo de glicose (g/L.h)
Q _{GLR}	Velocidade de consumo de glicerol (g/L.h)
$\mu_{X,m\acute{a}x}$	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
Y _{PDO/GLR}	Fator de conversão de glicerol a PDO (g_{PDO}/g_{GLR} ou mol_{PDO}/mol_{GLR})
Y _{LAC/GLC}	Fator de conversão de glicose a lactato (g_{LAC}/g_{GLC} ou mol_{LAC}/mol_{GLC})
Y _{ACE/GLC}	Fator de conversão de glicose a acetato (g_{ACE}/g_{GLC} ou mol_{ACE}/mol_{GLC})
Y _{ETH/GLC}	Fator de conversão de glicose a etanol (g_{ETH}/g_{GLC} ou mol_{ETH}/mol_{GLC})
Y _{X/GLC}	Fator de conversão de glicose a células (g_X/g_{GLC} ou mol_X/mol_{GLC})
Y _{LAC/C}	Fator de conversão de carbono a lactato (g_{LAC}/g_C ou mol_{LAC}/mol_C)
Y _{ACE/GLC}	Fator de conversão de carbono a acetato (g_{ACE}/g_C ou mol_{ACE}/mol_C)
Y _{ETH/GLC}	Fator de conversão de carbono a etanol (g_{ETH}/g_C ou mol_{ETH}/mol_C)
Y _{X/GLC}	Fator de conversão de carbono a células (g_X/g_C ou mol_{ETH}/mol_C)
α	Fração de volume retirado do Reator em uma batelada repetida
D	Vazão específica de Alimentação ou taxa de diluição (h^{-1})
CV	Coeficiente de variação (%)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Glicerol e biodiesel.....	20
3.2	3-Hidroxi propionaldeído e 1,3-propanodiol	22
3.3	Produção de 1,3-propanodiol via rota biotecnológica.....	23
3.4	<i>Lactobacillus reuteri</i>	28
3.5	Metabolismo de <i>Lactobacillus reuteri</i>	29
3.6	Produção de PDO por <i>L. reuteri</i> em biorreatores	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	Linhagem celular e meio de cultivo	35
4.2	Preparo do banco de células para cultivos em biorreator	35
4.3	Inóculo.....	36
4.4	Condições de cultivo.....	36
4.4.1	Cultivo em Frasco Agitado (<i>shaker</i>).....	36
4.4.2	Biorreator	38
4.4.3	Cultivo em Batelada.....	40
4.4.4	Cultivo em Batelada Repetida ou Semi Contínuo.....	40
4.4.5	Cultivo em Quimiostato (contínuo)	41
4.5	Metodologia analítica.....	43
4.5.1	Quantificação da Concentração Celular.....	43
4.5.2	Quantificação de metabólitos extracelulares.....	43
4.6	Cálculo dos parâmetros fisiológicos	44
4.6.1	Batelada e Batelada Repetida.....	44
4.6.2	Quimiostato.....	45
4.7	Balanco de carbono, estequiometria das reações e análises dos fluxos metabólicos.....	45
4.8	Análise estatística e tratamento dos dados	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Teste do inóculo	48
5.2	Cultivos com <i>L. reuteri</i> em meio MRS em incubador rotativo	50
5.2.1	Meio MRS acrescido de glicose ou sacarose ou xilose.....	50
5.2.2	Meio MRS acrescido de glicerol.....	51

5.2.3	Meio MRS modificado	54
5.2.4	Meio MRS acrescido de diferentes concentrações de glicose e glicerol.....	59
5.3	Ensaio de tolerância e de toxicidade	62
5.3.1	Tolerância a glicose	62
5.3.2	Tolerância a glicerol.....	63
5.3.3	Toxicidade do Lactato.....	65
5.3.4	Toxicidade do Acetato	66
5.3.5	Toxicidade do etanol.....	69
5.3.6	Análise resultados de tolerância e toxicidade	70
5.4	Experimentos em batelada (biorreator).....	72
5.4.1	Batelada B1	72
5.4.2	Batelada B2	74
5.4.3	Batelada B3	75
5.4.4	Batelada B4	77
5.4.5	Batelada B5	78
5.4.6	Análise da Influência do pH.....	82
5.4.7	Influência do glicerol no metabolismo da <i>L. reuteri</i>	83
5.4.8	Análise do efeito do oxigênio nos experimentos em batelada.....	85
5.4.9	Influência da temperatura nos cultivos em batelada	86
5.4.10	Análise dos resultados em Batelada	86
5.5	Experimentos em batelada alimentada.....	88
5.5.1	Ensaio em processo semi contínuo ou batelada repetida	88
5.5.2	Batelada repetida com variação na fração de meio retirado (BR1)	89
5.5.3	Batelada repetida com variação na concentração de glicerol no meio de cultura (BR2)	91
5.5.4	Batelada repetida com decantação celular (BR3)	95
5.6	Experimentos em quimiostato.....	99
5.6.1	C1.....	102
5.6.2	C2.....	106
5.6.3	C3.....	109
5.6.4	C4.....	111
5.6.5	C5.....	114
5.6.6	C6.....	116
5.6.7	C7.....	118
5.6.8	C8.....	122
5.6.9	C9.....	124

5.6.10	C10	126
5.6.11	C11	128
5.6.12	C12	130
5.7	Reações estequiométricas encontradas nos quimiostatos	132
5.8	Análise da influência da taxa de diluição	134
5.9	Análise da influência do Glicerol Bruto	141
5.10	Efeito do Oxigênio nos cultivos em quimiostato	143
5.11	Efeito do aumento da concentração de glicerol no meio de cultura	144
5.12	Influência das modificações do meio MRS nos experimentos em quimiostatos.....	144
5.12.1	Efeito do aumento das concentrações de glicose e glicerol no meio MRS nos experimentos em quimiostatos	145
5.12.2	Efeito da adição de peptona e dos extratos de levedura e de carne no meio MRS nos cultivos em quimiostatos	146
5.12.3	Efeito do aumento da concentração de nutrientes do meio MRS em 25% nos cultivos contínuos.....	147
5.12.4	Comparação dos ensaios com meio MRS modificado	148
5.13	Produção de PDO em quimiostato.....	148
5.14	Comparação entre os experimentos em batelada, batelada repetida e contínuo	154
6	CONCLUSÕES.....	156
7	SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO	158
8	REREFÊNCIAS	159

1 INTRODUÇÃO

A atual demanda por biocombustíveis e biopolímeros abre espaço para o desenvolvimento de novas pesquisas voltadas para alternativas mais eficientes e econômicas para sua produção. O 1,3-propanodiol (PDO), dentre outras aplicações, é utilizado como um intermediário importante para a produção de polímeros modernos. Uma das possibilidades para geração deste produto se dá através da rota química de compostos petroquímicos. No entanto, uma vez que este processo requer o uso de insumos específicos (catalisadores) e condições de elevadas temperatura e pressão, sua viabilidade econômica é, em parte, comprometida (MAERVOET et al., 2011). Como alternativa, o desenvolvimento de um bioprocesso para a produção do 1,3-propanodiol propiciaria a obtenção deste produto químico (SAINT-AMANS et al., 1994).

A bioconversão do 1,3-propanodiol por microrganismos é realizada, principalmente, através do uso do glicerol (ANP, 2012). Este substrato é gerado em quantidades excessivas, pois é um subproduto da produção de biodiesel. Para cada 90m³ de biodiesel são formados 10m³ de glicerol (MEESTERS; HUIJBERTS; EGGINK, 1996; THOMPSON; HE, 2006). Outrossim, em futuro próximo, a sua quantidade poderá exceder a demanda da indústria, fazendo com que seu custo torne-se irrelevante (ANP, 2012).

Alguns microrganismos dos gêneros da *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* e *Lactobacillus* são capazes de converter naturalmente o glicerol a 1,3-propanodiol. O principal problema é que estes microrganismos, com exceção do *Lactobacillus*, são patogênicos, requerendo um cuidado especial para serem cultivados em escala industrial (KHAN et al., 2013; SAXENA et al., 2009).

Para contornar esse problema, é possível utilizar a tecnologia de engenharia genética, ou seja, transformar geneticamente alguns microrganismos para torná-los produtores do 1,3-propanodiol. Por exemplo, as empresas DuPont e Genencor International possuem uma cepa de *E. coli* geneticamente modificada para este fim (MAERVOET et al., 2011). Essas empresas optaram por um hospedeiro conhecido e facilmente modificável, além de ser bastante utilizado em biotecnologia industrial.

Lactobacillus reuteri, é uma bactéria heterofermentativa, conhecida por habitar o trato intestinal de humanos, suínos, aves e outros animais. As principais vantagens são que este microrganismo (i) é capaz de produzir 3-HPA e PDO, (ii) não é patogênico e (iii) não é geneticamente modificado. A desvantagem é que não cresce em glicerol como única fonte de carbono, por isso a necessidade de uma cofermentação, ou seja, uma mistura de glicerol com um açúcar, para a produção do 1,3-propanodiol (LUTHI-PENG; DILEME; PUHAN, 2002; SAXENA et al., 2009).

A maioria dos trabalhos publicados com o *L. reuteri* tem por objetivo principal a produção do 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), o qual é um intermediário na produção de PDO (DOLEYRES et al., 2005; KRAUTER; WILLKE; VORLOP, 2012; STEVENS et al., 2011; VOLLENWEIDER; LACROIX, 2004). No entanto, existem alguns trabalhos com *Lactobacillus reuteri* voltados para a produção do PDO. Nestes trabalhos as principais variáveis estudadas foram pH, temperatura e razão molar entre glicose e glicerol, de forma a aumentar o rendimento e a produtividade do processo em batelada (LÜTHI-PENG et al., 2002; TOBAJAS et al., 2008; BAEZA-JIMÉNEZ et al., 2011).

Diante disso, o presente trabalho, em parceria com a empresa Braskem e a FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo), se propõe a melhorar a produção do PDO por *Lactobacillus reuteri* modificando o tipo de cultivo em reator, principalmente, a sua forma de operação e entender o metabolismo deste microrganismo através de modificações no meio de cultivo em experimentos em quimiostatos. Os principais resultados obtidos indicam que o cultivo deste microrganismo em batelada repetida e processo contínuo (quimiostato) favorecem a produção de PDO quando comparado a batelada, alcançando produtividades elevadas e ainda não descritas na literatura. Além disso, observou-se que o lactato pode ser o principal subproduto inibitório do processo em quimiostato, dificultando assim alcançar maiores concentrações celulares, consequentemente maior concentração final de PDO.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar diferentes tipos de processo de transformação de glicerol em 1,3-propanodiol através do *Lactobacillus reuteri* em cofermentação de glicose e glicerol, visando aumentar rendimento e produtividade e potencializar sua viabilidade econômica.

A principal estratégia utilizada para tal estudo é modificar a forma de operação do cultivo em reator através de processos como batelada, batelada alimentada, batelada repetida e quimiostato, bem como modificar o meio MRS na tentativa de descobrir qual é o substrato que limita o processo.

Como objetivos específicos, podem ser citados:

- ✓ Realizar cultivos em diferentes fontes de carbono, visando uma possível otimização do meio de cultura;
- ✓ Compreender a fisiologia do *L. reuteri*, realizando cultivos em quimiostato;
- ✓ Compreender o metabolismo deste microrganismo através do balanço de carbono e de análises estequiométricas das vias metabólicas nos cultivos em quimiostato;
- ✓ Estudar a melhor forma de aumentar a produção de PDO e diminuir a produção dos subprodutos utilizando as rotas metabólicas.
- ✓ Encontrar o substrato limitante através dos experimentos em quimiostato a fim de aumentar a concentração celular, consequentemente a produção de PDO.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 GLICEROL E BIODIESEL

A glicerina ou glicerol apresenta características importantes para a indústria em geral (alimentos, bebidas, cosméticos e outros). Na produção de biodiesel, o glicerol é o principal subproduto, sendo que para cada 10 litros de diesel é produzido 1 litro de glicerol bruto (ANP, 2012;2014; DOBSON; GRAY; RUMBOLD, 2012; MEESTERS et al., 1996; THOMPSON; HE, 2006). A Figura 1 mostra a reação de síntese de biodiesel e do glicerol através da transesterificação de óleos vegetais com álcoois (metanol e etanol) através da catálise básica (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Figura 1: Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais.

No Brasil, para promover uma maior utilização do biodiesel e visando atender a questões ambientais, desde 1º de janeiro de 2010 o óleo diesel comercializado em todo o país contém 5% de biodiesel, o chamado B5. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), o qual aumentou de 4% (B4) para 5% (B5) o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel (ANP, 2012).

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com sessenta e quatro plantas produtoras deste combustível e uma capacidade total de produção de 21.957,79 m³/dia. Considerando que há duas unidades em construção e outras quatro já autorizadas pela ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) para o aumento da sua capacidade produtiva e, em um futuro próximo, a produção de biodiesel terá um acréscimo de 6% no volume produzido. Com

isso, a produção anual de biodiesel será de aproximadamente 8,5 bilhões de litros (ANP, 2014).

Destaca-se que os números da produção do biodiesel brasileiro representam a capacidade nominal autorizada pela ANP, pois a demanda pelo biodiesel ainda é menor, como mostrado na Figura 2. No entanto, há uma perspectiva de aumento da demanda, uma vez que existe um plano do governo federal para aumentar o percentual de mistura do biodiesel no óleo diesel (ANP, 2014).

Figura 2: Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP no país. Fonte: ANP, 2014.

Se fossem produzidos 8 bilhões de litros de biodiesel por ano (conforme capacidade nominal), seriam gerados como subproduto cerca de 0,94 bilhões de litros de glicerol somente no Brasil. Este cenário indica que a viabilidade comercial do biodiesel depende em certa medida do consumo deste volume extra de glicerina, fazendo com que seja necessário se buscar aplicações de larga escala para este material (MOTA et al., 2009).

Os produtores de biodiesel tem pouco incentivo para purificar o glicerol bruto, pois o preço do glicerol refinado diminuiu consideravelmente nos últimos 15 anos. Por exemplo, nos EUA, a redução nos preços foi da ordem de US\$ 1/lb para US\$ 0,34/lb (MIN et al., 2010). O preço do glicerol bruto também está continuamente em queda; por exemplo, US\$ 0,20/lb em 2001 para US\$ 0,01/lb em 2006, também nos EUA (DASARI, 2007).

Esta previsão para o excesso de oferta do glicerol no mercado mundial aumentará o declínio do seu valor comercial, podendo haver um retrocesso na indústria

de biodiesel, de forma que o aumento da produção de biodiesel só poderá ser viabilizado economicamente se forem encontradas novas aplicações para o glicerol produzido. Assim, urge a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos e processos derivados de glicerol, visto que, conforme mostram alguns estudos, os custos líquidos de produção de biodiesel do tipo B100 (100% de biodiesel) podem ser reduzidos de US\$ 0,63 por litro para US\$ 0,35 por litro pela agregação de valor ao glicerol (SUAREZ; MENEGHETTI, 2007). Este quadro excesso de oferta abre espaço para problemas de ordem econômica (custo) e mesmo ambiental (descarte). Uma alternativa ao excedente de glicerol gerado é a conversão deste produto em outros compostos com significativo valor agregado, como por exemplo, 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) e 1,3-propanodiol (PDO) (VOLLENWEIDER; LACROIX, 2004).

3.2 3-HIDROXIPROPIONALDEIDO E 1,3-PROPANODIOL

O 3-HPA e o PDO são compostos gerados através da transformação do glicerol, que pode ser feita, tanto química como biologicamente (SAXENA et al., 2009). Recentemente, o metabolismo anaeróbico do glicerol tem sido alvo de interesse por causa da utilização industrial do PDO e do 3-HPA. Vale ressaltar que o glicerol utilizado na fermentação não necessita de uma etapa de purificação, uma vez que estudos mostram que o rendimento em PDO é o mesmo ou próximo quando comparado com o glicerol puro (DOBSON et al., 2012).

O 3-HPA é um composto químico de notável valor usado na preservação de alimentos, produção de polímeros, além de ser precursor de muitos compostos químicos como acroleína, ácido acrílico e 1,3-propanodiol (VOLLENWEIDER; LACROIX, 2004). O composto pode ser obtido tanto pela química tradicional como por fermentação bacteriana. Até o momento, 3-HPA tem sido produzido a partir de recursos petroquímicos como um intermediário na produção de PDO. *In vivo*, o glicerol é convertido em uma única etapa enzimática em 3-HPA através da glicerol desidratase (BIEBL, 1991).

PDO é um composto químico importante para a síntese de polímeros de tereftalatos, cosméticos, adesivos, lubrificantes, solventes e exibe boas propriedades comerciais, como estabilidade, biodegradabilidade e elasticidade (PAGLIARO et al.,

2007; WILLKE; VORLOP, 2008; ZHU, C. J.; FANG, 2013; ZHU, M. M.; LAWMAN; CAMERON, 2002).

A produção química do PDO é feita a partir de derivados de petróleo, como óxido de etileno e acroleína (KNIFTON et al., 2004). A maior síntese de PDO a partir da acroleína é feita pela Degussa/DuPont e, a partir do óxido de etileno, é feita pela Shell (KRAUS, 2008). No entanto, há vários inconvenientes para a utilização dos métodos químicos convencionais, tais como a exigência de elevadas pressão e temperatura, uso de catalisadores de maior custo, liberação de intermediários tóxicos, dependência de materiais não renováveis e baixo rendimento, além da complexidade dos processos de produção.

Embora o PDO seja normalmente produzido através de rota química, há interesse em produzi-lo pela rota biotecnológica. A produção microbiana tem sido alvo de interesse por três principais motivos. Primeiramente, o PDO pode derivar de fontes renováveis como o glicerol e o açúcar, em oposição às fontes de petróleo. Em segundo lugar, a rota biológica gera um produto mais limpo, sem intermediários tóxicos e amplia assim o espectro de sua utilidade. Por fim, com os avanços no campo da engenharia genética, as rotas microbianas podem vir a ser viáveis economicamente (SAXENA et al., 2009).

A DuPont, por exemplo, desenvolveu um processo economicamente viável para a produção de PDO através de *E. coli* geneticamente modificada, utilizando a glicose como fonte de carbono. O fator de conversão obtido com este microrganismo é de 0,62 mol_{PDO}/mol_{GLC}, produtividade igual a 3,5 g/L.h e uma concentração final de PDO de 135 g/L (EMPTAGE et al., 2003; HERMANN; PATEL, 2007; NAKAMURA; WHITED, 2003).

3.3 PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL VIA ROTA BIOTECNOLÓGICA

Biologicamente, o 1,3-propanodiol pode ser produzido pela transformação do glicerol. Muitos microrganismos são conhecidos por transformar o glicerol em 3-HPA e PDO em cultivos anaeróbios (fermentação), incluindo bactérias dos gêneros de *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium* e *Lactobacillus* (BIEBL et al., 1999;

BOUVET et al., 1995; LEJA; CZACZYK; MYSZKA, 2011; WILLKE; VORLOP, 2008; ZENG; BIEBL; DECKWER, 1997).

Em *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria patogênica que tem o metabolismo do glicerol mais bem estudado, foi demonstrado que os genes para as quatro enzimas envolvidas na via do glicerol estão organizados como um agrupamento no cromossomo. Esta unidade genética é denominada *regulon dha*, e homólogos a ela já foram identificados nos genomas de *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum* e em *Lactobacillus reuteri* (SUN et al., 2003). Dentre estes microrganismos, os mais estudados são *C. butyricum* e a *K. pneumoniae*, devido ao alto rendimento e produtividade (WILLKE; VORLOP, 2008).

O metabolismo do glicerol envolve uma via redutiva para converter glicerol a 3-HPA através da enzima glicerol desidratase (DhaB) (EC:4.2.1.30). Este intermediário é então reduzido a 1,3-propanodiol pela enzima 1,3 propanodiol oxidoreductase (EC:1.1.1.202) com consumo de NADH. Na via oxidativa, o glicerol é oxidado a dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase (EC:1.1.1.6) e depois a dihidroxiacetona fosfato por uma dihidroxiacetona quinase (EC:2.7.1.-) (BIEBL et al., 1999), como mostrado na Figura 3.

Figura 3: Rota metabólica do glicerol em *K. pneumoniae*. Fonte: (ZHUGE et al., 2010).

O 3-HPA é um intermediário intracelular que normalmente não é acumulado, mas reduzido a PDO pela 1,3-propanodiol oxidoreductase. Os subprodutos desta fermentação são, principalmente, acetato, etanol, lactato, succinato e 2,3-butanodiol (LUTHI-PENG; DILEME; et al., 2002).

A produção de PDO normalmente ocorre em condições anaeróbias ou microaeróbias e em meios complexos, podendo ser realizada em diferentes modos de operação do reator, como por exemplo, batelada, batelada alimentada e contínuo

(quimiostato). Na literatura, existem muitos trabalhos em batelada e em batelada alimentada, mas poucos artigos de produção de PDO em quimiostato. A maioria dos trabalhos utilizam bactérias do gênero *Clostridium* seguido de *Klebsiella*, sendo ambos os microrganismos considerados os melhores candidatos para a produção do 1,3-propanodiol (KAUR; SRIVASTAVA; CHAND, 2012a;2012b).

Nos cultivos em batelada, há necessidade de otimizar o processo, pois ainda existem restrições econômicas devido aos baixos rendimentos e produtividades do PDO (SAXENA et al., 2009; WILLKE; VORLOP, 2008). Uma das desvantagens desse processo é que pode haver inibição tanto pelo substrato quanto pelos produtos (COLIN, T; BORIES; MOULIN, 2000; COLIN, THIERRY et al., 2001). A Tabela 1 contém os principais resultados quanto aos fatores de conversão de glicerol a PDO ($Y_{PDO/GLY}$), além das produtividades (Q_{PDO}) encontradas para a produção de 1,3-propanodiol por rota microbiológica em diferentes tipos de processos.

Sabendo que 1 mol de glicerol gera 1 mol de 1,3-propanodiol, tem-se um fator de conversão mássico teórico de 0,83 g_{PDO}/g_{GLR} . Como se pode observar na Tabela 1, os maiores $Y_{PDO/GLR}$ alcançados são observados nos cultivos com *Lactobacillus reuteri* e em experimentos realizados em cofermentação.

EL-ZINEY et al. (1998), LUTHI-PENG; DILEME; et al. (2002), SAXENA et al. (2009), KRAUTER et al. (2012) e outros autores denominam cofermentação o processo na qual são misturados glicerol e açúcar no meio de cultivo.

Para o *Lactobacillus* a única forma de cultivo para a produção de PDO se dá através da cofermentação, pois este microrganismo, diferentemente dos demais citados, não utiliza o glicerol como fonte de carbono e energia. Nesta estratégia, a mistura de glicerol e outros açúcares é necessária para a produção de PDO (SAXENA et al., 2009).

Tabela 1: Principais Fermentações em diferentes tipos de processos encontradas na literatura para a produção de PDO em microrganismos.

Tipo de Processo	Microrganismo	$Y_{PDO/GLR}$ (g _{PDO} /g _{GLR})	Q_{PDO} (g/L.h)	Referências
Batelada	<i>C. butyricum</i>	0.51	2.20	(BIEBL et al., 1992)
	<i>C. butyricum</i>	0.62	2.98	(GONZALEZ-PAJUELO; ANDRADE; VASCONCELOS, 2004)
	<i>K. pneumoniae</i>	0.40	2.00	(MU et al., 2006)
	<i>K. pneumoniae</i>	0.51 ^(a)	1.95	(XIU et al., 2007)
		0.57	1.96	
	<i>C. butyricum</i>			(ZHU, C. J.; FANG, 2013)
	<i>C. butyricum</i>	0.55	1.20	(PAPANIKOLAOU et al., 2000)
	<i>L. reuteri</i>	0.70 ^(a)	-	(TOBAJAS et al., 2009)
	<i>L. reuteri</i>	0.78 ^(a)	1.05	(BAEZA-JIMENEZ et al., 2011)
	<i>L. reuteri</i>	-	0.37 ^(a)	(EL-ZINEY et al., 1998)
Batelada Alimentada	<i>L. diolivorans</i>	0.65	0.85 ^(a)	(PFLUGL et al., 2012)
	<i>C. butyricum</i>	0.52	3.30	(WILKENS et al., 2012)
	<i>K. pneumoniae</i>	0.54	1.93	(JIN et al., 2011)
Batelada Repetida	<i>L. diolivorans</i>	0.64 ^(a)	0.46	(PFLUGL et al., 2012)
	<i>C. diolis</i>	0.53	1.04	(KAUR et al., 2012b)
	<i>K. pneumoniae</i>	0.50	3.39 ^(b)	(XUE et al., 2010)
Contínuo	<i>C. butyricum</i>	0.53	10.3	(GONZALEZ-PAJUELO; ANDRADE; VASCONCELOS, 2005)
	<i>K. pneumoniae</i>	-	4.9-8.8	(MENZEL; ZENG; DECKWER, 1997)
	<i>C. butyricum</i>	0.53	3.4 ^(c)	(PAPANIKOLAOU et al., 2000)
	<i>C. butyricum</i>	-	13.3 ^(d)	(REIMANN; BIEBL; DECKWER, 1998)
	<i>C. freundii</i>	0.53	8.2 ^(e)	(PFLUGMACHER; GOTTSCHALK, 1994)
	<i>L. reuteri</i>	-	0.43 ^(a)	(EL-ZINEY et al., 1998)

(a) Cofermentação glicose/glicerol

(b) Batelada alimentada repetida

(c) Processo contínuo em dois estágios

(d) Processo contínuo com reciclo de células

(e) Reator anaeróbio de leito fixo com reciclo de efluente

ABBAD-ANDALOUSSI et al. (1998) estudaram o efeito da cofermentação da glicose e glicerol em cultivos em batelada com *C. butyricum* DSM 5431. Quando cultivado em meio com apenas glicerol, 43% deste substrato foi transformado em ácidos orgânicos e biomassa e os 57% restantes em PDO. Porém, quando cultivada com glicose e glicerol (razão molar igual a 1), 92-93% do glicerol foi convertido em PDO,

aumentando seu fator de conversão $Y_{PDO/GLR}$. Fato esperado, uma vez que a glicose foi a principal fonte de carbono utilizada.

XIU et al. (2007) estudaram o efeito teórico da razão entre glicose e glicerol na produção de PDO por *K. pneumoniae* DSM 2026. Segundo os autores, a priori, a razão máxima de $0,32 \text{ mol}_{GLC}/\text{mol}_{GLR}$ é necessária para a conversão completa do glicerol em PDO sob condições microaeróbias, caso todo glicerol seja desviado para esta via. Os experimentos foram realizados em razões de 0, 0,1 e 0,2 (mol de glicose/mol de glicerol) e o máximo fator de conversão $Y_{PDO/GRL}$ foi de $0,51 \text{ g}_{PDO}/\text{g}_{GLR}$ (razão 0,2). Além disso, a produtividade máxima foi da ordem de $2,05 \text{ g/L.h}$ (razão 0, ou seja, sem glicose no meio de cultura).

PAPANIKOLAOU et al. (2000) utilizaram uma estratégia diferente em relação aos outros estudos para a produção de PDO, a qual consiste em um processo contínuo com duas etapas em biorreator em série. O objetivo da primeira etapa foi alcançar altas produtividades e o da segunda foi aumentar a concentração final PDO. Esta estratégia foi utilizada porque, segundo os autores, não é trivial obter, simultaneamente, uma elevada concentração de PDO e uma alta produtividade. Neste processo, a concentração de PDO, $Y_{PDO/GLY}$ e Q_{PDO} alcançados foram iguais a $41\text{-}46 \text{ g/L}$, $0,53 \text{ g}_{PDO}/\text{g}_{GLR}$ e $3,4 \text{ g/L.h}$, respectivamente.

Pode-se notar também na Tabela 1 que as maiores produtividades encontradas foram em experimentos em processo contínuo, mais especificamente em quimiostato. Dentre os trabalhos citados, destacam-se os de GONZALEZ-PAJUELO et al. (2005), MENZEL et al. (1997), REIMANN et al. (1998) e PFLUGMACHER; GOTTSCHALK (1994) por alcançarem elevadas produtividades e concentrações finais de PDO.

GONZALEZ-PAJUELO et al. (2005) realizaram experimentos em quimiostato com *Clostridium butyricum* VPI 3266 utilizando meio com glicerol como única fonte de carbono. No caso, foi obtida uma concentração final de PDO igual a 30 g/L ; uma produtividade de $10,3 \text{ g/L.h}$ e um $Y_{PDO/GLY}$ por volta de $0,53 \text{ g}_{PDO}/\text{g}_{GLR}$. MENZEL et al. (1997), da mesma forma, cultivaram *K. pneumoniae* em quimiostato, o que resultou em uma concentração final de PDO de $35,2\text{-}48,5 \text{ g/L}$ e produtividade de $4,9\text{-}8,8 \text{ g/L.h}$.

Existem alguns métodos para aumentar a produtividade, como por exemplo processos contínuos com imobilização ou reciclo de células. PFLUGMACHER; GOTTSCHALK (1994) realizaram ensaios contínuos com *Citrobacter freundii*. As células foram imobilizadas em partículas portadoras de poliuretano modificadas PUR 90/16. A

produtividade de PDO alcançada foi igual a 8,2 g/L.h, com $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$. REIMANN et al. (1998) cultivaram *C. butyricum* em processo contínuo com reciclo celular usando módulos de membrana de fibra oca para a produção de PDO. Neste trabalho, a taxa de diluição utilizada foi de $0,5 \text{ h}^{-1}$ e a concentração de PDO alcançada foi igual a 26,5 g/L (foi adicionado 56 g/L de glicerol) e Q_{PDO} foi de 13,3 g/L.h. No entanto, este processo só pode ser executado por um período de tempo curto por causa do entupimento da membrana.

Nos estudos com processo contínuo supramencionados, os microrganismos foram cultivados em um meio de cultura com glicerol como única fonte de carbono e de energia. No entanto, tanto o *Clostridium* quanto a *Klebsiella* são patogênicos, o que requer cuidados especiais no cultivo em escala industrial. Já o *L. reuteri* é uma bactéria não patogênica e oferece um potencial de risco menor para a utilização do glicerol na produção de PDO (KHAN et al., 2013; SAXENA et al., 2009).

Foram encontrados apenas dois artigos com *Lactobacillus* para a produção de PDO em processo contínuo, ambos realizando cofermentação de glicose e glicerol. PASTERIS; DE SAAD (2009) não observaram a produção de PDO em cultivos em anaerobiose com o *Lactobacillus hilgardii*. EL-ZINEY et al. (1998) realizaram cultivos em processo em batelada e em contínuo (quimiostato) com o *L. reuteri* 12002 para avaliar a produção de reuterina (3-HPA) e os demais metabólitos. Segundo os mesmos, o processo em batelada favorece a produção de PDO quando comparado com processo contínuo ($D=0.17 \text{ h}^{-1}$). O fator de conversão de PDO a glicerol foi de $0.3 \text{ g}_{\text{PDO}}/\text{g}_{\text{GLR}}$ em batelada e de $0.17 \text{ g}_{\text{PDO}}/\text{g}_{\text{GLR}}$ em quimiostato.

Para o presente estudo, a produção de PDO foi realizada por *Lactobacillus reuteri*. Esse microrganismo produz lactato como principal metabólito na via da glicose, o qual também representa um produto com interesse industrial.

3.4 LACTOBACILLUS REUTERI

Os *Lactobacillus sp.* são bastante estudados devido a suas propriedades probióticas associadas a benefícios nutricionais e terapêuticos, além de possuir grande capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono e energia para a fermentação (AXELSSON et al., 1989; PARVEZ et al., 2006). Especificamente, o *Lactobacillus reuteri* possui uma ampla gama de hospedeiros e é conhecido por habitar o trato

gastrointestinal de humanos, suínos, aves e outros animais (CASAS; DOBROGOSZ, 2000). Esta bactéria em anaerobiose em meio contendo glicerol é capaz de produzir um composto antimicrobiano de largo espectro, denominado reuterina (TALARICO et al., 1988).

Em geral, são microrganismos não patogênicos e com ampla utilização na indústria alimentícia. No entanto, necessitam de nutrientes complexos para o seu crescimento, incluindo aminoácidos, vitaminas, minerais específicos, ácidos graxos, purinas, pirimidinas, além de extratos de levedura e carne que normalmente são adicionados no meio de cultura (KONINGS, 2002). Sendo assim, o elevado custo do meio é uma limitação significativa para uma maior aplicação desta espécie em larga escala (LI et al., 2010).

Os *Lactobacillus* pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas (LAB) que são bactérias gram-positivas e produzem lactato como o principal ou único produto da fermentação (MADIGAN et al., 2012). Sua fonte primária de energia metabólica é fornecida sob forma de ATP por fosforilação ao nível do substrato (KANDLER, 1983).

As bactérias desse grupo são heterotróficas e consideradas anaeróbias aerotolerantes, ou seja, respiram anaerobicamente, mas podem crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. As LABs são divididas em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas. Normalmente, as homofermentativas convertem carboidratos em lactato usando a via Embden-Meyerhof (a via mais comum da glicólise) e as heterofermentativas produzem lactato e, principalmente, etanol e CO₂, pela via da fosfocetolase (MADIGAN et al., 2012).

3.5 METABOLISMO DE *LACTOBACILUS REUTERI*

O *L. reuteri* é uma bactéria ácido láctica (LAB) heterofermentativa que fermenta açúcar em lactato, CO₂, acetato e etanol. Por ser heterofermentativa, utiliza a via das fosfocetolases (PKP) para a degradação de carboidratos. No entanto, estudos indicam que as linhagens de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 e DSM 20016 utilizam duas vias da glicólise (ARSKOLD et al., 2008; STEVENS et al., 2011). Segundo os autores, essas linhagens utilizam a via das fosfocetolases como rota principal e a via Embden-Meyerhof (EMP) é utilizada como rota alternativa (ARSKOLD et al., 2008; STEVENS et al., 2011).

MORITA et al. (2008) determinaram a sequência completa de genes para a produção de reuterina em *L. reuteri* JCM1112 e, por comparação por análises genômicas com o *Lactobacillus fermentum*, afirmam que esta cepa só utiliza a via das fosfocetolases, uma vez que não possui o gene *pfk* que codifica uma enzima essencial para a via glicolítica, a 6-fosfofrutoquinase - responsável pela transferência de um fosfato do ATP para a frutose-6-fosfato. No entanto, ARSKOLD et al. (2008) confirmaram a presença dos genes de ambas as vias no genoma do *L. reuteri* ATCC 55730. Além disso, para evidenciar que há utilização das duas vias simultaneamente, os autores detectaram atividade nas enzimas frutose-1,6-bifosfato aldolase, fosfofrutoquinase, e fosfoglucoisomerase – enzimas presentes na via EMP e PKP.

A Figura 4 apresenta o metabolismo de açúcares do *Lactobacillus reuteri* baseado nas duas hipóteses, a via PKP está representada pelas linhas pretas tracejadas. A via das fosfocetolases se distingue da EMP principalmente pela enzima chave de clivagem. Na via EMP, a frutose-1,6-fosfato é clivada pela aldolase dando origem ao gliceraldeído-3-fosfato e na via das fosfocetolases, a xilose 5-fosfato é degradada em gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato (acetil-P) pela enzima fosfocetolase (MADIGAN et al., 2012).

O crescimento das bactérias ácido lácticas heterofermentativas em condições anaeróbias em meio contendo apenas glicose é limitado devido a um desequilíbrio redox, que resulta na formação de etanol, o que é energeticamente menos favorável sobre a formação de acetato. A adição de um aceptor de elétrons externo restaura o equilíbrio redox resultando na formação de acetato, ou seja, no ganho de 1 ATP e, consequentemente, maior produção de biomassa (ZAUNMÜLLER et al., 2006).

Em meios de cultura contendo glicerol, também em anaerobiose, o *Lactobacillus reuteri* excreta quantidades elevadas de 3-HPA, um potente inibidor bacteriano (AXELSSON et al., 1989). Este composto em solução aquosa sofre uma dimerização reversível e hidratação, formando uma mistura em equilíbrio de 3-HPA, hidrato de HPA, e dímero de HPA, também chamado reuterina. Como possui a via completa do glicerol, esta espécie também é capaz de produzir 1,3-propanodiol (VOLLENWEIDER; LACROIX, 2004).

crescimento e produção de biomassa em relação ao cultivo em meio como apenas um açúcar (EL-ZINEY et al., 1998; ZAUNMÜLLER et al., 2006).

Apesar do glicerol não ser utilizado como fonte de carbono e energia para *Lactobacillus reuteri*, estudos comprovam que o metabolismo do glicerol é acoplado com a fermentação da glicose, pois altera o perfil dos metabólitos da via glicolítica. De fato, diferenças substanciais foram observadas durante os cultivos com a glicose na ausência ou na presença de glicerol (EL-ZINEY et al., 1998; LUTHI-PENG; DILEME; et al., 2002; TOBAJAS et al., 2009)

3.6 PRODUÇÃO DE PDO POR *L. REUTERI* EM BIORREATORES

Muitos dos artigos sobre cultivos de *Lactobacillus reuteri* encontrados na literatura são voltados para a produção de 3-HPA. VALDEZ et al. (1997) cultivaram *L. reuteri* CRL 1100 em aerobiose e em anaerobiose usando cofermentação com maltose e glicerol em diferentes pHs (4,7; 5,5 e 6,5). O meio de cultura utilizado continha em g/L: 15 peptona; 10 triptona; 10 extrato de levedura e 1mL de Tween 80; 10g/L Glicerol e 10 g/L de Maltose. Os cultivos foram realizados em um biorreator com volume útil de 550 mL, a 37°C e 250 rpm. Os ensaios em condições anaeróbias foram continuamente borbulhados com 60 mL/min de N₂ e sob condições aeróbias foi injetado ar comprimido a 0,8 L/min por litro de meio. Os autores afirmaram que nos cultivos em aerobiose, em todos os pHs testados, o principal produto foi o lactato seguido de acetato. Já em anaerobiose, houve produção de PDO, além de lactato, acetato e etanol. O PDO foi o principal produto nos pHs 5,5 e 6,5. As altas concentrações de acetato e baixas concentrações de etanol encontrados nos cultivos em anaerobiose foram intimamente relacionadas à síntese de PDO.

TOBAJAS et al. (2007) estudaram a produção de reuterina (3-HPA) por *Lactobacillus reuteri* em duas etapas de fermentação em batelada. Na primeira etapa, as células crescem em meio com glicose em anaerobiose, já na segunda a reuterina é produzida com as células em repouso em meio contendo glicerol. A fim de maximizar a produção de biomassa (etapa 1), foi avaliado o efeito do pH (5,0–6,5) e da temperatura (31–43°C). A linhagem utilizada foi o *L. reuteri* PRO 127 cultivado em meio MRS (deMan, Rugosa e Sharpe) com 20 g/L de glicose, frequência de agitação de 250 rpm e aspergida

com N₂ para alcançar condições anaeróbias. Os melhores resultados obtidos ocorreram na condição de temperatura de 40°C e pH igual a 5,5.

O mesmo grupo também avaliou o efeito da cofermentação de glicose/glicerol por *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272 e observaram que este microrganismo produziu 3-HPA e PDO com rendimentos consideráveis. Os cultivos foram realizados em meio MRS em biorreator com volume de 1,0 litro, 250 rpm, 40°C e pH de 5,5 sob condições anaeróbias (injeção de N₂). As concentrações de substrato que resultaram em uma maior produção de PDO foram com 100 mM (18 g/L) e 200 mM (18,4 g/L) de glicose e de glicerol, respectivamente. A máxima concentração de PDO encontrada foi de 170,7 mM (12,9 g/L), representando uma rendimento global em massa de 70% de PDO em relação à concentração inicial de glicerol. Para a produção do 3-HPA esta razão molar entre glicose e glicerol foi de 0,33, fato esperado uma vez que a glicose reduz o 3-HPA em PDO, ou seja, uma menor razão molar entre glicose e glicerol favorecerá a produção de 3-HPA (TOBAJAS et al., 2009).

BAEZA-JIMENEZ et al. (2011) cultivaram *L. reuteri* 12002 em meio MRS com diferentes concentrações de glicose e de glicerol no meio. A razão molar entre glicose e glicerol que permitiu a maior produção de PDO foi de 0,5 (100 mM de glicose com 200 mM de glicerol). Os cultivos foram realizados em batelada em biorreator de 1 litro a 37°C, 250 rpm, pH de 5,5 sob condições anaeróbias com fluxo contínuo de nitrogênio. O fator de conversão de glicerol a PDO em massa foi de 0,78 g_{PDO}/g_{GLR}.

Estes resultados mostram que as principais variáveis de cultivos em batelada para a cofermentação de glicose e glicerol para o *L. reuteri* estão bem estabelecidas. No entanto, para outros tipos de processos, existem poucos trabalhos descritos.

EL-ZINEY et al. (1998) realizaram cultivos em processo em batelada e em modo contínuo (quimiostato) com a *L. reuteri* 12002 para avaliar a produção de reuterina (3-HPA) e os demais metabólitos. A cofermentação em batelada com meio MRS continha 60 mM (10,8 g/L) de glicose com 150 mM (13,8 g/L) de glicerol e as células apresentaram uma velocidade máxima específica de crescimento 67% maior e alcançaram uma concentração celular 14% maior que no cultivo com apenas glicose como fonte de carbono. Segundo os autores, a processo em batelada favorece a produção de PDO quando comparado com processo contínuo.

Segundo LUTHI-PENG; SCHARER; PUHAN (2002) e DOLEYRES et al. (2005), o substrato glicose reduz (regeneração NADH) o 3-HPA em PDO. Uma vez que no processo

contínuo o substrato limitante (neste caso, a glicose) está sempre em baixas concentrações, o experimento favoreceu a produção de 3-HPA e prejudicou a produção de PDO. Esta informação é importante, pois indica que a produção de PDO depende da concentração residual de glicose no meio reacional. Quando o produto de interesse é o 3-HPA, geralmente, o processo é feito em duas etapas constituídas de crescimento do microrganismo e a outra para a biocatálise do glicerol em 3-HPA. Em ambas as etapas, no meio reacional ou não há glicose ou então deve-se utilizar um quelante como a semicarbazida que se liga por uma reação secundária no 3-HPA, diminuindo a disponibilidade do mesmo e dificultando a sua redução a PDO (KRAUTER et al., 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM CELULAR E MEIO DE CULTIVO

A linhagem utilizada neste trabalho foi o *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272 obtida da coleção de culturas tropicais Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil). Esta bactéria foi cultivada em meio MRS (Difco, EUA), cuja composição por litro é: peptona (10 g), extrato de carne (8 g), extrato de levedura (4 g), fosfato de potássio dibásico (2 g), diamônio hidrogênio citrato (2 g), acetato de sódio (5 g), sulfato de magnésio (0,2 g), sulfato de Manganês (0,05 g) e 20 g (100 mM) glicose. Todos os experimentos em biorreator foram realizados com o meio MRS (Difco).

Alguns cultivos em frascos foram realizados com meio elaborado em laboratório, tendo a mesma composição do meio MRS (Difco), aqui denominado de MRS (Lab). Esta composição foi: Peptona (Merck, EUA), Extrato de carne (Merck, EUA), Extrato de levedura (Merck, EUA), Fosfato de potássio dibásico (JT Baker), diamônio hidrogênio citrato (JT Baker), acetato de sódio (JT Baker), Sulfato de magnésio (JT Baker), Sulfato de Manganês (JT Baker) e glicose (Merck, EUA).

A concentração de glicerol (Merck, EUA) utilizada na maior parte dos cultivos, tanto nos meio MRS (Difco) quanto no meio MRS (Lab), foi de 15 g/L. Também foi utilizado glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel à partir de mamona cedido gentilmente pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

A concentração de xilose (Sigma) e sacarose (Sigma) foi de 20 g/L, utilizada no cultivo com diferentes fontes de carbono. Exclusivamente nestes ensaios a glicose do meio MRS (Lab) foi substituída por estes açúcares.

4.2 PREPARO DO BANCO DE CÉLULAS PARA CULTIVOS EM BIORREATOR

Para o estoque do microrganismo *L. reuteri*, uma colônia foi retirada direto da placa em meio sólido e cultivada em meio MRS (Difco, EUA) com adição de 15 g/L de glicerol (Merck, EUA) em frascos Erlenmeyer (volume total de 500 mL e com um volume útil de 200 mL). Após a inoculação, os frascos foram colocados em um incubador

rotativo (*shaker*) (modelo TE 421, Tecnal, Brasil) a 50 rpm e 37°C por 16 horas (fase exponencial).

As células foram então centrifugadas por 10 minutos a 4000 g em centrífuga (Modelo 5804R, Eppendorf, EUA) e em seguida foram adicionados 20% (v/v) de glicerol e 80% (v/v) de meio MRS (Difco) com 15 g/L de glicerol. Na sequência, adicionou-se em cada criotubo 1 mL de suspensão com bactéria suficiente para inocular 200 mL de meio com uma DO inicial de 0,1. O congelamento foi feito em etapas, ou seja, primeiramente as cepas foram colocadas no freezer a uma temperatura de -20°C por um período de 12 horas, depois foram transferidas para um freezer a uma temperatura de -80°C.

4.3 INÓCULO

Os inóculos foram preparados em frascos *Erlenmeyer* com volume total de 500 mL e com um volume útil de 200 mL. Cada frasco foi inoculado com 1 criotubo (estoque), ou seja, com uma densidade óptica ($\lambda=600$ nm) de aproximadamente 0,1 e mantidos durante um período de 6 horas a 37°C a 50 rpm. Este período de tempo foi estabelecido neste trabalho.

Antes de inocular, foi necessário determinar a concentração celular de cada frasco para adicionar a quantidade de células necessárias no biorreator (ou frasco). A concentração celular para o inóculo nos experimentos também foi representada pela densidade óptica ($\lambda=600$ nm) final igual a 0,1.

4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.4.1 Cultivo em Frasco Agitado (*shaker*)

Para conhecer melhor o metabolismo do *Lactobacillus reuteri* e sua capacidade de conversão de glicose e glicerol, realizou-se experimentos em frascos. Todos estes testes foram feitos em *shaker* a 37°C e 50 rpm em meio MRS (Difco ou Lab). O crescimento microbiano foi acompanhado pela medida de absorbância a 600 nm (Abs_{600nm}), geralmente, de hora em hora. As amostras foram filtradas a 0,22 μ m e o filtrado foi

utilizado para a quantificação dos substratos e metabólitos ao longo do cultivo. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Como ensaio preliminar foi realizado um conjunto de experimentos com MRS (Lab) com diferentes fontes de carbono, dentre elas: a glicose, a sacarose e a xilose. A concentração final de cada uma delas foi de 20 g/L.

Foram realizados também experimentos com meio MRS sem glicose e com adição de glicerol e em meio MRS sem glicose e sem glicerol.

Para os testes de toxicidade do PDO, lactato, acetato e etanol, foi adicionada em cada frasco, com exceção dos controles, uma determinada concentração de cada um dos compostos no meio MRS (Difco) (Tabela 2). O lactato e o etanol foram filtrados a 0,22 µm e adicionados após a esterilização do meio. Isto porque o lactato, quando esterilizado juntamente com o meio, precipita e o etanol evapora.

O acetato está presente no meio MRS, portanto foi realizado um experimento com MRS (Lab) sem acetato. Com isso, pode observar a influência deste componente no meio.

Os experimentos para análise da tolerância à glicose e ao glicerol foram realizados em meio MRS (Difco) com adição dos mesmos na concentração desejada. A Tabela 2 mostra todos os experimentos realizados, com os seus respectivos meios de cultura utilizados.

Tabela 2: Experimentos realizados em frascos em *shaker*.

Experimentos	Meio de cultura
Teste do Pré-inóculo	MRS (Difco) adicionado de 15 g/L de glicerol
Curva de crescimento em MRS	MRS (Difco)
Análise da influência do glicerol	MRS (Difco) acrescido de 15 g/L de glicerol
Curva de crescimento em MRS sem glicose	MRS (Lab) sem adição de glicose
Curva de crescimento em apenas glicerol	MRS (Lab) sem adição de glicose, porém com adição de 15 g/L de glicerol
Curva de crescimento em MRS sem acetato	MRS (Lab) sem adição de acetato
Curva de crescimento em diferentes fontes de carbono	MRS (Lab) com a adição de 20 g/L de Glicose ou Sacarose ou Xilose
Aumento das concentrações de glicose e glicerol no meio	MRS (Difco) com diferentes concentrações de glicose e glicerol: 20; 27; 36 e 45 g/L de cada substrato.
Tolerância a glicose	MRS (Difco) com diferentes concentrações de glicose: 25; 30 e 35 g/L
Tolerância ao glicerol	MRS (Difco) com diferentes concentrações de glicerol: 15, 20, 25; 30 e 35 g/L
Toxicidade do PDO	MRS (Difco) com diferentes concentrações de PDO: 7,5; 15; 22,5 e 30 g/L
Toxicidade do Lactato	MRS (Difco) com diferentes concentrações de lactato: 4; 6 e 8 g/L
Toxicidade do Acetato	MRS (Difco) com diferentes concentrações de acetato: 6; 7 e 8 g/L
Toxicidade do Etanol	MRS (Difco) com diferentes concentrações de etanol: 1; 2,5 e 4 g/L

4.4.2 Biorreator

Foi utilizado biorreator da marca Infors (Suíça), modelo Labfors 4, com dorna de 3 L, equipado com controladores de frequência de agitação, pH, temperatura e oxigênio dissolvido. A fração molar de CO₂ no gás de saída do reator foi determinada por um analisador de gás de O₂/CO₂ também da Infors. A análise do oxigênio foi feita por um sensor com células de óxido de zircônio e do gás carbônico, por espectrometria na faixa do infravermelho. Os dados gerados foram armazenados e apresentados graficamente pelo software IRIS (Infors, Suíça). A Figura 5 ilustra o biorreator juntamente com seus acessórios utilizados nos experimentos.

Figura 5: Foto do biorreator e seus acessórios para o funcionamento do processo contínuo e da batelada repetida.

No decorrer deste projeto, o biorreator foi operado em experimentos em regime descontínuo (batelada), batelada repetida e em contínuo. Todos os tipos de cultivos compreenderam as seguintes etapas: calibração do eletrodo de pH; esterilização do reator; estabilização da temperatura de cultivo; calibração do eletrodo de oxigênio dissolvido; calibração do analisador de gás; inoculação e cultivo com amostragens periódicas.

A etapa de preparo do biorreator, antes da esterilização, é um processo importante, pois o reator deverá ir para a autoclave da mesma forma como ele deverá ser operado posteriormente. Ou seja, deverá ser autoclavado com o meio de cultura, com os eletrodos e com todas as conexões necessárias, assim diminuem as chances de contaminação por outros microrganismos.

Após a esterilização do mesmo, esperou-se um tempo de 5 horas para a polarização do eletrólito do eletrodo de oxigênio. Só assim o eletrodo permaneceu estável e pode ser calibrado. Com o eletrodo calibrado nas condições do experimento, o reator foi inoculado.

Para a realização do cultivo em processo contínuo e batelada repetida foi necessária a montagem de um sistema para atender as exigências destes processos. Este sistema incluiu um frasco para a alimentação de meio fresco, cujo fluxo foi controlado por uma bomba peristáltica da marca Gilson (modelo miniplus 3, EUA), o biorreator e um frasco para coleta do caldo fermentado. Para o contínuo, a coleta do caldo foi realizada por intermédio de um tubo posicionado de forma a manter um volume constante no fermentador. Este dispositivo faz com que o excesso de volume do líquido

seja retirado do sistema por uma bomba peristáltica Gilson (modelo miniplus 3, EUA) para um frasco de saída.

Além disso, um manômetro media constantemente a pressão dentro do reator e o controle de pH durante os cultivos foi realizado com KOH (3 M) e com H₃PO₄ (3 M).

4.4.3 Cultivo em Batelada

Como ensaios preliminares, foram realizados diferentes experimentos em batelada. Todos esses foram realizados em meio MRS (Difco) com 15 g/L de glicerol, com exceção de B5. O volume de trabalho utilizado foi de 1,5 L e a frequência de agitação a 150 rpm. As principais diferenças na condição de cultivo estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Experimentos realizados em biorreator em Batelada.

Experimento	Meio de Cultura	Condições de cultivo
B1	MRS com glicerol	Anaerobiose; 37°C; pH=6,2
B2*	MRS com glicerol	Anaerobiose; 37°C; pH=5,5
B3	MRS com glicerol	Microaerobiose (AR comprimido); 37°C; pH=5,5
B4	MRS com glicerol	Anaerobiose; 30°C; pH=5,5
B5	MRS	Microaerobiose (AR comprimido); 37°C; pH=5,5

*Experimento realizado em triplicata.

Foram realizados 3 repetições do experimento B2 para avaliar a reprodutibilidade dos dados.

4.4.4 Cultivo em Batelada Repetida ou Semi Contínuo

Foram realizados 3 experimentos em batelada repetida. Todos esses foram realizados em meio MRS (Difco) com 15 g/L de glicerol a 37°C, 1,5 L, 150 rpm com injeção de 0,75 L/min de nitrogênio, as principais modificações na condição de cultivo estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Experimentos realizados em Batelada repetida.

Experimento	Condições de cultivo
BR1	pH=5,5, variação do volume de meio retirado do reator (α)
BR2	pH=5,5, variação na concentração de glicerol no meio de reposição de 15, 20, 30 a 50 g/L
BR3	pH variado, alterações na concentração inicial de células por decantação

4.4.5 Cultivo em Quimiostato (contínuo)

Foram realizados experimentos em quimiostato a 37°C, pH 5,5 e 1,5 L de volume útil com injeção de 0,75 L/min de gases – N₂ para cultivos em anaerobiose e Ar/O₂ para cultivos em microaerobiose. O meio utilizado foi o MRS (Difco) com adição de glicose (em alguns casos) e de glicerol. A Tabela 5 apresenta esses experimentos em quimiostato juntamente com as suas condições de cultivo.

Tabela 5: Experimentos realizados em processo contínuo (quimiostato).

Quimiostato	Condições padrões: 37°C, pH 5,5 e fluxo de gases 0,75 L/min				
	Meio de cultura	r (mol _{GLC} /mol _{GLR})	D (h ⁻¹)	Anaerobiose / Microaerobiose	Frequência de agitação (rpm)
C1	MRS com 21 g/L de glicose e 24 g/L de glicerol	0,45	0,25	Anaerobiose	150
C2	MRS com 15 g/L de glicerol (Condição controle)	0,63	0,50	Anaerobiose	150
C3	MRS com 15 g/L de glicerol	0,55	0,65	Anaerobiose	150
C4	MRS com 15 g/L de glicerol	0,55	0,75	Anaerobiose	150
C5	MRS com 15 g/L de glicerol	0,60	0,90	Anaerobiose	150
C6	MRS com 15 g/L de glicerol BRUTO	0,56	0,50	Anaerobiose	150
C7	MRS com 25 g/L de glicerol	0,34	0,50	Microaerobiose (Injeção de O₂)	150 a 300
C8	MRS com 25 g/L de glicerol	0,32	0,50	Anaerobiose	150
C9	MRS com 25 g/L glicose e 23 g/L glicerol	0,59	0,50	Anaerobiose	150
C10	MRS com 34 g/L glicose e 29 g/L glicerol	0,64	0,50	Anaerobiose	150
C11	MRS com 24 g/L de glicose, 22 g/L glicerol e 15 g/L de extrato de carne e peptona e 10 g/L de extrato de levedura	0,56	0,50	Anaerobiose	150
C12	MRS concentrado (125% em massa)	0,64	0,50	Anaerobiose	150

4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.5.1 Quantificação da Concentração Celular

Nos cultivos em frascos, a concentração celular foi indiretamente calculada pela absorbância a 600 nm (Abs_{600}) em espectrofotômetro (Bio 50, Varian Carry, EUA). Nos cultivos em biorreator, além da leitura de absorbância, a concentração celular também foi determinada pela medida de massa seca de células (na fase em batelada). As amostras com absorbância maior que 0,4 foram diluídas no próprio meio. Para determinar a concentração celular através da leitura de absorbância foi feita uma curva de correlação entre as duas grandezas.

Para determinar a massa seca das células, parte do volume da amostra foi filtrada a vácuo em membrana de 0,22 μ m (Milipore) previamente seca e pesada. A secagem completa da membrana (com e sem células) foi feita em micro-ondas numa potência de 180 W por 15 min. A diferença entre as massas corresponde ao peso em massa de células retidas na membrana. Em suma, a razão entre a massa encontrada e o volume de amostra filtrado resulta a concentração celular total em gramas de massa seca por litro (g/L). Para que essa determinação fosse precisa, foi utilizado um volume de amostra suficiente para que a massa seca de células retidas na membrana estivesse entre 25 e 40 mg (OLSSON; NIELSEN, 1997).

4.5.2 Quantificação de metabólitos extracelulares

As amostras, retiradas do cultivo, foram filtradas por pressão positiva em filtros com porosidade de 0,22 μ m (Millipore) para a separação das bactérias do sobrenadante. As análises para a quantificação de glicose, acetato, glicerol, lactato, PDO e etanol foram realizados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC, Shimadzu, Japão). Estes compostos foram separados por uma coluna de exclusão iônica (Biorad, modelo Aminex HPX-87H, EUA) a 60°C com uma vazão de 0,6 mL/min de uma solução de H_2SO_4 (2 mM) como fase móvel. A detecção foi realizada por índice de refração (Shimadzu, Japão) a 410 nm.

O 3-HPA também pode ser quantificado por cromatografia líquida de alta performance pelo mesmo método trocando-se a fase móvel por uma solução de 10 mM de H_2SO_4 (CLEUSIX et al., 2007). No entanto, esta análise não foi realizada, pois não há padrão disponível comercialmente.

Nas análises dos diferentes experimentos realizados, alguns compostos não identificados por comparação com padrões conhecidos, foram classificados como possíveis candidatos a 3-HPA. Estes compostos então foram submetidos a uma análise por espectrometria de massas do tipo LC TOF (Shimadzu) com fonte de ionização do tipo ESI operando no modo positivo e negativo. O modo de análise foi o de varredura na faixa de massa de 50 a 500 Da. Porém, analisando o espectro de massas dos compostos nenhum foi identificado como o 3-HPA.

4.6 CÁLCULO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

4.6.1 Batelada e Batelada Repetida

O término de cada batelada foi determinado pelo esgotamento do glicerol no meio, com exceção de B5, com o objetivo de obter valores máximos de PDO.

A velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{X,\text{máx}}$) foi determinada ajustando o logaritmo da concentração celular *versus* o tempo. No trecho retilíneo pode-se calcular o $\mu_{X,\text{máx}}$ que é o coeficiente angular da reta.

Os fatores de conversão $Y_{X/\text{GLC}}$, $Y_{\text{PDO}/\text{GLY}}$, $Y_{\text{LAC}/\text{GLC}}$, $Y_{\text{ACE}/\text{GLC}}$ e $Y_{\text{ETH}/\text{GLC}}$ foram determinados pela regressão linear da “concentração dos produtos” *versus* “concentração dos reagentes” no intervalo de tempo da batelada.

A produtividade (Q_{PDO}) foi determinada pela razão entre variação da concentração de PDO (Δ_{PDO}) e o intervalo de tempo correspondente ao fim da batelada. Da mesma forma foram calculados a velocidade de consumo global de glicose e glicerol (Q_{GLC} e Q_{GLY}), no entanto pela razão entre o consumo de glicose (ou glicerol) e o intervalo de tempo.

A velocidade específica global de produção (q_{PDO}) foi calculada pela razão entre a produtividade de PDO (Q_{PDO}) e a biomassa formada.

Para os experimentos em batelada repetida, os cálculos foram realizados da mesma forma.

4.6.2 Quimiostato

Por definição, em quimiostato, o valor de μ_x (velocidade específica de crescimento) no estado estacionário é igual ao valor da taxa de diluição (D).

Os fatores de conversão no modo contínuo, diferentemente do cálculo para a batelada, foram calculados pela razão entre as concentrações dos produtos e o consumo de substratos, ambos em estado estacionário.

Os fatores de conversão de carbono a produtos foram calculados pela razão entre as concentrações dos produtos e o consumo de total carbono, que representa o consumo de carbonos advindos tanto da glicose quanto da peptona e dos extratos de levedura e carne. Estes valores foram obtidos através dos balanços de carbono.

A velocidade específica global é a razão entre a produtividade e a biomassa. Q_{PDO} , Q_{GLC} e Q_{GLY} foram calculados pela multiplicação da concentração de PDO ou da concentração residual de glicose ou glicerol no estado estacionário por D.

A velocidade específica global de produção (q_{PDO}) foi calculada pela razão entre a produtividade de PDO (Q_{PDO}) e a biomassa alcançada no estado estacionário.

4.7 BALANÇO DE CARBONO, ESTEQUIOMETRIA DAS REAÇÕES E ANÁLISES DOS FLUXOS METABÓLICOS

O balanço de carbono foi estabelecido com base no número de elétrons e átomos de carbono por mol, assumindo uma composição de biomassa igual a $C_4H_7O_2N$, correspondente a um peso molecular igual a 101 g/mol (CHEN et al., 2003; XIU et al., 2007).

O meio MRS é um meio complexo, sendo assim existem outras fontes de carbono além da glicose, oriundos da peptona, dos extratos de carne e de levedura. O balanço para os experimentos foi baseado na lei de conservação das massas, considerando que o glicerol produz PDO e que a glicose (e outras fontes de carbono com exceção do glicerol) gera biomassa, lactato, acetato, etanol e CO_2 .

Para os experimentos em quimiostato, o balanço de carbono é melhor apresentado, uma vez que em estado estacionário não há alteração das concentrações de substratos e produtos com o tempo. Sendo assim, conhecendo as concentrações de glicose consumida e de produtos gerados, foi possível calcular quanto de carbono foi utilizado de fontes não conhecidas. Também foi possível encontrar um modelo para representar a estequiometria das reações de consumo de glicose e de glicerol.

No metabolismo do *L. reuteri*, sabe-se que os seis carbonos (6C) da glicose são quebrados (através da via das fosfocetolases) em CO₂ e em xilose 5-fosfato (5C) na mesma proporção molar (1:1). Este, por sua vez é quebrado em acetil-fosfato (2C) e em gliceraldeído-3-fosfato (3C). O acetil-fosfato pode gerar acetato ou etanol e o gliceraldeído-3-fosfato que conseqüentemente é transformado em piruvato que dá origem ao lactato, conforme equações 1, 2 e 3.

A quantidade em mols de CO₂ e lactato, teoricamente, deve ser a mesma da soma das quantidades em mols de acetato e etanol gerados. Para os balanços e os mapas metabólicos, assumiu-se que somente a glicose foi responsável pela formação de acetato e etanol. Sendo assim, a formação de biomassa e as quantidades “extras” de lactato e de CO₂ produzidas admitiu-se serem formadas por fontes de carbono oriundas da peptona e dos extratos de carne e de levedura.

A quantidade em mols de glicerol consumida deve ser teoricamente igual a quantidade de PDO formado, na proporção molar de 1:1.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA E TRATAMENTO DOS DADOS

Todos os conjuntos de experimentos realizados em frascos (*shaker*) tiveram fins comparativos. Uma vez que foram realizados em duplicata, os dados experimentais obtidos foram dispostos em gráficos em função do tempo. Os dados das duas repetições foram dispostos em apenas um gráfico. Com isso, foi possível calcular os parâmetros

fisiológicos (velocidade específica máxima de crescimento e fatores de conversão) através de Regressão Linear obtida com auxílio do software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EUA). Da mesma forma, os dados dos cultivos em bateladas com repetições foram tratados da mesma maneira.

Porém, para a análise estatística das variáveis como concentração celular máxima e produtividade para todos os tipos de cultivo, foi aplicado um teste de hipóteses sobre as médias através de Análise de Variância (ANOVA).

O nível de significância (α) adotado para este trabalho foi de 5%, ou seja, a probabilidade de cometer um erro do tipo 1, no qual se caracteriza por rejeitar uma hipótese quando, de fato, ela é verdadeira e não deveria ser rejeitada (LEVINE; BERENSON, 2005). Também para operacionalização da ANOVA fez-se uso do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EUA).

Esse software, como outros de estatística, apresentam como resultados o método do p-valor para estes testes de hipóteses. O p-valor é conhecido como nível observado de significância, que representa o menor nível a partir do qual a hipótese nula pode ser rejeitada para um determinado conjunto de dados (LEVINE; BERENSON, 2005). A regra de decisão para rejeitar a hipótese nula no método p-valor é:

- Se o p-valor for maior ou igual a α , a hipótese nula não é rejeitada.
- Se o p-valor for menor que α , a hipótese nula é rejeitada.

O critério adotado para determinar o estado estacionário dos cultivos em quimiostato foi avaliar variáveis tais como a concentração residual de glicose e de glicerol, e a concentração de células decorridos cinco tempos de residência (razão entre o volume útil do reator e a vazão de alimentação). Para isso foi calculado o coeficiente de variação (cv) das amostras.

O critério adotado para estabelecer o estado estacionário dos cultivos em quimiostato foi através da constância dos componentes do meio (concentração residual de glicose e glicerol; formação de PDO, lactato, acetato, etanol e biomassa) em pelo menos dois tempos de residência. Pelo menos três amostras foram retiradas ao longo desses tempos de residência, e se o coeficiente de variação fosse superior a 10%, o processo não era considerado em estado estacionário (TSENG; MONTVILLE, 1992).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DO INÓCULO

Com o objetivo de minimizar a variação entre os cultivos e padronizá-los, foi realizado um experimento para analisar a influência do tempo de cultivo do pré-inóculo. Assim, pode-se determinar o momento ideal para se iniciar um novo cultivo.

Os pré-inóculos foram cultivados por 12 horas e nos tempos 6, 8 e 11 horas foram retiradas alíquotas necessárias para inocular os novos frascos, chamados de Inóculo 6 hs (I6), Inóculo de 8 hs (I8) e Inóculo de 11 hs (I11).

Pode-se observar (Figura 6) que os cultivos I11 e o pré-inóculo possuem uma fase *lag* maior que os demais. A fase *lag* extensa do pré-inóculo é explicável, uma vez que as células estavam congeladas e demoram a se adaptar. Quanto ao I11, isso ter ocorrido pelo fato de que as células que deram origem a este ensaio (pré-inóculo com 11hs de cultivo do) já estavam na fase estacionária.

Figura 6: Influência do tempo de cultivo do Pré-inóculo no crescimento celular.

Os melhores resultados quanto a velocidade máxima específica de crescimento e concentração máxima foram os cultivos feitos com o pré-inóculo cultivado por 6 e 8 horas, como mostrado na Tabela 6. Os cultivos foram realizados em duplicata e o desvio da média foi calculado para cada parâmetro / variável.

Tabela 6: Influência no tempo de cultivo do pré-inóculo na velocidade máxima específica de crescimento.

	Pré-inóculo	I6	I8	I11
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,85±0,03	0,91±0,02	0,85±0,04	0,75±0,04
Abs_{600 máx}	10,7	12,4	12,1	11,8
Fase exponencial (hs)	2 a 7	0 a 4	0 a 4	2 a 6

As células do pré-inóculo em 6 horas estavam na fase exponencial de crescimento, por isso I6 apresentou um resultado positivo. Estatisticamente, não há diferenças significativas entre os $\mu_{\text{x,máx}}$ do I6 e I8, também não há entre o I8 e o I11. Porém, o I6 e o I11 são diferentes. Este fato indica que o melhor momento para se iniciar um novo experimento é cultivando o pré-inóculo por 6hs. A partir deste experimento, todos os ensaios foram feitos desta maneira.

Esses ensaios também foram úteis para analisar o comportamento das células nestas condições de cultivo. Observa-se que as células saem da fase exponencial de crescimento e continuam crescendo por algumas horas até entrarem na fase estacionária.

Segundo SCHMIDELL et al. (2001), este comportamento é comum em algumas situações. Uma delas é quando existem duas fontes de carbono no meio de cultura. Ou seja, o fim da fase exponencial representa o fim de uma fonte de carbono mais acessível para a célula. Porém, como há outra fonte de carbono disponível, as células continuam crescendo com uma velocidade menor, até que ambos os substratos se esgotam e as células entram em fase estacionária.

Especificamente para estes experimentos, dificilmente as células saíram da fase exponencial por falta de fonte de carbono, uma vez que nesta fase ainda restavam mais de 10 g/L de glicose no meio de cultivo.

Uma outra situação que causaria este comportamento, seria por inibição de algum metabólito produzido pela célula. Ou até mesmo por falta de algum nutriente específico. De qualquer forma, esta questão será discutida ao longo do trabalho.

5.2 CULTIVOS COM *L. REUTERI* EM MEIO MRS EM INCUBADOR ROTATIVO

5.2.1 Meio MRS acrescido de glicose ou sacarose ou xilose

Para verificar o crescimento em diferentes fontes de carbono utilizou-se o meio MRS (Lab), no entanto para analisar o efeito da sacarose e da xilose, a glicose foi substituída por estes açúcares no meio. O controle neste experimento foi feito com o meio MRS (Difco) e foi comparado com o meio MRS (Lab) com as três fontes de carbono.

Figura 7: Curva de crescimento em meio MRS com diferentes fontes de carbono.

A cinética de crescimento foi acompanhada por 17hs e os resultados indicaram que não houve diferenças significativas no crescimento celular entre o cultivo com o meio da Difco e o preparado no laboratório com glicose (Lab) (Figura 7). Este fato é interessante, pois gera possibilidades futuras para uma otimização do meio de cultura, permitindo possíveis alterações nas concentrações dos componentes ou até mesmo de modificações no meio no sentido de otimização de custos do mesmo. Além disso, este resultado indica que a substituição da glicose por sacarose e xilose foi a única mudança efetiva entre os experimentos.

Os cultivos em glicose e sacarose, não apresentaram diferenças na curva de crescimento até o fim da fase exponencial (aproximadamente 5 horas). Após esta fase, as células cultivadas em sacarose alcançaram a sua fase estacionária enquanto que em glicose ainda houve crescimento celular.

Vale lembrar que esses experimentos foram realizados com o objetivo de verificar se a cepa utilizada neste trabalho é capaz de consumir sacarose e xilose como fontes de carbono. Por isso, as concentrações desses açúcares não foram quantificadas. Mesmo assim, as amostras foram analisadas em HPLC no método descrito em 4.5.2 para a quantificação de glicose.

Neste método, a sacarose é hidrolisada em frutose e glicose e por comparação das bandas cromatográficas foi possível observar que nos experimentos com sacarose, o perfil da glicose foi diminuindo com o tempo enquanto o perfil da frutose continuou do mesmo tamanho. Isso indica que a frutose não é utilizada como fonte de carbono por este microrganismo. Quando a glicose é esgotada, em aproximadamente sete horas de cultivo, as células saíram da fase exponencial e entraram em fase estacionária, diferentemente das cultivadas em meio MRS (Difco e Lab). A concentração máxima celular alcançada foi 60% maior em MRS (Difco), chegando a uma absorbância de 12,2 (MRS Lab) contra 7,4 em sacarose. Em relação a xilose, pode-se observar que não foi consumida durante o período de tempo do experimento.

Estudos anteriores em *L. reuteri* CRL 1098 mostraram que ele pode utilizar alguns açúcares, tais como arabinose, ribose, galactose, glicose, frutose, maltose, lactose, melibiose, sacarose e rafinose (TARANTO; VALDEZ; PEREZ-MARTINEZ, 1999). Contudo, algumas cepas de *L. reuteri* não são capazes de metabolizar a frutose (VOGEL et al., 1994). Para confirmar esta afirmação seria necessária a realização de ensaios com análises mais completas.

Neste trabalho, optou-se pela realização de cultivos com glicose. Porém, a utilização de sacarose pode ser interessante na viabilização econômica do meio. Desde que testes mais específicos sejam realizados.

5.2.2 Meio MRS acrescido de glicerol

Foram realizados experimentos em frascos (*shaker*) em meio MRS (Difco) com adição de 15 g/L de glicerol para avaliar a capacidade de produção de PDO do microrganismo. A concentração de glicerol adicionada ao meio representa aproximadamente uma razão molar entre glicose e glicerol (r) igual a 0,5 mol_{GLC}/mol_{GLR}, proposta por TOBAJAS et al. (2009).

O ensaio controle foi realizado em meio MRS (Difco). A curva de crescimento, consumo de glicerol e glicose e a produção dos metabólitos estão apresentados na Figura 8. Esses experimentos foram realizados em duplicata e o desvio da média está representado por barras em cada ponto do gráfico.

Figura 8: Concentração celular, consumo de substratos e formação de produtos ao longo do cultivo em meio MRS original e adicionado de glicerol.

A concentração inicial de glicose no meio de cultura MRS era igual a 20 g/L, porém após a esterilização do meio na autoclave, parte deste substrato foi caramelizado. Sendo assim, antes de iniciar um experimento, retirou-se uma amostra do meio estéril para a quantificação da concentração da glicose. Após este experimento, alguns testes relacionados ao tempo de esterilização do meio foram realizados e esse efeito foi diminuído, conseguindo manter a glicose mais perto possível de 20 g/L.

O experimento foi acompanhado até 13,5 horas de cultivo. Pode-se verificar que a velocidade de consumo de glicerol foi menor quando comparada a da glicose (Figura 8). Durante estes período, foram consumidos 14,7 g/L de glicerol e 9,6 g/L de PDO foram gerados, representando um fator de conversão de glicerol a PDO igual a 0,68 g_{PDO}/g_{GLR}.

Este experimento foi útil, principalmente, para verificar se a cepa de *L. reuteri* adquirida para o projeto tem potencial para produzir PDO a partir de glicerol com alto fator de conversão ($Y_{\text{PDO/GLR}}$). Como esse foi o primeiro experimento realizado com glicerol, ou seja preliminar, pode-se afirmar que o $Y_{\text{PDO/GLR}}$ encontrado está de acordo com os trabalhos reportados (Tabela 1).

Na Figura 8, pôde-se observar também que a adição de glicerol no meio de cultura não influenciou o consumo de glicose, em ambos a glicose foi esgotada entre 8 e 9 horas de cultivo. Pôde-se verificar também que as concentração máximas de lactato

produzidas foram próximas, chegando a 12,66 g/L no meio MRS e 13,37 g/L em meio MRS com glicerol. Para confirmar se a conversão de glicose em lactato foi semelhante, calculou-se o $Y_{LAC/GLC}$ através de uma regressão linear entre a produção de lactato e o consumo de glicose. O intervalo de tempo considerado para o cálculo foi do instante inicial (tempo zero) até o instante em que a glicose foi esgotada. O $Y_{LAC/GLC}$ encontrado para o cultivo em MRS foi igual a 0,70 g_{LAC}/g_{GLC} e para o meio com glicerol foi 0,67 g_{LAC}/g_{GLR}. Através de uma análise estatística pela regressão linear, pode-se concluir que não houve diferenças significativas entre os valores. Isso indica que a presença do glicerol não afetou a produção de lactato por *Lactobacillus reuteri*.

O período da fase exponencial de crescimento foi o mesmo para ambas as condições, referentes ao intervalo de tempo de zero a quatro horas de cultivo. A velocidade máxima específica de crescimento também não sofreu alteração significativa, sendo 0,85 h⁻¹ para o controle e 0,82 h⁻¹ para o cultivo com glicerol. No entanto, ainda através da Figura 8, pôde-se notar que houve diferenças na produção de biomassa, de acetato e de etanol. A máxima concentração celular alcançada, representada pela absorbância em meio MRS foi 9,6, enquanto que no meio MRS acrescido de glicose foi igual a 10,6, ou seja 10% maior.

A presença de glicerol no meio provocou em aumento na produção de acetato e uma diminuição na produção de etanol, fato também observado por diferentes linhagens de *Lactobacillus reuteri*, indicando o mesmo metabolismo (ARSKOLD et al., 2008; EL-ZINEY et al., 1998; LUTHI-PENG; DILEME; et al., 2002; STEVENS et al., 2011; VEIGADA-CUNHA; FOSTER, 1992). A máxima concentração de acetato no experimento controle foi de 4,6 g/L, contra 7,7 g/L em MRS com glicerol. Em relação ao etanol, a concentração máxima alcançada no controle foi igual a 3,7 g/L e na presença de glicerol 2,7 g/L.

Para estes experimentos, devido ao volume de meio metabolizado para a análise, não foram realizados a curva de correlação entre a absorbância e biomassa seca, o que compromete alguns cálculos de alguns fatores de conversão. Por esta razão e para um melhor entendimento do metabolismo deste microrganismo foram realizados experimentos em biorreator em meio MRS com e sem glicerol, no qual pôde-se controlar o pH do meio e a vazão de ar na entrada do reator.

5.2.3 Meio MRS modificado

Como dito anteriormente, diferentes trabalhos afirmam que o *Lactobacillus reuteri* não cresce em glicerol como única fonte de carbono no meio. No entanto, existem algumas cepas de *Lactobacillus* que são capazes de assimilar o glicerol, como por exemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* (RIVALDI et al., 2013) e *Lactobacillus rhamnusus* (ALVAREZ et al., 2004). Diante disso e através da análise do comportamento celular no experimento com adição de glicerol no meio de cultura - no qual observou-se que após o esgotamento da glicose ainda houve crescimento celular e a concentração celular alcançada foi maior - surgiram algumas questões. Será que essa cepa de *Lactobacillus* utiliza o glicerol como fonte de carbono? Ou por uma questão de equilíbrio redox prefere outra via que gera mais energia para a célula?

Para responder essas questões, foi montado um experimento em batelada utilizando-se frascos Erlenmeyer em agitador orbital e meio de cultura MRS (Lab) sem glicose. O objetivo do experimento foi a verificação do crescimento do microrganismo somente com peptona e com os extratos de levedura e de carne. Também foi testada a capacidade de consumo de glicerol (como principal fonte de carbono) pelo microrganismo em meio MRS (Lab) sem glicose e com 20 g/L de glicerol.

Para a comparação entre os ensaios, foram realizados experimentos controles em meio MRS (Difco), MRS (Lab), MRS (Difco) com 20 g/L de glicerol e MRS (Lab) com 20 g/L glicerol.

A curva de crescimento, consumo de glicerol e concentração de glicose ao longo dos seis conjuntos de experimentos estão apresentados na Figura 9. Cada condição foi realizada em duplicata e as barras em cada ponto do gráfico apresentam o desvio da média de cada amostra.

Pode-se observar na Figura 9a, que houve maior crescimento microbiano nos ensaios em meio MRS na presença de glicerol, tanto para o meio MRS Difco quanto para o preparado no laboratório. A concentração máxima de células alcançada, representada pela absorbância, para os dois casos foram iguais a 11,7 (Difco) e 10,7 (Lab).

Figura 9: (a) Concentração celular de *L. reuteri*, (b) Consumo de glicerol e (c) Concentração de glicose residual em função do tempo de cultivo em meio MRS original ou modificado.

Os frascos com meios MRS (Difco e Lab) alcançaram uma concentração final de células menor que na presença de glicerol, como mostrado no experimento do item 5.2.2. Em ambos os frascos, a máxima absorvância alcançada foi igual a 8,2.

A curva de crescimento do cultivo com o meio MRS sem glicose e com 20 g/L de glicerol foi a mesma do cultivo com o meio MRS sem glicose, indicando que o glicerol não é utilizado como fonte de carbono e energia pelas células. A absorvância alcançada nestes experimentos foi aproximadamente igual a 0,9. Essa biomassa, provavelmente, foi gerada pelas fontes de carbono advindas dos extratos de carne e de levedura.

A absorvância foi monitorada por amostras retiradas periodicamente até as 17,5 hs de cultivo, após este período as amostras coletadas em 28, 32, 53 e 77 horas de cultivo foram somente analisadas em HPLC. Na Figura 9b, estão apresentadas as curvas de consumo de glicerol e pode-se notar que após o esgotamento da glicose até 77 horas de cultivo, não houve consumo de glicerol em nenhum dos experimentos.

Nos controles com meio MRS acrescidos de glicerol, observou-se que após o esgotamento da glicose, uma pequena quantidade de glicerol foi consumido. No entanto, possivelmente causado ainda pelo efeito da glicose no metabolismo, pois este fato só é observado neste momento. Em ambos os experimentos houve uma sobra de glicerol no meio que não foi consumido até a última amostra, restando 4,5 g/L no meio MRS (Difco) e 6,3 g/L no MRS (Lab).

Diferentemente do experimento anterior (secção 5.2.2) a concentração inicial de glicerol foi maior (20 g/L). Foi adicionado uma quantidade maior de glicerol no meio para verificar se após o consumo de glicose haveria consumo deste substrato ou se haveria uma maior produção de biomassa. A concentração de glicose não foi alterada, no entanto com alguns ajustes na autoclave, a concentração deste substrato permaneceu mais próximo de 20 g/L (Figura 9c). A glicose foi totalmente consumida entre 10 a 14 horas de cultivo.

Esses resultados indicam que glicerol não foi utilizado como fonte de carbono, no entanto pode ser utilizado como aceptor de elétrons, restaurando o equilíbrio redox. Ou seja, a presença deste substrato gera maior produção de ATP para a célula, consequentemente maior produção de biomassa.

Uma análise no genoma do *Lactobacillus reuteri* também foi realizada para verificar se há no genoma desta bactéria a presença de genes capazes de sintetizar as enzimas necessárias para a via de degradação do glicerol.

O metabolismo do glicerol como fonte de carbono é observado em alguns microrganismos, como por exemplo a *Klebsiella pneumoniae* (SUN et al., 2003; ZHENG et al., 2006). Nesta bactéria, existem duas vias para a degradação do glicerol e a presença de oxigênio no meio determina qual a rota será utilizada. A Figura 10 ilustra esse metabolismo, juntamente com as enzimas responsáveis por cada etapa.

As enzimas responsáveis pela degradação do glicerol até o gliceraldeído-3-fosfato estão representadas na Figura 10 pelos números de 1 a 5. As enzimas glicerol desidrogenase (1) e a dihidroxiacetona quinase (3) são expressas pelas células sob condições aeróbias e as enzimas glicerol quinase (2) e glicerol-3-fostato-desidrogenase (4) são ativadas sob condições anaeróbias.

A enzima triose-fosfato isomerase (E.C 5.3.1.1) (5) é expressa independentemente da presença de oxigênio e é responsável por formar o gliceraldeído-

3-fosfato. Ou seja, baseado neste modelo metabólico, sem esta enzima não seria possível a utilização do glicerol como fonte de energia para as células.

Figura 10: Metabolismo do glicerol e da glicose em *Klebsiella pneumoniae*.

Lactobacillus reuteri ATCC23272 foi selecionado da cepa DSM20016, a qual possui o genoma sequenciado e disponível no *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Pode-se verificar através do metabolismo glicerolípídico (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lre00561), que já foram identificados no genoma os genes das enzimas **glicerol desidrogenase** e a **glicerol quinase**, enzimas 1 e 2 da Figura 10.

O gene responsável pela produção da **dihidroxiacetona quinase** (3) não foi identificada no genoma da *L. reuteri*, porém identificado por homologia em alguns genomas de *Lactobacillus*. Segundo MORITA et al. (2008), a enzima dihidroxiacetona quinase não foi encontrada em *L. reuteri* JCM 1112, indicando que, por ser uma enzima essencial, a fermentação do glicerol para energia e crescimento não ocorre nesta cepa.

De acordo com o KEGG, existem três *EC numbers* para **glicerol-3-fosfato desidrogenase** (4): 1.1.1.8, 1.1.1.94 e 1.1.5.3. Os códigos EC 1.1.1.8 e EC 1.1.5.3 não foram encontrados em *Lactobacillus* tampouco em *L. reuteri*. No entanto, o EC 1.1.1.94

foi encontrado e confirmado no metabolismo do glicerolfosfolípídeo do *L. reuteri* (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lre00564).

A enzima **triose-fosfato isomerase** (5) também foi confirmada no metabolismo da glicólise no genoma do *L. reuteri* DSM20016 (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lre00010).

Com esta análise das enzimas envolvidas no genoma do *L. reuteri*, pode-se verificar que as enzimas representadas por 1, 2 e 4 e 5 da Figura 10 foram confirmadas no genoma do *L. reuteri*. Sendo assim, a via de degradação do glicerol em anaerobiose está completa e faltaria apenas os genes de formação da enzima 3 para ser possível degradar em aerobiose também.

Esses experimentos em shaker, não foram realizados sob condições anaeróbias, ou seja em ambiente livre de oxigênio. No entanto, a concentração de oxigênio no meio é próxima de zero, uma vez que a velocidade de agitação dos frascos é baixa (50 rpm). Os resultados desses experimentos mostraram que não houve consumo de glicerol pelas células.

Sendo assim, verificou-se mais uma enzima na via de degradação do glicerol, que é a enzima responsável pela próxima etapa da via. Essa enzima é a glicerol 3-fosfato desidrogenase e transforma o gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato. O *EC number* desta enzima é EC 1.2.1.9 e deve estar presente no genoma do *L. reuteri* DSM20016, porém ainda não foi confirmada (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?lre00010).

A realização de experimentos para verificar a produção desta enzima é necessária, pois a identificação dos passos que estão faltando para a degradação completa do glicerol é de extrema importância. Assim, poderiam ser estudadas as modificações genéticas necessárias para que *Lactobacillus reuteri* utilizasse esse substrato como fonte de carbono. Este fato diminuiria o custo com o meio MRS para a produção de 1,3-propanodiol, além de aproveitar melhor o subproduto do biodiesel.

5.2.4 Meio MRS acrescido de diferentes concentrações de glicose e glicerol

Os controles com meio MRS com adição de glicerol dos experimentos das seções 5.2.2 e 5.2.3 apresentaram diferentes concentrações iniciais de glicerol, fazendo com que a variável “r” (razão molar entre glicose e glicerol) fosse alterada.

A média das duplicatas da concentração inicial de glicerol do experimento 5.2.2 foi igual a 16,1 g/L e no experimento da seção 5.2.3 foi igual a 20,8 g/L. Essa mudança de “r” gerou alterações no metabolismo das células, como mostrado através dos cálculos de alguns parâmetros fisiológicos (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação entre bateladas realizadas em frascos com diferentes razões entre glicose e glicerol.

Parâmetros e variáveis do processo		Batelada Frascos (<i>Shaker</i>)			
		Difco (controle)	Difco + 15 g/L GLR	Difco (controle)	Difco + 20 g/L GLR
r	$(\frac{\text{mol}_{\text{GLC}}}{\text{mol}_{\text{GLR}}})$	-	0,54	-	0,42
Consumo de GLC	(g/L)	16,1	17,1	16,7	16,7
Consumo de GLR	(g/L)	-	14,8	-	15,4
$\mu_{X,\text{Máx}}$	(h^{-1})	0,79	0,82	0,73	0,81
	r^2	0,987	0,987	0,996	0,992
X_{máx}	(g/L)	3,10	3,48*	2,68	3,87*
PDO_{Máx}	(g/L)	-	9,57	-	10,08
Y_{PDO/GLY}	$(\frac{\text{g}_{\text{PDO}}}{\text{g}_{\text{GLR}}})$	-	0,66	-	0,69
	r^2		0,995		0,993
Y_{LAC/GLC}	$(\frac{\text{g}_{\text{LAC}}}{\text{g}_{\text{GLC}}})$	0,71	0,67	0,78	0,75
	r^2	0,997	0,988	0,999	0,992
Y_{ACE/GLC}	$(\frac{\text{g}_{\text{ACE}}}{\text{g}_{\text{GLC}}})$	Não é linear	0,19	Não é linear	0,21*
	r^2		0,985		0,983
Y_{ETH/GLC}	$(\frac{\text{g}_{\text{ETH}}}{\text{g}_{\text{GLC}}})$	0,20	0,15	0,23	0,07*
	r^2	0,992	0,991	0,989	0,996

* Valores estatisticamente diferentes ($\alpha=5\%$)

Primeiramente, nota-se que há algumas diferenças entre os experimentos controle, principalmente quanto ao $X_{\text{máx}}$ e $Y_{\text{LAC/GLC}}$. Por esta razão, a análise entre os experimentos com maior concentração de glicerol foi feita por comparação entre seus próprios controles.

Não houve diferenças significativas entre os fatores de conversão $Y_{LAC/GLC}$ em ambos os experimentos com adição de glicerol em relação aos cultivos sem glicerol e o aumento na concentração do mesmo no meio não alterou este parâmetro.

A concentração de PDO e o fator de conversão $Y_{PDO/GLR}$ foram estatisticamente iguais em ambos os experimentos com adição de glicerol, indicando que mesmo adicionando uma quantidade maior de glicerol, o consumo foi o mesmo.

A concentração de células no experimento com o meio MRS com 15 g/L de glicerol foi 12% maior que no meio MRS sem glicerol (controle), enquanto que 20 g/L de glicerol gerou um aumento de 44%. No entanto, o consumo de glicerol de ambos os experimentos não explica esta diferença, pois foi praticamente o mesmo. Os dados de consumo de glicose e glicerol na tabela são referentes ao tempo de 13,5 horas de cultivo.

Em relação aos fatores de conversão $Y_{ACE/GLC}$ e $Y_{ETH/GLC}$, pode-se observar que o cultivo com MRS e 20 g/L de glicerol favoreceu a formação de acetato e diminuiu a produção de etanol. Pode-se afirmar que a presença de uma quantidade maior de glicerol no meio de cultivo favoreceu a rota energeticamente mais favorável (formação de acetato), gerando mais ATP e, conseqüentemente, maior biomassa.

O glicerol adicionado ao meio de cultura (20 g/L) não foi completamente consumido, restando ainda cerca de 4 g/L. Esse experimento foi interessante para um melhor entendimento do metabolismo, no entanto isso não é interessante quanto ao processo de produção de 1,3-propanodiol, uma vez que há sobra da matéria-prima. Deve existir uma razão ideal entre glicose e glicerol no meio que favoreça a geração de biomassa e produção do produto desejado.

Alguns autores relataram que a razão molar ideal entre glicose e glicerol é 0,5 mol_{GLC}/mol_{GLR}, exatamente entre os dois valores testados neste experimento (BAEZA-JIMENEZ et al., 2011; LUTHI-PENG; DILEME; et al., 2002; TOBAJAS et al., 2009).

Para os experimentos em batelada esta razão igual a 0,50 mol_{GLC}/mol_{GLR} foi mantida na medida do possível, uma vez que é difícil controlar a concentração final de glicose após o processo de esterilização em autoclave. A esterilização do meio por filtração não seria viável para este projeto, uma vez que muitos experimentos contínuos foram realizados.

Alguns ensaios preliminares foram realizados em frascos em *shaker*, mantendo esta proporção entre glicose e glicerol, porém aumentando as concentrações de ambos

no meio MRS. Para isso, realizou-se quatro experimentos, denominados: controle (MRS com 20 g/L de glicerol); 27 g/L (MRS com 27 g/L de glicose e de glicerol); 36 g/L (MRS com 36 g/L de glicose e de glicerol) e 45 g/L (MRS com 45 g/L de glicose e de glicerol). A Figura 11 apresenta as concentrações de glicose, glicerol, lactato e PDO ao longo de dez dias de cultivo.

Figura 11: Curva de consumo de substratos e produção de metabólitos ao longo do cultivo em meio MRS com diferentes concentrações de glicose e glicerol.

Pode-se observar que só houve o consumo completo da glicose nos experimentos controle e com 27 g/L de glicose e em nenhum dos cultivos o glicerol foi totalmente consumido. Aliás, após 2 dias de cultivos não há alterações das concentrações dos substratos e produtos analisados. Diante destes resultados, é possível que alguns metabólitos produzidos ou elevadas concentrações de glicose ou glicerol estejam inibindo o crescimento celular e consequentemente, o consumo de glicose pela célula.

Testes de toxicidade dos produtos e de tolerância aos substratos foram realizados para entender porque o microrganismo não consome completamente estes substratos.

5.3 ENSAIOS DE TOLERÂNCIA E DE TOXICIDADE

Para verificar se há tolerância aos substratos ou inibição por toxicidade pelos produtos gerados nos cultivos, foram realizados experimentos em meio MRS (Difco) com diferentes concentrações de glicose, glicerol, PDO, lactato, acetato e etanol.

5.3.1 Tolerância a glicose

Foram adicionados diferentes concentrações de glicose ao meio de cultura para avaliar a tolerância do *L. reuteri* sobre este substrato. As concentrações testadas foram: 20 (controle); 25; 30 e 35 g/L e os resultados estão apresentados na Figura 12.

Em relação a curva de crescimento celular, pode-se observar que não houve diferenças significativas entre os ensaios e o $X_{\text{máx}}$ médio (representado pela absorbância) dos experimentos foi igual a $11,1 \pm 0,3$.

A Figura 12 apresenta os resultados até 10 horas de cultivo, o qual representa o período de tempo em que as amostras foram retiradas periodicamente, no entanto o ensaio durou 31,5 horas. O consumo de glicose no final do experimento foi igual a 18 g/L no controle e nos demais ensaios, o consumo foi praticamente o mesmo, representando uma média igual a $23,2 \pm 0,9$ g/L. Ou seja, a glicose não foi totalmente esgotada nos experimentos em que esta foi adicionada.

A concentração inicial de glicerol foi igual a 15 g/L, e tanto o consumo de glicerol quanto a produção de PDO não foram afetados pela presença de glicose no meio. No entanto, esses experimentos foram os que apresentaram maior $Y_{\text{PDO/GLR}}$ quando comparado aos outros ensaios realizados. O cultivo com 35 g/L de glicose alcançou um $Y_{\text{PDO/GLR}}$ muito próximo ao valor teórico, ou seja $0,82 \text{ g}_{\text{PDO}}/\text{g}_{\text{GLR}}$. O maior consumo de glicose (mesmo que pequeno, pois sobrou glicose no fim do cultivo) fez com que mais NADHs fossem regenerados, consequentemente, maior produção de PDO.

Não houve diferenças significativas quanto aos fatores de conversão $Y_{\text{LAC/GLC}}$ ($0,67 \text{ g}_{\text{LAC}}/\text{g}_{\text{GLC}}$), $Y_{\text{ACE/GLC}}$ ($0,19 \text{ g}_{\text{ACE}}/\text{g}_{\text{GLC}}$) e $Y_{\text{ETH/GLC}}$ ($0,10 \text{ g}_{\text{ETH}}/\text{g}_{\text{GLC}}$). Esses resultados indicam que não houve alteração no metabolismo com o aumento da concentração de glicose no meio e que até 35 g/L de glicose não há inibição no crescimento celular.

Figura 12: Consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do experimento de tolerância a glicose.

5.3.2 Tolerância a glicerol

O glicerol também foi avaliado quanto a tolerância de *L. reuteri* sobre este no meio MRS. As concentrações finais de cada ensaio foram iguais a: 15 (controle); 20; 25; 30 e 35 g/L. Os resultados estão apresentados na Figura 13.

Figura 13: Consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do experimento de tolerância a glicerol.

Pode-se observar que o aumento da concentração de glicerol no meio até 35 g/L não afetou a curva de crescimento, o consumo de glicose e tampouco a geração dos subprodutos. Após 30 horas de experimento, o glicerol só foi totalmente consumido no experimentos controle, representando 15 g/L no controle e de $17,1 \pm 0,9$ g/L nos demais ensaios.

Pode-se concluir a partir dos resultados obtidos que a presença de glicerol no meio de cultura em uma concentração de até 35 g/L não causa inibição no crescimento

celular, além de não alterar o metabolismo celular, o qual foi verificado através do cálculo dos fatores de conversão $Y_{LAC/GLC}$ (0,76 g_{LAC}/g_{GLC}), $Y_{ACE/GLC}$ (0,21 g_{ACE}/g_{GLC}) e $Y_{ETH/GLC}$ (0,09 g_{ETH}/g_{GLC}).

KHAN et al. (2013) também realizaram ensaios de tolerância ao glicerol em cultivos com *L. panis*. As concentrações testadas variaram entre 25 e 252 g/L e foi observado uma diminuição no crescimento em concentrações superiores a 100,8 g/L. No entanto, para *C. butyricum* foi observado um efeito inibitório no crescimento celular em cultivos realizados com concentrações de glicerol superiores a 20 g/L.

Para a analisar se há algum efeito do glicerol sobre o crescimento do *L. reuteri*, devem-se testar concentrações maiores que 35 g/L.

5.3.3 Toxicidade do lactato

A toxicidade de metabólitos produzidos pelos microrganismos pode ser em nível intracelular ou extracelular. Neste trabalho, os ensaios de toxicidade realizados só conseguiram simular a toxicidade extracelular, uma vez que foram adicionados ao meio de cultura diferentes quantidades dos principais produtos gerados.

Para a análise de toxicidade do lactato, foram realizados experimentos em *shaker* com diferentes concentrações de lactato no meio MRS (Difco). As concentrações iniciais de lactato testadas foram 4, 6 e 8 g/L, além do controle. Como se pode observar na Figura 14, a concentração de 4 g/L de lactato no meio já foi suficiente para a inibição do crescimento celular.

O experimento durou cerca de 30 horas e a após este período, observou-se que glicose foi completamente consumida no ensaio controle e no ensaio com 4 g/L de lactato. Restaram 3,3 g/L e 6,6 g/L de glicose no frascos com 6 g/L e 8 g/L de lactato, respectivamente. Como o lactato apresentou toxicidade para as células, consequentemente, os fatores de conversão também foram afetados.

KHAN et al. (2013) realizaram ensaios em *shaker* para avaliar a toxicidade do lactato em cultivos com *L. panis*. Os resultados indicaram que essa bactéria cresceu em meio com 96,5 g/L de lactato. No entanto, os autores não relatam se houve diferenças entre esse ensaio e o controle quanto a velocidade de crescimento.

Figura 14: Consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do experimento de toxicidade ao lactato.

5.3.4 Toxicidade do acetato

O meio MRS contém aproximadamente 4 g/L de acetato, por isso, antes de avaliar a toxicidade deste componente, realizou-se um experimento com MRS (lab) sem acetato e com glicerol. O ensaio controle foi realizado com meio MRS (lab) com glicerol. A cinética de crescimento de ambos estão apresentadas na Figura 15.

Figura 15: Curva de crescimento de *L. reuteri* em meio MRS (Lab + GLR) na presença e ausência de acetato.

A concentração máxima de células em termos de absorbância e o $\mu_{X,m\acute{a}x}$ alcançados no meio MRS foi igual a 10,7 e $0,84\text{ h}^{-1}$, enquanto que no meio sem acetato foram iguais a 7,2 e $0,54\text{ h}^{-1}$, respectivamente. Também foram observadas diferenças nos fatores de conversão $Y_{PDO/ACE}$, sendo que no meio MRS foi igual a $0,76\text{ g}_{PDO}/\text{g}_{GLR}$ e no meio sem acetato foi de $0,68\text{ g}_{PDO}/\text{g}_{GLR}$.

Pode-se concluir que a ausência de acetato no meio MRS desfavoreceu o $Y_{PDO/GLR}$ em 11%, a produção de biomassa em 32% e reduziu o $\mu_{X,m\acute{a}x}$ em 35% quando comparado ao controle. O acetato no meio de cultura atua como um fator de crescimento, segundo DE MAN; ROGOSA; SHARPE (1960).

COLIN, THIERRY et al. (2001) analisaram o efeito do acetato na fermentação do glicerol em *C. butyricum* e com a adição de 12,2 g/L de acetato observaram um aumento de 45% no $\mu_{X,m\acute{a}x}$ e de 18% na concentração final de células. No entanto, o $Y_{PDO/GLR}$ foi afetado negativamente. HEYNDRIX et al. (1991) sugerem que o acetato age como receptor de elétrons durante as fases iniciais da fermentação, competindo com o glicerol, o que explica a diminuição do $Y_{PDO/GLR}$.

Para analisar a toxicidade do acetato foram realizados experimentos com três diferentes concentrações de acetato, além do controle. As concentrações finais foram iguais a 4 g/L (controle); 5,5; 7 e 8 g/L de acetato no meio MRS.

A curva de crescimento, consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do tempo estão apresentados na Figura 16.

Pode-se observar que o acetato em até 8 g/L não afetou o crescimento celular e tampouco os fatores de conversão $Y_{LAC/GLC}$ ($0,66\text{ g}_{LAC}/\text{g}_{GLC}$), $Y_{ACE/GLC}$ ($0,20\text{ g}_{ACE}/\text{g}_{GLC}$) e $Y_{ETH/GLC}$ ($0,11\text{ g}_{ETH}/\text{g}_{GLC}$). O $Y_{PDO/GLR}$ não foi afetado pela adição de concentrações maiores

que 5,5 g/L de acetato no meio. O controle apresentou um $Y_{PDO/GLR}$ igual a 0,79 g_{PDO}/g_{GLR}, enquanto que nos demais testes foi igual a 0,75 g_{PDO}/g_{GLR}, no entanto estes valores são estatisticamente iguais.

Figura 16: Consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do tempo no experimento de toxicidade ao acetato.

5.3.5 Toxicidade do etanol

Por fim, o último experimento de toxicidade foi realizado em frascos com diferentes concentrações de etanol no meio MRS. Além do controle, foram testadas três diferentes condições nas quais foram adicionados: 1; 2,5 e 4 g/L de etanol.

Os resultados indicam que a adição de até 4 g/L de etanol no meio não causou uma inibição no crescimento celular e também não afetou o metabolismo celular, uma vez que os valores para os fatores de conversão não foram alterados ($Y_{LAC/GLC}$ (0,66 g_{LAC}/g_{GLC}), $Y_{ACE/GLC}$ (0,19 g_{ACE}/g_{GLC}) e $Y_{ETH/GLC}$ (0,11 g_{ETH}/g_{GLC})). A Figura 17 apresenta os resultados de consumo de glicose e glicerol, além da formação de subprodutos ao longo do cultivo.

O efeito tóxico do etanol foi observado em cultivos com *L. panis*, no entanto essas bactérias sobreviveram por mais de 24 horas em meio de cultura contendo, aproximadamente, 120 g/L de etanol (KHAN et al., 2013).

Figura 17: Consumo de glicose e glicerol e formação de produtos ao longo do tempo no experimento de toxicidade ao etanol.

5.3.6 Análise dos resultados de tolerância e toxicidade

Pode-se observar que de todos os componentes adicionados ao meio de cultura, somente o lactato, nas concentrações testadas, foi capaz de inibir o crescimento celular. Pode ser devido à esta inibição, o motivo das bactérias saírem da fase exponencial de

crescimento e permanecem crescendo em uma velocidade menor até entrar na fase estacionária.

Alguns trabalhos encontrados na literatura também relatam a realização de experimentos de toxicidade com bactérias produtoras de PDO. KHAN et al. (2013) avaliaram o efeito do glicerol, etanol, acetato e lactato no meio em cultivos com *Lactobacillus panis*, no entanto em concentrações maiores do que as testadas neste trabalho. Segundo os autores, a presença de glicerol no meio a partir de 8% e até 20% (v/v) causou uma diminuição na velocidade de crescimento. No entanto, o crescimento foi afetado nos cultivos com 6% (v/v) de etanol, no qual não foi observado crescimento em até 24hs de ensaio. Diferentemente de *L. reuteri*, cerca de 48 g/L de lactato não foram suficientes para inibir o crescimento do *L. panis*. Provavelmente, de acordo com os resultados obtidos, o *L. reuteri* não cresceria nesta concentração.

MAERVOET et al. (2012) realizaram testes de toxicidade do PDO em cultivos com sete cepas de *Citrobacter*. Foi observado para a maioria das cepas uma inibição no crescimento nos cultivos com 40 g/L de PDO.

Os ensaios de toxicidade também foram realizados para simular o comportamento do microrganismo em um processo de batelada alimentada. Este tipo de processo é bastante utilizado por alcançar uma produtividade maior que a batelada. Existem muitas vantagens neste tipo de processo, uma delas, por exemplo, é a possibilidade de minimizar os efeitos do controle do metabolismo ou de inibição por substrato. Ao ser adicionado aos poucos, maiores quantidades do substrato poderão ser convertidos no produto de interesse (SCHMIDELL et al., 2001).

Para que a utilização deste processo seja eficiente, é importante que não haja formação de metabólitos ou produtos que sejam tóxicos ao microrganismo (SCHMIDELL et al., 2001; SHULER; KARGI, 2001).

Diante dos resultados obtidos para *L. reuteri*, a elevada toxicidade do lactato não tornaria este tipo de processo eficiente.

5.4 EXPERIMENTOS EM BATELADA (BIORREATOR)

Para a obtenção de dados preliminares sobre a cepa, foram realizados experimentos em batelada em biorreator. Para estes experimentos, *L. reuteri* foi cultivada a 37°C, 150 rpm com volume de trabalho igual a 1,5 L. É importante frisar que já existem trabalhos publicados com *L. reuteri* cultivados em batelada, nos quais foram avaliadas a influência do pH, da temperatura e do tipo de cultivo quanto a aeração (microaerobiose e anaerobiose), razão entre glicose e glicerol utilizada (BAEZA-JIMENEZ et al., 2011; TOBAJAS et al., 2009; VALDEZ et al., 1997). Portanto, os principais objetivos para o conjunto de experimentos em batelada foram conhecer o comportamento do microrganismo através dos cálculos dos parâmetros cinéticos e comparar os resultados com os dados da literatura. Assim, obter informações para direcionar as estratégias para o tipo de processo ideal, visando altos rendimentos e produtividades do PDO.

Nesse conjunto de experimentos foram avaliadas duas condições de pH e temperatura e diferentes condições de aeração no meio (microaerobiose e anaerobiose).

5.4.1 Batelada B1

A batelada B1 foi realizada em triplicata, assim pode-se verificar a reprodutibilidade dos experimentos. O cultivo foi realizado em biorreator em meio MRS (Difco) com 15 g/L de glicerol, a 37°C, 150 rpm e em anaerobiose. O pH foi controlado em 5,5, pois alguns autores consideram este pH como sendo o ótimo para a produção de PDO (VALDEZ et al., 1997).

A curva de crescimento, consumo de glicerol e glicose e formação de PDO e demais metabólitos ao longo do tempo dos experimentos são mostrados na Figura 18.

A máxima densidade óptica alcançada foi de $8,85 \pm 0,63$, representando uma concentração máxima de células de $2,79 \pm 0,12$ g/L. A equação que relaciona a absorbância e a massa seca adquirida no mesmo experimento ($R^2=0,9899$) foi:

$$\text{Massa seca} = 0,31 \cdot \text{Abs}_{600} \quad (4)$$

Figura 18: Curva de crescimento e concentrações de substratos e produtos ao longo de B2.

Da mesma forma que os cultivos em frascos, a fase exponencial de crescimento foi no intervalo de 0 a 4 horas de cultivo. Após este período as células continuam crescendo, porém numa velocidade menor. A fase estacionária ocorre por volta das 6 horas de cultivo quando a glicose é esgotada.

As concentrações de consumo de glicose e glicerol e produção de lactato, PDO, acetato, CO₂ e etanol no fim da batelada estão apresentadas na Tabela 8. O término da batelada foi determinado pelo esgotamento do glicerol no meio.

Tabela 8: Concentrações de consumo de glicose e glicerol e de produção de LAC, PDO, ACE, CO₂ e ETH alcançadas em B1.

Batelada	Consumo GLC (g/L)	Consumo GLR (g/L)	X (g/L)	LAC (g/L)	PDO (g/L)	ACE (g/L)	CO ₂ (g/L)	ETH (g/L)
B1 1	17,86	15,01	2,83	13,10	10,03	3,46	3,32	2,03
B1 2	18,55	15,47	2,89	15,27	9,71	3,29	3,97	1,84
B1 3	17,15	15,05	2,65	14,60	9,66	3,47	3,23	1,71
B1 (média)	17,85	15,18	2,79	14,32	9,80	3,41	3,50	1,86

Observou-se através destes resultados que a soma das concentrações dos produtos do metabolismo da glicose (lactato, acetato, etanol, CO₂ e biomassa) foi igual a 25,9 g/L e é maior que a glicose consumida (17,85 g/L), indicando que parte do carbono para a produção dos mesmos vem dos extratos de carne e levedura presentes no meio.

A produtividade máxima média de PDO dos experimentos foi igual a $1,42 \pm 0,11$ g/L.h. O fator de conversão $Y_{PDO/GLR}$ e a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{x,máx}$) foram iguais a $0,68 \pm 0,02$ g_{PDO}/g_{GLR} e $0,99 \pm 0,04$ h⁻¹, respectivamente.

Todos os fatores de conversão e as velocidades máximas específicas de crescimento foram calculados com uma única regressão linear das três curvas (B1 1, B1 2 e B1 3). A produção específica global de PDO (q_{PDO}) foi igual a $0,51 \text{ g}_{PDO}/\text{g}_x.\text{h}$ e a concentração máxima média de 1,3-propanodiol foi igual a $9,80 \pm 0,20 \text{ g/L}$.

A Tabela 13 apresenta os principais resultados deste experimento B1, além dos resultados de B2, B3, B4 e B5 e está localizada após a descrição desses experimentos em batelada. Pode-se notar através dos coeficientes de variação (cv) que os valores foram baixos, indicando que os resultados são reprodutíveis.

As velocidades globais de consumo de glicose e glicerol foram iguais a $2,75 \text{ g}_{GLC}/\text{L.h}$ e $2,30 \text{ g}_{GLR}/\text{L.h}$, indicando que o consumo de glicose ocorre mais rapidamente que o de glicerol.

5.4.2 Batelada B2

No experimento, denominado B2, o cultivo foi realizado em meio MRS (Difco) com adição de 15 g/L de glicerol a 37°C , 150 rpm e em anaerobiose. O pH deste experimento foi controlado em $6,2$, o qual representa o pH do meio de cultivo.

A concentração máxima de PDO foi $9,21 \text{ g/L}$ e a Q_{PDO} , $1,17 \text{ g/L.h}$. O fator de conversão ($Y_{PDO/GRL}$) foi igual a $0,58 \text{ g}_{PDO}/\text{g}_{GLR}$ e q_{PDO} foi igual a $0,43 \text{ g}_{PDO}/\text{g}_x.\text{h}$

A velocidade máxima específica alcançada no experimento B2 foi de $0,86 \text{ h}^{-1}$, a concentração máxima celular foi de $2,82 \text{ g/L}$ (biomassa seca) correspondente a um absorbância de $10,01$. A relação entre massa seca e absorbância foi linear ($R^2=0,969$) e a equação encontrada foi igual a:

$$\text{Massa seca} = 0,28 \cdot \text{Abs}_{600} \quad (5)$$

A Figura 19 mostra as concentrações de glicose, glicerol, PDO, lactato, acetato e etanol ao longo do cultivo.

Pode-se notar que a velocidade de consumo de glicose é maior que a de glicerol. A glicose é completamente consumida em $6,6$ horas e o glicerol em $7,8$ horas, representado uma velocidade global de consumo de glicose igual a $2,25 \text{ g}_{GLC}/\text{L.h}$ e de glicerol igual a $2,01 \text{ g}_{GLR}/\text{L.h}$.

Figura 19: Absorbância, concentração de substratos e produtos ao longo da batelada B1.

As concentrações alcançadas de produtos e consumo de glicose e glicerol estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9: Concentrações de consumo de glicose e glicerol e de produção de LAC, PDO, ACE, CO₂ e ETH alcançadas em B2.

Batelada	Consumo GLC (g/L)	Consumo GLR (g/L)	X (g/L)	LAC (g/L)	PDO (g/L)	ACE (g/L)	CO ₂ (g/L)	ETH (g/L)
B2	17,58	15,60	2,82	15,58	9,21	2,76	-	2,33

Os principais resultados desta batelada, juntamente com os fatores de conversão podem ser observados na Tabela 13. Neste experimento, ocorreu um problema no analisador de gás, por isso não foram apresentadas a curva de CO₂ e a concentração final alcançada.

5.4.3 Batelada B3

Comparando os resultados de produção de 1,3-propanodiol dos experimentos em frascos com os resultados obtidos em biorreator (B1), pode-se notar que não houve diferenças significantes. Os fatores de conversão de $Y_{PDO/GLR}$ de ambos foram próximos. A principal diferença entre os ensaios é que no reator é possível controlar do pH e garantir que a condição do experimento seja em anaerobiose (injeção de N₂).

Em frascos, os ensaios foram realizados em *shaker* sob uma agitação de 50 rpm, fazendo com que a transferência de oxigênio no meio fosse baixa. No entanto, não pode

ser caracterizado com um cultivo em anaerobiose plena, uma vez que o *shaker* utilizado não oferece um ambiente livre de oxigênio.

Para avaliar o efeito do metabolismo do *L. reuteri* sob a presença de oxigênio no meio de cultivo, foi realizado uma batelada em biorreator em condições microaeróbias, ou seja, com injeção de 0,75 L/min de ar comprimido.

As demais condições foram as mesmas utilizadas em B1, ou seja, meio MRS (Difco) com 15 g/L de glicerol a 37°C, 150 rpm e pH 5,5. O ensaio foi iniciado com ar saturado, ou seja, com 100% de oxigênio dissolvido no meio. Assim que o reator foi inoculado, houve um consumo rápido de oxigênio, chegando a 0% em 1,5 horas de cultivo e se manteve ao longo do experimento.

A produção máxima obtida de PDO foi igual a 8,77 g/L e produtividade alcançada foi de 1,00 g/L.h. O fator de conversão $Y_{PDO/GLR}$ foi igual a 0,57 g_{PDO}/g_{GLR} e a produção específica global de PDO (q_{PDO}) foi igual a 0,27 g_{PDO}/g_x.h.

O consumo de glicose e glicerol e a produção de lactato, PDO, acetato e etanol ao longo da batelada podem ser observados na Figura 20.

Figura 20: Absorbância, concentração de substratos e produtos ao longo da batelada B3.

A velocidade máxima específica e a máxima concentração celular foram iguais a 0,85 h⁻¹ e 12,0 (3,96 g/L), respectivamente. A relação entre massa seca e absorbância foi igual a ($R^2=0,996$):

$$\text{Massa seca} = 0,33 \cdot \text{Abs}_{600} \quad (6)$$

A glicose foi esgotada em, aproximadamente, 7 horas de cultivo, representando uma velocidade global de consumo igual a 2,51 g/L.h. Em relação ao glicerol, a

velocidade global de consumo foi igual a 1,77 g/L.h. Os principais resultados desta batelada podem ser observados na Tabela 13.

O consumo de glicose e glicerol, juntamente com as concentrações dos produtos alcançadas no término da batelada estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Concentrações de consumo de glicose e glicerol e de produção de LAC, PDO, ACE, CO₂ e ETH alcançadas em B3.

Batelada	Consumo GLC (g/L)	Consumo GLR (g/L)	X (g/L)	LAC (g/L)	PDO (g/L)	ACE (g/L)	CO ₂ (g/L)	ETH (g/L)
B3	17,82	15,77	3,64	13,72	8,77	3,71	5,51	2,29

5.4.4 Batelada B4

O experimento, denominado B4, foi realizado em meio MRS (Difco) com 15 g/L de glicerol, em anaerobiose, pH 5,5, 150 rpm e 30°C. Este ensaio se difere do ensaio B1 apenas em uma variável: temperatura.

O experimento durou cerca de 14 horas, a fase exponencial também foi de 0 a 4 horas de cultivo, no entanto o $\mu_{x,m\acute{a}x}$ alcançado foi menor que nas outras bateladas, igual a 0,48 h⁻¹. A concentração máxima de células foi de 2,26 g/L e a relação entre a massa seca e absorbância ($R^2=0,995$) esta apresentada na equação a seguir:

$$Massa\ seca = 0,31 \cdot Abs_{600} \quad (7)$$

A glicose e o glicerol foram completamente consumidos em aproximadamente 13 horas de cultivo, representando velocidades globais de consumo iguais a 1,38 g_{GLC}/L.h e 1,16 g/L.h.

As concentrações de glicose, glicerol, PDO, lactato, etanol e acetato e a porcentagem de CO₂ ao longo do tempo estão apresentadas na Figura 21.

Figura 21: Concentrações de glicose, glicerol e metabólitos ao longo da batelada B4.

As concentrações dos substratos e produtos no final da batelada são apresentados na Tabela 12.

Tabela 11: Concentrações de consumo de glicose e glicerol e de produção de LAC, PDO, ACE, CO₂ e ETH alcançadas em B4.

Batelada	Consumo GLC (g/L)	Consumo GLR (g/L)	X (g/L)	LAC (g/L)	PDO (g/L)	ACE (g/L)	CO ₂ (g/L)	ETH (g/L)
B4	17,12	15,20	2,26	14,61	11,06	4,33	2,27	1,52

A produção de máxima de PDO foi igual a 11,06 g/L e Q_{PDO} , q_{PDO} e $Y_{PDO/GLR}$ iguais a 0,84 g_{PDO}/L.h, 0,34 g_{PDO}/g_X.h e 0,72 g_{PDO}/g_{GLR}, respectivamente. Os fatores de conversão e outras variáveis do processo estão apresentadas na Tabela 13.

5.4.5 Batelada B5

Este experimento foi realizado principalmente para comparar com o experimento B3 e avaliar o efeito do glicerol no meio de cultivo no metabolismo do *L. reuteri*. O ensaio foi realizado com meio MRS (sem glicerol), em aerobiose, pH 5,5, 150 rpm e 37°C. A concentração de oxigênio dissolvido no início do experimento foi de 100% (ar saturado), no entanto foi diminuindo rapidamente chegando a zero em duas horas de experimento e manteve-se em zero até o fim da batelada.

A velocidade máxima específica de crescimento alcançada neste experimento foi igual 0,96 h⁻¹ e a concentração máxima celular foi 2,37 g/L, segundo a equação 8 ($R^2 = 0,996$).

$$Massa\ seca = 0,34 \cdot Abs_{600}$$

(8)

O consumo de glicose e produção de lactato, acetato, CO₂ e etanol no término da batelada (6,6 horas) estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Consumo de glicose e produção de lactato, acetato, CO₂ e etanol alcançados na batelada B5.

Batelada	Consumo GLC (g/L)	Consumo GLR (g/L)	X (g/L)	LAC (g/L)	PDO (g/L)	ACE (g/L)	CO ₂ (g/L)	ETH (g/L)
B5	18,11	-	2,37	14,81	-	0,63	3,53	4,10

A curva de crescimento, consumo de glicose e produção dos metabólitos ao longo do tempo estão apresentados na Figura 22.

Figura 22: Curva de crescimento, consumo de glicose e formação de produtos ao longo de B5.

Os fatores de conversão de todos os experimentos em batelada apresentaram o mesmo perfil e foram calculados da mesma forma. A Figura 23 apresenta estes cálculos para a batelada B1 (1).

Os principais resultados desta batelada e das demais anteriores estão apresentados na Tabela 13.

Figura 23: Cálculo dos fatores de conversão para a batelada B1(1).

Tabela 13: Parâmetros e variáveis do processo das bateladas B1, B2, B3, B4 e B5 em biorreator.

Parâmetros fisiológicos e variáveis do processo		Bateladas							
		B1 pH=5.5, anaerobiose, 37°C				B2	B3	B4	B5
		B1 1	B1 2	B1 3	Média	pH=6.2, 37°C anaerobiose	pH=5.5, 37°C microaerobiose	pH=5.5, anaerobiose e 30°C	pH=5.5, microaerobiose, 37°C e SEM GLICEROL
$\mu_{X,max}$	(h ⁻¹)	1,04	1,13	0,94	0,99	1,01	0,85	0,48*	0,96
	r ² / CV(%)	0,994	0,998	0,99	0,98 / 3,03	1,00	0,99	0,994	0,995
X_{max}	(g/L)	2,83	2,89	2,66	2,79	2,82	3,64*	2,26*	2,20*
	CV (%)	-	-	-	4,27	-	-	-	-
Q_{PDO}	(g/L.h)	1,44	1,52	1,31	1,42	1,17*	1,00*	0,84*	-
	CV (%)	-	-	-	7,44	-	-	-	-
PDO_{max}	(g/L)	10,03	9,71	9,66	9,80	9,21*	8,77*	11,06*	-
	CV (%)	-	-	-	2,05	-	-	-	-
q_{PDO}	(g _{PDO} /g _X .h)	0,51	0,53	0,49	0,51	0,43*	0,27*	0,34*	-
	CV (%)	-	-	-	3,92	-	-	-	-
$Y_{PDO/GLY}$	(g _{PDO} /g _{GLY})	0,65	0,66	0,67	0,66	0,58*	0,57*	0,72*	-
	r ²	0,996	0,998	0,995	0,98	0,994	0,997	0,999	-
$Y_{X/GLC}$	(g _{CELL} /g _{GLC})	0,16	0,14	0,14	0,14	0,12*	0,19*	0,13*	0,16*
	r ²	0,98	0,988	0,994	0,98	0,98	0,98	0,98	0,995
$Y_{LAC/GLC}$	(g _{LAC} /g _{GLC})	0,70	0,76	0,78	0,74	0,74	0,70	0,80	0,78
	r ²	0,988	0,991	0,98	0,98	0,998	0,98	0,999	0,999
$Y_{ACE/GLC}$	(g _{ACE} /g _{GLC})	0,19	0,17	0,18	0,18	0,14*	0,20	0,23*	Não linear
	r ²	0,98	0,99	0,97	0,98	0,98	0,98	0,996	-
$Y_{ETH/GLC}$	(g _{ETH} /g _{GLC})	0,11	0,10	0,10	0,10	0,13*	0,09	0,09	0,22*
	r ²	0,98	0,98	0,9994	0,92	0,995	0,94	0,999	0,993
$Y_{CO2/GLC}$	(g _{CO2} /g _{GLC})	0,09	0,10	0,06	0,08	-	0,05*	0,03*	0,06*
	r ²	0,99	0,98	0,94	0,92	-	0,97	0,98	0,97
Q_{GLC}	(g/L.h)	2,58	2,97	2,71	2,75	2,25*	2,51	1,38*	2,75
	CV (%)	-	-	-	7,21	-	-	-	-
Q_{GLY}	(g/L.h)	2,17	2,48	2,25	2,30	2,01*	1,77*	1,16*	-
	CV (%)	-	-	-	7,00	-	-	-	-

* Valores estatisticamente diferentes quando comparado a B1 (nível de significância =5%)

5.4.6 Análise da Influência do pH

Nos cultivos em batelada só foram avaliados dois diferentes valores de pH, 5,5 em B1 e 6,2 em B2. Pode-se observar, na Tabela 13, que não houve diferenças significativas entre os $\mu_{X,m\acute{a}x}$ e $X_{m\acute{a}x}$. No entanto, a melhor condição quanto a produção de PDO em termos de $PDO_{m\acute{a}x}$, $Y_{PDO/GLR}$, Q_{PDO} e q_{PDO} foi em pH=5,5.

O aumento do pH, favoreceu a produção de etanol e a produção de lactato da mesma forma que os resultados encontrados por VALDEZ et al. (1997). Segundo os autores, em cultivos realizados com *L. reuteri* em cofermentação com maltose e glicerol o aumento do pH de 5,5 para 6,5 resultaram em uma maior formação de lactato, etanol e PDO e em diminuição na produção de acetato. Esses resultados em comparação com os obtidos neste trabalho só se diferem quanto à produção de PDO.

Pode-se notar também, através dos coeficientes de variação, que a alteração do pH do meio afetou o metabolismo do *L. reuteri*. O aumento do pH do meio desfavoreceu $Y_{X/GLC}$ e $Y_{ETH/GLC}$.

De acordo com YE et al. (1994), a glicose é transportada para o interior da célula por um H^+ simportador em *Lactobacillus brevis*. Assim, em pH ácido gera uma força motriz de prótons que pode facilitar a absorção de glicose e a velocidade de crescimento. Neste estudo, foi observado um aumento na taxa de consumo de glicose de 2,25 g/L.h para 2,75 g/L.h no pH mais ácido. A velocidade de consumo de glicerol também aumentou, provavelmente porque sua transformação está associada ao consumo de glicose.

O pH do meio de cultura pode influenciar muito no metabolismo, principalmente em situações mais drásticas. Com por exemplo, a alteração do pH ácido para básico de cultivos em anaerobiose em quimiostato de *L. bulgaricus*, resultou em uma mudança do metabolismo homofermentativo para heterofermentativo (RHEE; PACK, 1980). Esta mudança no metabolismo também foi descrita para *L. helveticus* (TORINO et al., 2001).

No entanto, não foi o objetivo deste trabalho otimizar o pH do meio. Apenas dois pHs foram testados e como o de 5,5 foi o mais adequado para a produção de PDO, este foi usado nos demais experimentos. Além disso, muitos trabalhos utilizam o pH do meio de cultivo igual a 5,5 para a produção de PDO por *Lactobacillus* (ARSKOLD et al., 2008; DOLEYRES et al., 2005; EL-ZINEY et al., 1998; RASCH et al., 2002; TOBAJAS et al., 2009)

5.4.7 Influência do glicerol no metabolismo da *L. reuteri*

Para avaliar a influência do glicerol no metabolismo em meio MRS, foram analisados os experimentos em batelada na presença (B3) e na ausência de glicerol (B5). Da mesma forma que os ensaios em frascos, os resultados indicaram que a presença de glicerol no meio favorece a produção de acetato e de biomassa. No entanto, desfavorece a produção de etanol. A produção total de CO₂ também foi favorecida (Figura 24).

LUTHI-PENG; DILEME; et al. (2002) e (EL-ZINEY et al., 1998) em experimentos com *L. reuteri* em meio com glicerol também observaram uma maior produção de biomassa e acetato. No entanto, os autores também afirmam que houve um aumento na produção de lactato, fato não observado neste trabalho ($Y_{LAC/GLC}$ estatisticamente iguais em B3 e B5, Tabela 13).

Figura 24: Comparação entre os experimentos em batelada B3 e B5.

Os resultados de trabalhos realizados com *L. diolivorans*, *L. bucheri* e *L. brevis* indicam que a cofermentação de glicose e glicerol gera mudanças nas reações de consumo e produção de NADH durante o catabolismo da glicose (PFLUGL et al., 2012; VEIGA-DA-CUNHA; FOSTER, 1992). Primeiramente, o acetil fosfato é convertido em

ácido acético ao invés de etanol, assim, deixa de gastar 2 moles de NADH normalmente consumida durante a formação do etanol. O acetil fosfato é depois desfosforilado pela enzima acetato quinase gerando um mol de ATP por mol de ácido acético formado. Em segundo lugar, uma parte do piruvato disponível é convertido em acetil fosfato e subsequentemente a ácido acético em vez de ácido láctico. A enzima que converte 1 mol de piruvato em 1 mol de acetil fosfato e libera 1 mol de CO₂ é a piruvato oxidase, que usa fosfato livre para fosforilar o grupo acetil remanescente após o CO₂ liberado. O acetil fosfato é então metabolizado, como descrito acima para o ácido acético, com o ganho de 1 mol de ATP. Em terceiro lugar, o ácido láctico acumulado é reoxidado em piruvato, que ainda é metabolizado em ácido acético e CO₂, com um ganho de 1 mol de ATP (PFLUGL et al., 2012; VEIGA-DA-CUNHA; FOSTER, 1992). Para *Lactobacillus reuteri* as enzimas piruvato oxidase (EC 1.2.3.3) e a D-lactato desidrogenase (EC 1.1.2.4) não foram confirmadas no genoma (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00620&show_description=show). Além disso, é provável que se estas enzimas fossem produzidas a concentração final de lactato seria menor, o que não foi observado.

O glicerol atua no meio como acceptor externo de elétrons e reoxida o NADH mais rapidamente que o etanol (KANG; KORBER; TANAKA, 2013a; ZAUNMÜLLER et al., 2006). A produção de acetato em meio sem glicerol foi muito pequena, chegando no máximo a uma concentração igual a 0,63 g/L. Quando a glicose é fermentada na presença de um acceptor externo de elétrons, uma parte do acetil-P e acetil-CoA não são mais necessários como acceptor de elétrons, fazendo com que seja formado acetato ao invés de etanol. Como consequência, há um aumento na formação de ATP e na biomassa dos experimentos com glicerol (ZAUNMÜLLER et al., 2006). Segundo BAEZA-JIMENEZ et al. (2011) a formação de acetato é conveniente, pois gera ATP, ou seja, mais energia para o crescimento das células.

Os resultados obtidos mostram que a produção de lactato não foi influenciada pela adição de glicerol, indicando que este substrato só compete na produção de etanol. Provavelmente, por ser a rota energeticamente mais favorável, como discutido anteriormente.

A adição do glicerol fez com que houvesse linearidade entre consumo de glicose e a formação de acetato ($Y_{ACE/GLC}$), diferentemente do cultivo sem glicerol, no qual este subproduto é formado em quantidades quase desprezíveis (0,6 g/L).

Existem outros compostos que atuam como aceptores externos de elétrons além do glicerol, como por exemplos, piruvato, oxigênio, frutose, citrato e oxigênio (ZAUNMÜLLER et al., 2006).

5.4.8 Análise do efeito do oxigênio nos experimentos em batelada

Foram realizados experimentos em anaerobiose (com injeção de N₂) e em microaerobiose (injeção de ar), representados pelos ensaios B1 e B3.

Pode-se observar que a presença de oxigênio no meio de cultura não influenciou o $\mu_{X,m\acute{a}x}$ e tampouco o metabolismo da glicose, representado pelos fatores de conversão $Y_{LAC/GLC}$, $Y_{ACE/GLC}$ e $Y_{ETH/GLC}$, apresentados na Tabela 13. Entretanto, o oxigênio no meio favoreceu a rota de produção de biomassa, como indicam o $Y_{X/GLC}$ e $X_{m\acute{a}x}$, o qual foi 32% maior que em anaerobiose. A produção final de CO₂ foi maior no cultivo em microaerobiose, no qual houve maior produção de biomassa. No entanto, $Y_{CO2/GLC}$ foi maior em B1.

A produção de PDO foi desfavorecida nos experimentos em microaerobiose. Pode-se notar que $PDO_{m\acute{a}x}$, Q_{PDO} , $Y_{PDO/GLY}$ foram menores quando comparado ao experimento B1. Ambos, q_{PDO} e Q_{GLR} , foram reduzidos em 53% e 77%, respectivamente, na presença de oxigênio. Estes fatos são esperados, pois sabe-se que o oxigênio é um acceptor externo de elétrons e por isso compete com o glicerol (KANG; KORBER; TANAKA, 2013b), resultando em uma menor produção de PDO.

A maioria dos *Lactobacillus* são estritamente fermentativos, mas aerotolerantes (KANDLER, 1983). A respiração aeróbia requer uma cadeia de transporte de elétrons funcional formados por citocromos com oxigênio com acceptor final de elétrons, resultando na formação de ATP (GENNIS; STEWART, 1996). Os *Lactobacillus* em geral não possuem citocromos e são dismutase-superóxido e catalase negativos. No entanto, possuem NADH oxidases/peroxidases que oxidam NADH utilizando oxigênio como acceptor final de elétrons (KANDLER; STETTER; KOHL, 1980; TSENG; MONTVILLE, 1992).

5.4.9 Influência da temperatura nos cultivos em batelada

Para avaliar o efeito da temperatura, comparou-se os experimentos B1 e B4. Ambos cultivados sob as mesmas condições, no entanto B1 a 37°C e B4 a 30°C.

A diminuição da temperatura provocou uma diminuição de 48 % no $\mu_{X,máx}$. A 30°C, as células cresceram em uma velocidade mais lenta e alcançaram um $X_{máx}$ também menor (cerca de 12%). Consequentemente, as velocidades de consumo de glicose e glicerol também foram reduzidas (Tabela 13).

PFLUGL et al. (2012) realizaram cultivos para produção de PDO a 30°C com *Lactobacillus diolivorans* e alcançaram elevadas concentrações (*titer*) do produto e um fator de conversão de $Y_{PDO/GLR}$ igual a 0,75 g_{PDO}/g_{GLR}.

KANG; KORBER; TANAKA (2014) avaliaram o efeito da temperatura em cultivos com *L. panis* PM1 e concluíram que esta variável afeta a produção de PDO e que a 30°C houve um aumento de 75% na concentração de PDO.

Da mesma forma que os resultados encontrados por PFLUGL et al. (2012) e KANG et al. (2014), o cultivo com 30°C aumentou a produção de PDO. Neste cultivo, houve um aumento de 13% na concentração final de PDO e a conversão de glicerol a PDO foi favorecida, representado um $Y_{PDO/GLR}$ 10% maior que o encontrado a 37°C. No entanto, a produtividade foi 42% menor, fazendo com que o processo seja menos eficiente que a 37°C.

5.4.10 Análise dos resultados em Batelada

A maior produção de PDO alcançada nas bateladas foi no experimento com a menor temperatura, B4. O rendimento global em B4 de glicerol em PDO foi de 88% em mols, seguido de B1 com 78%. No entanto, B4 obteve a menor produtividade e B1 a maior dentre os testes. Estes resultados indicam que as condições de cultivo utilizadas em B1 são as mais adequadas para a produção de PDO.

Dentre os experimentos com adição de glicerol, pode-se observar também que em B1 a velocidade de consumo de glicose foi a mais alta (Tabela 13). Esses dados podem indicar uma relação entre Q_{GLC} e Q_{PDO} , ou seja quanto maior Q_{GLC} , maior Q_{PDO} . O tipo de processo ideal pode ser aquele que favoreça este consumo de glicose.

A produtividade de PDO alcançada em B1 foi de 1,42 g/L.h. Pode-se observar que este valor é maior do que os valores encontrados na literatura para experimentos com *Lactobacillus* (BAEZA-JIMENEZ et al., 2011; EL-ZINEY et al., 1998; PFLUGL et al., 2012). No entanto, a concentração final de PDO pode ser melhorada.

PFLUGL et al. (2012) em cultivos em batelada com *L. diolivorans*, apesar de uma produtividade mais baixa (0,69 g/L.h), alcançou uma concentração final de PDO igual a 41,7 g/L. Os resultados dos experimentos realizados em frascos apresentados na seção 5.2.4, mostram que somente a adição de glicerol e glicose no meio não foi suficiente para aumentar a produção de PDO. Aliás, a partir de aproximadamente 1 dia, o consumo de glicose e glicerol foi cessado. Outros ensaios com o intuito de aumentar esta produção devem ser realizados.

A Tabela 14 apresenta o balanço global de carbono dos experimentos em batelada. Com este balanço foi possível obter mais informações sobre a influência de cada variável nos experimentos em batelada.

Pode-se observar que, em média, 39 % da fonte de carbono utilizada para a formação dos produtos como biomassa, lactato, acetato, etanol e CO₂ advém de outras fontes de carbono presentes na peptona e nos extratos de levedura e de carne.

Na Tabela 14, as células coloridas representam os metabólitos que foram mais favorecidos (azul) e os menos favorecidos (rosa) em termos de quantidade de carbono dentre as bateladas. Por exemplo, as condições do experimento B3 favoreceram a produção de biomassa e de etanol, no entanto a produção de lactato foi a menor.

Tabela 14: Balanço de carbono dos experimentos em batelada.

BALANÇO DE CARBONO (g C)							
BATELADAS	GLC	Outras fontes de C	BIOM	LAC	ACE	ETH	CO ₂
B1	7,13	4,24	1,32	5,72	1,36	0,97	1,91
B2	7,03	?	1,34	6,23	1,10	1,21	-
B3	7,12	5,77	1,73	5,48	1,48	1,19	3,00
B4	6,84	3,83	1,07	5,84	1,73	0,79	1,24
B5	7,24	4,12	1,13	5,92	0,25	2,14	1,93

Com os resultados dos experimentos em batelada, foi possível conhecer um pouco mais sobre esta cepa. Consequentemente, avaliar quais alternativas seriam possíveis para melhorar este processo para torná-lo economicamente viável. Para tal,

uma estratégia poderia ser a otimização do meio de cultura, uma vez que o meio MRS (Difco) é um meio complexo e com um alto custo. Outra estratégia seria a mudança no modo de operação, visando maiores rendimentos e produtividades.

A principal estratégia adotada neste projeto para a melhoria da produção de PDO foi quanto à sua forma de operação. Para isso, foi proposto realizar cultivos em Batelada Alimentada, Batelada Repetida e Contínuo (quimiostato), e comparar qual a melhor forma de operação.

Primeiramente, optou-se em realizar cultivos em batelada alimentada, uma vez que é um processo que alcança altas concentrações de PDO quando comparado aos processos em batelada e em contínuo.

5.5 EXPERIMENTOS EM BATELADA ALIMENTADA

O processo em batelada alimentada é bastante utilizado por alcançar uma produtividade maior que da batelada. Existem muitas vantagens neste tipo de processo, uma delas que, por exemplo, é possível minimizar os efeitos do controle do metabolismo ou de inibição por substrato. O substrato é adicionado gradativamente, sendo assim maiores quantidades do substrato poderão ser convertidos no produto de interesse (SCHIMIDELL *et al.*, 2001).

Para que a utilização deste processo seja eficiente, é importante que não haja formação de metabólitos ou produtos que sejam tóxicos ao microrganismo (SHULER e HARGI (2002); SCHIMIDELL *et al.* (2001)).

Os resultados do teste de toxicidade do lactato apresentaram alto grau de inibição a 4 g/L. Sendo assim, o processo em batelada alimentada com este microrganismo nestas condições, não seria eficiente.

5.5.1 Ensaios em processo semi contínuo ou batelada repetida

Neste processo, após o término da fermentação em batelada, retira-se parte do caldo fermentado ($\alpha.V$, sendo $0 < \alpha < 1$) e adiciona-se a mesma quantidade de meio fresco. Ou seja, é um processo com sucessivas bateladas, no qual o caldo não retirado do reator será o inóculo da próxima batelada (SCHIMIDELL *et al.*, 2002).

BORZANI et al. (1993) realizaram cultivos com *L. bulgaricus* e propuseram um modelo matemático para explicar a influência da fração do volume do inóculo para a próxima batelada na produtividade do lactato. Ou seja, indiretamente avaliaram a fração de meio retirado do reator, tais como: 0,8; 0,7; 0,6 e 0,5. Os resultados indicaram que quanto menor o α , menor a produtividade para este processo.

Para a otimização deste tipo de processo, é necessário determinar algumas das variáveis principais. Uma delas é a quantidade de meio fermentado ideal a ser retirado do reator, isto é, interessa-nos saber de que maneira a fração α afeta a produtividade do processo. Para isso, foi realizado o cultivo denominado BR1.

Outra variável é a razão entre glicerol e glicose no meio, que só está descrita na literatura para processos em batelada. Como na batelada repetida o processo se inicia com um inóculo maior, pode ser que esta razão seja diferente. Quanto mais glicerol a célula conseguir metabolizar, maior a concentração de PDO. Por isso, foram testadas diferentes concentrações de glicerol no meio de cultura, este ensaio foi chamado de BR2.

A concentração de células no inóculo também é uma variável muito importante. Porém, na maioria dos casos está diretamente associada à fração de volume do meio retirado do reator, a não ser que haja reciclo de células. Provavelmente, se as células forem concentradas antes da retirada do meio, mais rápido será a conversão do glicerol em PDO.

Nos cultivos em frascos, observou-se que este microrganismo decanta facilmente. Para aproveitar esta característica foi proposto um experimento em batelada repetida no qual a retirada do meio só seria realizada após a decantação das células. Este experimento foi denominado BR3.

Os três cultivos foram realizados em anaerobiose (0,75 L/min de N_2) a 37°C, 150 rpm em 1,5 L de volume de trabalho. Entre os experimentos, houve variação na concentração de glicerol no meio MRS (Difco) e no pH, os quais estão descritos nos itens posteriores.

5.5.2 Batelada repetida com variação na fração de meio retirado (BR1)

O objetivo deste ensaio foi avaliar Q_{PDO} em diferentes frações de meio retirado. Para isso, foram testados 3 frações (α) diferentes: 0,8; 0,5 e 0,2. O término de cada batelada foi controlado pela concentração residual de glicerol, ou melhor, a outra

batelada só foi iniciada quando o glicerol no meio havia sido esgotado. Os resultados estão apresentados na Figura 25.

O processo se iniciou com uma batelada comum até o consumo total do glicerol, neste momento, se iniciou o processo de batelada repetida com retirada de 80% de meio fermentado, ou seja, 1,2 L. Como houve alguns problemas na bomba na primeira troca, é provável que o α na primeira tenha sido menor. Por isso, a condição com $\alpha=0,8$ foi realizada 4 vezes, mas para os cálculos estatísticos a primeira não foi considerada.

Figura 25: Absorbância, a produção de CO₂, concentrações dos substratos e dos metabólitos e produtividade ao longo do cultivo BR1.

Após a terceira repetição com $\alpha=0,8$, fez-se uma nova batelada retirando 50% do meio (750 mL), no qual foram realizadas duas vezes. Logo em seguida, foram testadas duas vezes um α igual a 20% (300 mL). Por fim, voltou-se a condição inicial ($\alpha=0,8$), para observar se houve mudanças no metabolismo do *L. reuteri* ao longo do experimento.

Verificou-se que as concentrações máximas celulares (mensuradas pela absorbância) e de lactato em cada batelada foram estatisticamente iguais. A produção de acetato aumentou levemente e a de etanol diminuiu com a diminuição de alfa. Os

resultados indicam que nestas condições, ou seja, quando há desvio na rota para a produção de acetato, maior será a produção de PDO.

Com pode ser notado na Figura 25, existe um pequeno aumento na produção de PDO com a diminuição de alfa. A produtividade média também foi maior quando alfa foi menor (Figura 25 e 26).

Para determinar qual o alfa ideal, o parâmetro principal analisado foi a produtividade. A Figura 26 mostra que a 50% do volume de meio retirado gerou uma maior produtividade no processo.

No entanto, os resultados indicam que em processo contínuo a produtividade será maior que em batelada comum. Vale lembrar que quanto mais próximo o alfa de 1, mais a batelada repetida se aproxima de uma batelada comum e quanto mais próximo de zero, mais próximo o cultivo se torna de um contínuo (SCHIMIDELL *et al.*, 2002).

O valor de 1 no gráfico é hipotético, pois um seria a retirada total do meio. Este ponto apenas está representando a produtividade do processo em batelada comum.

Figura 26: A influência da fração do volume de meio retirado na produtividade de PDO do processo em Batelada repetida.

5.5.3 Batelada repetida com variação na concentração de glicerol no meio de cultura (BR2)

A ideia inicial para o ensaio BR2 era a realização da batelada repetida com decantação de células. Por isso, pode-se observar no gráfico (Figura 27) que após a fase inicial da batelada comum, foram retirados 80% do volume do reator (0,8 dec). Apesar de o ensaio anterior ter mostrado que um α igual a 0,5 alcança maior produtividade, se o

processo de decantação for eficiente é mais interessante concentrar as células, sendo assim retirar a maior quantidade de meio fermentado possível.

Sendo assim, para que houvesse a decantação das células, cessou-se a agitação e o fluxo de nitrogênio e esperou-se por trinta minutos. Porém, foi possível observar que as células não decantaram como era esperado, ou melhor, como acontecia nos experimentos em frascos.

Desse modo a estratégia de decantação foi adiada e foi testada a razão entre a concentração molar de glicose e glicerol (r) no meio de cultivo, para isso, o α utilizado foi de 0,5. A primeira troca do reator com este valor de α foi realizada para o controle do experimento e “ r ” igual a 0,58 mol_{GLC}/mol_{GLR}.

Nesta etapa, a máxima concentração celular alcançada foi 2,7 g/L (Abs=8,7) e a concentração máxima de PDO foi de 10,5 g/L (Figura 27). Se comparado com o experimento BR1 na mesma fração, pode-se notar que há reprodutibilidade dos experimentos.

Figura 27: Absorbância, a produção de CO₂, concentrações dos substratos e dos metabólitos e produtividade ao longo do cultivo BR2.

Assim que o glicerol no meio reacional esgotou, foi retirado novamente 50% do meio e adicionado na mesma quantidade meio fresco de MRS (Difco) contendo 20 g/L de glicerol. A concentração final deste substrato no reator foi igual 8,7 g/L. Neste ponto, a razão molar entre glicose e glicerol foi de 0,43 mol_{GLC}/mol_{GLR}. A concentração máxima de PDO aumentou em 6,7% e a produtividade média foi igual a 2,90 g/L.h, ou seja, diminuiu 7,4% em relação ao controle ($r=0,58$ mol_{GLC}/mol_{GLR}). No entanto, em relação a produtividade, estes valores são estatisticamente iguais.

Novamente, após o termino do glicerol residual, foi retirado 50% do meio e adicionado meio fresco contendo 30 g/L de glicerol. Neste momento, a concentração no reator de glicerol subiu para 13 g/L e a razão (r) ficou igual a 0,29 mol_{GLC}/mol_{GLR}. A concentração final de PDO aumentou em 33% (14 g/L) e a produtividade média diminuiu em 33% em relação ao controle. A concentração celular também aumentou, alcançando 3,23 g/L.

Por fim, a troca de 50% de meio foi realizada com meio MRS (Difco) contendo 50 g/L de glicerol. A concentração final de glicerol no reator foi de 20,7 g/L e o " r " foi igual a 0,17. A máxima concentração celular nesta batelada foi igual a 3,39 g/L. Em relação a produção de PDO, novamente houve um acréscimo de PDO_{Máx} e um decréscimo de Q_{PDO} em 35% e 72%, respectivamente.

As células não resistiram a esta condição. Houve uma tentativa de voltar à condição inicial do meio (experimento controle), porém sem sucesso. TOBAJAS et al. (2009) cultivaram *L. reuteri* em meio MRS com 36,8 g/L de glicerol e segundo os autores, esta concentração não foi tóxica para as células. Por este motivo, é provável que as células não tenham resistido ao estresse do experimento e não apenas pela concentração de glicerol no meio de cultivo.

Os resultados dos experimentos em frascos (seção 5.6.2) também indicaram que não há inibição pelo glicerol em concentrações até 35 g/L. A Tabela 15 apresenta os principais resultados deste experimento.

A glicose apesar de não produzir diretamente 1,3-propanodiol na sua via de degradação, observou-se que sua velocidade de consumo está relacionada à formação deste produto, assim como nos resultados em batelada. Os maiores valores de Q_{PDO} alcançados foram nos experimentos controle e com adição de 20 g/L de glicerol. Aliás, foram nestas bateladas que também obtiveram-se um maior Q_{GLC}.

Tabela 15: Principais resultados do experimento BR2 em diferentes concentrações de glicerol.

	Batelada	0,5	0,5+20	0,5+30	0,5+50
r (mol _{GLC} /mol _{GLR}) no meio	0,61	0,58	0,43	0,29	0,17
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	2,89	2,70	3,10	3,23	3,39
PDO _{Máx}	9,7	10,5	11,2	14,0	14,2
Q_{PDO} (g/L.h)	1,52*	3,01	2,90	2,02*	0,84*
q_{PDO} (g _{PDO} /g _X .h)	0,53	3,36	2,87	1,74	2,52
$Y_{\text{PDO/GLR}}$ (g _{PDO} /g _{GLR})	0,64	0,68	0,59	0,52*	0,45*
$Y_{\text{LAC/GLC}}$ (g _{LAC} /g _{GLC})	0,76	0,90	0,97	1,13	1,10
$Y_{\text{ACE/GLC}}$ (g _{ACE} /g _{GLC})	0,17	0,20	0,24	0,25	0,25
$Y_{\text{ETH/GLC}}$ (g _{ETH} /g _{GLC})	0,10*	0,05	0,06	0,03*	0,09*
$Y_{\text{X/GLC}}$ (g _X /g _{GLC})	0,14*	0,03	0,08	0,14*	0,13*
Q_{GLC} (g/L.h)	2,97	4,17	3,97	1,98	0,99
Q_{GLR} (g/L.h)	2,48	3,67	4,75	3,55	1,52

Os asteriscos indicam que há diferenças significativas entre o controle (0,5) e a nova condição testada.

A Figura 28 apresenta com maior clareza a influência de “r” na produção de biomassa, produção de PDO e o comportamento do metabolismo diante das diferentes condições. Pode-se observar que há uma tendência de queda em $X_{\text{Máx}}$, $Y_{\text{X/GLC}}$, $Y_{\text{LAC/GLC}}$, $Y_{\text{ACE/GLC}}$, $Y_{\text{ETH/GLC}}$ e PDO_{Máx}. No entanto, Q_{PDO} e $Y_{\text{PDO/GLR}}$ aumentaram com o aumento de r.

As melhores produtividades médias foram entre as razões iguais a 0,58 e 0,29 mol_{GLC}/mol_{GLR}. O $Y_{\text{PDO/GLR}}$ em cada batelada foi maior em “r” igual 0,58 e 0,43 mol_{GLC}/mol_{GLR} (Figura 28), valor próximo ao encontrado na literatura para batelada simples, que é de 0,5 g_{PDO}/g_{GLR} (TOBAJAS *et al.*, 2007; BAEZA-JIMÉNEZ *et al.*, 2011).

Diferentemente dos resultados obtidos em frascos (5.2.4), estes resultados indicaram que é possível aumentar a concentração de PDO, aumentando a concentração de glicerol no meio.

Figura 28: Influência de “r” na produção de biomassa, na produtividade e nos fatores de conversão.

5.5.4 Batelada repetida com decantação celular (BR3)

Antes de se iniciar este experimento, foram realizados alguns testes em cultivos em frascos. Como mencionado anteriormente, foi observado que as células se decantam facilmente nos experimentos realizados em frascos, porém no reator isto não ocorreu.

Uma das diferenças entre esses experimentos é a forma de agitação e o controle de pH que é feito no reator. O pH do frasco após a fase exponencial de crescimento é de, aproximadamente, 4,2. Por este motivo, ajustou-se o pH do frasco para 5,5 (igual ao pH do meio no reator) e pôde-se observar que as células não decantaram mais. Adicionou-se ácido novamente até o pH de 4,2 e novamente houve decantação. Ou seja, a adição de ácido, diminuição do pH, favorece a interação entre as bactérias, formando aglomerados que são facilmente decantáveis.

Com estes resultados a estratégia utilizada para este experimento foi decantar as células com ajuste do pH. O processo se iniciou com uma batelada simples em meio MRS (Difco) com 15 g/L de glicerol ($r=0,6$), porém sem controle de pH. A Figura 29 apresenta esses resultados.

Figura 29: Cultivo em batelada repetida com decantação de células (BR3).

Na tentativa de otimização do processo, inclusive nos custos, primeiramente foi testado o cultivo sem o controle de pH. Uma vez que, ao encher o reator com meio fresco o pH ficaria em torno de 5,5 e iria diminuindo até o fim do glicerol e início de um novo ciclo. Neste momento, o pH estava baixo suficiente para a decantação das células, conforme planejado.

Quando a concentração residual de glicerol estava próxima de zero, esperou-se 15 min para as células decantarem (Figura 30). Após este tempo, retirou-se 1,2 L de meio, praticamente sem células e o reator foi completado novamente até 1,5 L. Este ciclo se repetiu por mais uma vez, até que as células passaram a não decantar mais com o mesmo pH da condição anterior.

Se observarmos no gráfico de absorvância x tempo (Figura 29 – círculo vermelho), da primeira condição para a segunda pode-se observar que as células já não decantaram como na primeira vez, pois há uma grande diferença na concentração do “inóculo”. Estas diferenças deveriam ser menores, ou na segunda condição a concentração do inóculo deveria ser maior uma vez que houve crescimento e a retirada de células é pequena devido a decantação. Este resultado indica que a decantação de células não estava sendo eficiente. Por isso, após ter um controle sem decantação em pH 5,5, resolveu-se controlar o pH e só abaixar para 4,0 no momento da decantação. Esta nova condição foi repetida 3 vezes.

Figura 30: Foto do biorreator no momento da decantação celular.

Pode-se observar que a concentração máxima de PDO nas etapas com decantação de células é alcançada rapidamente, ou seja, em produtividades superiores quando comparada a batelada comum e a batelada repetida. Estes dados podem ser melhor observados na Tabela 16. A condição de reciclo 0,8 sem controle de pH e as repetições com reciclo com controle de pH foram realizadas mais de uma vez, para a análise estatística, estes dados foram tratados como se fossem repetições (duplicata e triplicata).

As comparações entre a batelada comum, a batelada repetida com 80% de meio retirado (0,8 pH=5,5) e a batelada repetida com 80% do meio retirado com retenção de células por decantação são mostrados na Tabela 16.

A concentração máxima de células alcançada foi igual a 4,09 g/L, representando um valor 1,5 vezes maior que no controle. Pode-se observar também que o processo em batelada repetida com retenção de células provocou um aumento de 2,4 vezes em Q_{PDO} quando comparado com o processo em batelada repetida normal. Se comparada com a batelada, houve um aumento de 3,3 vezes.

Tabela 16: Principais parâmetros calculados no BR3.

	Batelada	0,8 pH=5,5 (Controle)	Repetições com decantação e pH=5,5 (3x)
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	3,06	2,82	4,09*
$PDO_{\text{Máx}}$	11,0	10,6	10,6
Q_{PDO} médio (g/L.h)	1,24	1,68	4,12*
q_{PDO} (g _{PDO} /g _X .h)	0,42	0,79	2,36
$Y_{PDO/GRL}$ (g _{PDO} /g _{GRL})	0,79*	0,68	0,72
$Y_{LAC/GLC}$ (g _{LAC} /g _{GLC})	0,71*	0,82	0,81
$Y_{ACE/GLC}$ (g _{ACE} /g _{GLC})	0,24*	0,20	0,20
$Y_{ETH/GLC}$ (g _{ETH} /g _{GLC})	0,08	0,09	0,07*
$Y_{X/GLC}$ (g _X /g _{GLC})	0,16	0,15	0,15
Q_{GLC} (g/L.h)	2,09	2,68	6,53
Q_{GLR} (g/L.h)	1,61	2,31	5,81

*Os asteriscos na tabela indicam que há diferença significativa entre o a condição analisada e o controle.

Quanto à velocidade de consumo de glicose, novamente no processo em que obteve-se maior valor de Q_{GLC} , alcançou-se maior Q_{PDO} . Os resultados indicam que este tipo de processo pode ser viável, uma vez que além do aumento da produtividade, o $Y_{PDO/GLR}$ se manteve em 0,72 g_{PDO}/g_{GRL}.

Vale ressaltar que não foi encontrado na literatura nenhum experimento com batelada repetida com decantação de células para a produção de PDO. Além disso, o valor alcançado de Q_{PDO} é o maior para produção de PDO em *Lactobacillus*, reportado até o momento.

5.6 EXPERIMENTOS EM QUIMIOSTATO

Como mencionado na Revisão Bibliográfica (item 3.7), alguns trabalhos sugerem que cultivar *Lactobacillus reuteri* em processo contínuo favorece a produção de 3-HPA ao invés de PDO (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; DOLEYRES et al., 2005; EL-ZINEY et al., 1998; LUTHI-PENG; SCHARER; et al., 2002).

Porém, os resultados da batelada repetida com diferentes frações de volume de meio retirado (BR1, Figura 26) indicaram que o alfa igual a 0,2 alcançou uma produtividade maior do que na batelada (lembrando que quanto menor o alfa, mais próximo uma batelada repetida se torna de um processo contínuo). Por esta razão, além da possibilidade de entender o metabolismo do microrganismo, optou-se em realizar experimentos contínuos em quimiostato.

Como mencionado em Material e Métodos, foram alcançados doze estados estacionários em diferentes condições em quimiostato. Estas condições foram alcançadas em quatro experimentos contínuos. Para avaliar a variabilidade dos ensaios, a condição C1 foi realizada duas vezes, enquanto a condição C2 foi realizada quatro vezes. A variabilidade entre as condições foi pequena, não ultrapassando um cv de 10%.

Os experimentos em quimiostato foram realizados em meio MRS (original ou modificado) com adição de glicerol a 37°C, pH 5,5, vazão de gás igual a 0,75 L/min e frequência de agitação em 150 rpm (com exceção do C7). A razão entre glicose e glicerol (r) e a taxa de diluição foram as principais variáveis estudadas.

As Figura 31, 32, 33 e 34 apresentam os resultados dos experimentos contínuos, como biomassa, glicose e glicerol residuais, além das concentrações de PDO, lactato, acetato, etanol e CO₂ ao longo do tempo. As linhas tracejadas indicam a mudança de condição. Vale lembrar que todo experimento contínuo iniciou-se com uma batelada.

A Figura 31, apresenta os resultados da condição C2 ($D=0,5 \text{ h}^{-1}$). Pode-se notar que essa condição alcançou o estado estacionário.

Figura 31: Concentrações dos substratos residuais e dos produtos em uma das condições C2.

Além dos resultados das condições C2 (duas repetições), a Figura 32 apresenta as condições C8 a C11. Neste experimento, a condição C8 não alcançou o estado estacionário, pois a concentração de glicerol e dos metabólitos ainda não estavam constantes.

Figura 32: Concentrações dos substratos residuais e dos produtos nas condições C2, C9, C10 e C11.

As condições C1 (duas repetições) juntamente com as condições C3 a C8 (repetição da condição anterior em que não foi possível alcançar o estado estacionário) foram realizados no experimento contínuo apresentado na Figura 33. Neste ensaio foi realizado uma repetição da condição controle (C2). No entanto, não se considera ter alcançado o estado estacionário, uma vez que ocorreram problemas na bomba de alimentação. Tais contratempos foram resolvidos com a substituição do equipamento.

Para facilitar a visualização dos dados, pode-se observar (Figura 33) que o experimento foi dividido em dois gráficos. A primeira parte está representada pelo tempo inicial até 110 horas de cultivo e a segunda de 110 até 190 horas.

Figura 33: Concentrações dos substratos residuais e dos produtos nas condições C1, C3, C4, C5, C6, C7 e C8.

Pode-se observar que mesmo após três alterações na concentração inicial de glicose e glicerol no meio, a condição controle (no caso C2) permaneceu sem alterações significativas. Este fato também foi observado por COSTA (2008) em cultivos contínuos com *Streptomyces olindensis* para a produção de retamicina. Segundo o autor, as perturbações causadas no sistema em cada estado estacionário não influenciam o estado estacionário seguinte.

A Figura 34 apresentam os resultados de mais uma repetição de C2, além da condição com o meio MRS concentrado (C12).

Figura 34: Concentrações dos substratos residuais e dos produtos nas condições C2 e C12.

Até este ponto foram apresentados os resultados dos experimentos, bem como aspectos operacionais dos mesmos. Na sequência deste documento, procede-se com a análise e interpretação destes resultados, bem como a contribuição alcançada.

5.6.1 C1

O experimento denominado C1 foi realizado em duplicata - C1(1) e C1(2) - em anaerobiose plena (injeção de N_2) a uma taxa de diluição igual a $0,25\text{ h}^{-1}$. O meio utilizado foi o MRS com adição de glicose e glicerol, resultando uma concentração final média de $22,6\text{ g/L}$ de glicose e 24 g/L de glicerol.

A razão média entre glicose e glicerol consumida foi igual a $0,52\text{ mol}_{\text{GLC}}/\text{mol}_{\text{GLR}}$, a qual difere da razão adicionada ao meio de alimentação ($0,48\text{ mol}_{\text{GLC}}/\text{mol}_{\text{GLR}}$). Os principais resultados de cada quimiostato em estado estacionário estão apresentados na Tabela 17. Nota-se também que os valores dos coeficientes de variação (cv) não ultrapassam os 10% estabelecidos para a confirmação do estado estacionário e, tampouco, na comparação entre os experimentos, indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Nestas condições de cultivo, houve consumo de $21,68\text{ g/L}$ de glicose, gerando $3,27\text{ g/L}$ de biomassa seca, $18,67\text{ g/L}$ de lactato, $4,46\text{ g/L}$ de acetato, $0,99\text{ g/L}$ de etanol e $5,09\text{ g/L}$ de CO_2 . O consumo de $21,24\text{ g/L}$ de glicerol resultou em $14,77\text{ g/L}$ de PDO.

A produtividade de PDO alcançada nesta condição foi igual a $3,69\text{ g/L.h}$ e a taxa de produção específica global de PDO foi de $1,13\text{ g}_{\text{PDO}}/\text{g}_{\text{x.h}}$.

As velocidades globais específicas de consumo de glicose e glicerol foram respectivamente iguais a 5,42 g/L.h e 5,31 g/L.h. Os fatores de conversão em gramas estão apresentados na Tabela 17. Ressalta-se que os maiores fatores de conversão são o $Y_{PDO/GLY}$ igual a 0,70 g_{PDO}/g_{GLR} e o $Y_{LAC/GLC}$ com 0,86 g_{LAC}/g_{GLC}.

Com os resultados das análises das amostras em estado estacionário torna-se possível fazer um balanço de carbono, além de encontrar um modelo para representar a estequiometria das reações de consumo de glicose e de glicerol.

Todos os valores apresentados no fluxo metabólico estão apresentados em mol, inclusive a biomassa. A fórmula elementar utilizada para a biomassa foi $C_4H_7O_2N$, correspondente a um peso molecular igual a 101 g/mol (CHEN et al., 2003; XIU et al., 2007). A Figura 35 ilustra o mapa metabólico para esta condição de cultivo. Os números apresentados nas células em azul indicam o valor em mols encontrado no estado estacionário. Os números em verde significam o valor calculado baseado no balanço de carbono.

Tabela 17: Principais resultados de C1 - Consumo de substratos e formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO2/GLC} (g _{CO2} /g _{GLC})
C1(1)	3,22	20,57	21,03	17,93	4,77	0,97	15,20	4,86	0,16	0,72	0,87	0,23	0,05	0,24
	3,23	20,51	21,10	17,83	4,95	0,95	15,17	4,86	0,16	0,72	0,87	0,24	0,05	0,24
	3,20	20,58	21,40	17,89	4,84	0,96	15,18	4,86	0,16	0,71	0,87	0,24	0,05	0,24
Média EE1	3,22	20,55	21,18	17,89	4,85	0,96	15,18	4,86	0,16	0,72	0,87	0,24	0,05	0,24
CV (%)	0,42	0,18	0,93	0,27	1,87	1,04	0,09	0,00	0,59	0,97	0,14	2,03	0,75	0,00
C1(2)	3,35	22,80	21,20	19,52	4,10	0,99	14,46	5,31	0,15	0,68	0,86	0,18	0,04	0,23
	3,30	22,73	21,43	19,30	4,00	1,04	14,20	5,32	0,15	0,66	0,85	0,18	0,05	0,23
	3,29	22,91	21,27	19,57	4,10	1,05	14,40	5,32	0,14	0,68	0,85	0,18	0,05	0,23
Média EE2	3,31	22,81	21,30	19,46	4,06	1,02	14,35	5,32	0,15	0,67	0,85	0,18	0,04	0,23
CV (%)	1,00	0,39	0,57	0,73	1,36	3,10	0,97	0,06	1,17	1,53	0,41	1,06	3,00	0,40
Média C1	3,27	21,68	21,24	18,67	4,46	0,99	14,77	5,09	0,15	0,70	0,86	0,21	0,05	0,23
CV C1 (%)	1,74	5,73	0,76	4,66	9,80	4,15	3,12	4,92	4,21	3,57	1,12	15,37	2,80	0,85

Figura 35: Mapa metabólico do experimento C1.

Pode-se observar que existem diferenças entre o valor teórico e o valor real (encontrado pelas análises dos metabólitos). Neste caso, a produção de CO₂ foi um pouco maior que o teórico. Isso indica que parte do carbono deste CO₂ é oriundo de outras fontes.

A maior diferença encontrada entre o teórico e o real ocorreu na formação de lactato. A quantidade de carbono na glucose adicionada não foi suficiente para a gerar a somatória de carbono na biomassa, lactato, etanol, acetato e gás carbônico, confirmando o carbono advindo de outras fontes.

Além disso, também há uma diferença entre o consumo de glicerol e a formação de PDO. Neste caso, pode ser que tenha havido formação de 3-HPA. No entanto, este composto não foi identificado.

O modelo estequiométrico encontrado está representado nas equações (9) e (10). A fonte de nitrogênio e as fontes de carbono oriundas da peptona e dos extratos de levedura e carne estão indicados como “outros” na equação.

No balanço de carbono realizado para este experimento, observou-se que foram consumidos 8,7 g de carbono advindos da glicose, gerando 12,7 g de carbono em produtos. A soma dos carbonos nas quantidades de produtos formados é maior e, por diferença, pôde-se calcular o montante de carbono advindo de outras fontes. Ou seja, 4,04 g de carbono utilizados vieram da peptona e dos extratos de carne e levedura.

Visto que o carbono oriundo de outras fontes representa 32% do total, os fatores de conversão de glicose a produtos não estão corretos. Sendo assim optou-se em ajustar o cálculo dos fatores de conversão de produtos a glicose em produtos a carbono. Ou seja, os valores calculados representam a quantidade de carbono que foi utilizada para dar origem à biomassa, lactato, acetato, etanol e CO₂.

Com isso, os coeficientes estequiométricos representados pelos fatores de conversão $Y_{X/C}$, $Y_{LAC/C}$, $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e $Y_{CO_2/C}$ são iguais a 0,03 mol_X/mol_C, 0,20 mol_{LAC}/mol_C, 0,07 mol_{ACE}/mol_C, 0,02 mol_{ETH}/mol_C e 0,11 mol_{CO₂}/mol_C, respectivamente.

5.6.2 C2

Para uma verificação da reprodutibilidade dos experimentos contínuos, C2 foi realizado em quadruplicata, denominados de C2(1), C2(2), C2(3) e C2(4). A taxa de diluição utilizada foi de 0,5 h⁻¹ em meio MRS com 15 g/L de glicerol em anaerobiose plena (injeção de 0,75 L/min de N₂). A frequência de agitação foi mantida constante em 150 rpm. Os resultados desta condição estão apresentados na Tabela 18.

Como dito anteriormente, após a esterilização do meio MRS a concentração de glicose no meio de cultura varia, alterando também a razão suprida entre glicose e glicerol no meio. No entanto, a média desta razão no meio foi de 0,59 g_{GLC}/g_{GRL} e a razão consumida de ambos os substratos foi de 0,61 g_{GLC}/g_{GRL}.

Nesta condição, o consumo de glicose foi de 16 g/L produzindo 3,17 g/L de biomassa seca, 11,48 g/L de lactato, 2,96 g/L de acetato, 1,01 g/L de etanol e 3,66 g/L de CO₂. O consumo de 13,92 g/L de glicerol resultou em 9,76 g/L de PDO.

A produtividade de PDO alcançada nesta condição foi 32% maior que com $D=0,25$ h⁻¹, ou seja igual a 4,88 g/L.h e a taxa de produção específica global de PDO foi de 1,55 g_{PDO}/g_X.h.

Tabela 18: Principais resultados de C2 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLR (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO₂/GLC} (g _{CO₂} /g _{GLC})
C2(1)	2,99	16,60	14,65	11,67	2,96	1,19	10,23	3,57	0,18	0,70	0,70	0,18	0,07	0,22
	2,84	16,76	14,82	11,73	2,99	1,21	10,32	3,00	0,17	0,70	0,70	0,18	0,07	0,18
	2,97	16,38	14,68	11,48	2,92	1,14	10,17	3,34	0,18	0,69	0,70	0,18	0,07	0,20
	2,88	16,31	14,35	11,40	2,98	1,13	10,05	3,34	0,18	0,70	0,70	0,18	0,07	0,20
	2,96	16,60	14,14	11,56	3,03	1,21	10,00	3,11	0,18	0,71	0,70	0,18	0,07	0,19
Média EE1	2,93	16,53	14,53	11,57	2,98	1,18	10,15	3,27	0,18	0,70	0,70	0,18	0,07	0,20
CV (%)	2,22	1,11	1,90	1,18	1,35	3,31	1,27	6,80	2,67	0,78	0,35	1,28	2,31	7,33
C2(2)	3,23	15,26	14,66	10,80	3,21	0,71	10,16	3,69	0,21	0,69	0,71	0,21	0,05	0,24
	3,01	15,36	14,48	10,72	3,05	0,75	10,26	3,92	0,20	0,71	0,70	0,20	0,05	0,26
	3,06	15,15	14,11	10,53	3,04	0,73	9,85	3,92	0,20	0,70	0,70	0,20	0,05	0,26
Média EE2	3,10	15,25	14,41	10,68	3,10	0,73	10,09	3,84	0,20	0,70	0,70	0,20	0,05	0,25
CV (%)	3,64	0,68	1,93	1,30	3,18	2,88	2,15	3,46	3,81	1,15	0,95	3,20	2,57	3,54
C2(3)	2,96	15,24	12,70	11,66	2,33	1,27	8,79	3,69	0,19	0,69	0,77	0,15	0,08	0,24
	3,28	15,23	13,19	11,40	2,43	1,24	8,92	3,69	0,22	0,68	0,75	0,16	0,08	0,24
	3,26	15,29	13,49	11,29	2,63	1,10	9,03	3,69	0,21	0,67	0,74	0,17	0,07	0,24
Média EE3	3,17	15,25	13,13	11,45	2,46	1,20	8,91	3,69	0,21	0,68	0,75	0,16	0,08	0,24
CV (%)	5,66	0,20	3,03	1,68	6,16	7,32	1,34	0,00	5,57	1,72	1,82	5,97	7,51	0,20
C2(4)	3,52	17,17	13,02	11,98	3,19	1,33	9,50	3,80	0,21	0,73	0,70	0,19	0,08	0,22
	3,50	17,11	13,71	12,25	3,31	1,25	9,96	3,92	0,20	0,73	0,72	0,19	0,07	0,23
	3,45	17,17	14,05	12,46	3,39	1,25	10,16	3,80	0,20	0,72	0,73	0,20	0,07	0,22
Média EE4	3,49	17,15	13,59	12,23	3,30	1,28	9,87	3,84	0,20	0,73	0,71	0,19	0,07	0,22
CV (%)	1,04	0,20	3,85	1,96	3,05	3,40	3,42	1,80	1,11	0,44	1,98	3,08	3,30	2,01
Média C2	3,17	16,05	13,92	11,48	2,96	1,22	9,76	3,66	0,20	0,70	0,72	0,18	0,07	0,23
CV C2 (%)	7,36	5,10	4,88	4,79	10,41	5,43	5,43	8,14	7,63	2,48	3,13	8,61	6,03	10,64

As velocidades globais específicas de consumo de glicose e glicerol foram respectivamente iguais a 8,02 g/L.h e 6,96 g/L.h. Os fatores de conversão em gramas também estão apresentados na Tabela 18. Da mesma forma que no experimento C1, os maiores fatores de conversão são o $Y_{PDO/GLY}$ igual a 0,70 g_{PDO}/g_{GLR} e o $Y_{LAC/GLC}$ com 0,72 g_{LAC}/g_{GLC}.

Pode-se notar que a formação de etanol no experimento C2(2) foi menor que nas demais repetições, afetando também o seu fator de conversão $Y_{ETH/GLC}$. Como o coeficiente de variação dos demais foi de 5,4% entre eles, pode-se afirmar que os resultados são reprodutíveis e que estes valores podem estar relacionados a um erro operacional. Sendo assim, para o modelo da equação estequiométrica, e para futuras análises estatísticas estes pontos foram considerados discrepantes e retirados da análise.

Através do balanço de carbono também foi possível encontrar um modelo estequiométrico para este experimento, bem como o mapa metabólico (Figura 36). O modelo proposto é mostrado nas equações (11) e (12).

Nesta condição, ao longo do estado estacionário, foram consumidos 6,4 g de carbono e formados 8,9 g/L de metabólitos como lactato, acetato, etanol e gás carbônico, indicando que 2,5 g de carbono foram consumidos de outras fontes.

Os fatores de correção $Y_{X/C}$, $Y_{LAC/C}$, $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e $Y_{CO2/C}$ corrigidos foram iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,17 mol_{LAC}/mol_C, 0,07 mol_{ACE}/mol_C, 0,04 mol_{ETH}/mol_C e 0,11 mol_{CO2}/mol_C, respectivamente.

Figura 36: Mapa metabólico do experimento C2.

5.6.3 C3

O quimiostato C3 foi realizado em anaerobiose plena (injeção de N₂) a 150 rpm em meio MRS acrescidos de 15,8 g/L de glicerol. A taxa de diluição utilizada nesta condição foi de 0,65 h⁻¹. A razão entre glicose e glicerol no meio foi igual a 0,55 mol_{GLC}/mol_{GLR} e a razão consumida foi de 0,68 mol_{GLC}/mol_{GLR}.

Nestas condições de cultivo, houve consumo de 13,83 g/L de glicose, gerando 2,96 g/L de biomassa seca, 12,06 g/L de lactato, 2,39 g/L de acetato, 1,10 g/L de etanol e 3,14 g/L de CO₂. O consumo de 10,49 g/L de glicerol resultou em 7,52 g/L de PDO.

A produtividade alcançada neste estado estacionário foi igual a 4,89 g/L.h e a taxa de produção específica global de PDO foi de 1,65 g_{PDO}/g_X.h.

As velocidades globais específicas de consumo de glicose e glicerol foram respectivamente iguais a 8,99 g/L.h e 6,82 g/L.h. Os principais resultados estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19: Principais resultados de C3 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO2/GLC} (g _{CO2} /g _{GLC})
C3	2,98	13,57	10,54	12,03	2,41	1,09	7,54	3,20	0,22	0,72	0,89	0,18	0,08	0,24
	2,94	13,90	10,51	12,06	2,39	1,10	7,52	3,11	0,21	0,72	0,87	0,17	0,08	0,22
	2,96	14,02	10,43	12,10	2,38	1,11	7,50	3,11	0,21	0,72	0,86	0,17	0,08	0,22
Média EE	2,96	13,83	10,49	12,06	2,39	1,10	7,52	3,14	0,21	0,72	0,87	0,17	0,08	0,23
CV (%)	0,74	1,68	0,54	0,28	0,60	1,29	0,30	1,65	2,29	0,24	1,42	2,29	0,71	3,32

Figura 37: Mapa metabólico do experimento C3.

O mapa metabólico desta condição está apresentado na Figura 37. O modelo estequiométrico para a condição com $D=0,65 \text{ h}^{-1}$ está apresentada abaixo:

Pode-se observar através do balanço de carbono que foram consumidos 5,5 g de carbono oriundos da glicose e foram produzidos 8,6 g, indicando que 36% (3,1 g) de carbono vieram de outras fontes.

Assumindo a proposição de alterar o valor dos fatores de conversão, tem-se que os $Y_{X/C}$, $Y_{LAC/C}$, $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e $Y_{CO_2/C}$ são iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,19 mol_{LAC}/mol_C, 0,06 mol_{ACE}/mol_C, 0,03 mol_{ETH}/mol_C e 0,10 mol_{CO2}/mol_C, respectivamente.

5.6.4 C4

O experimento em quimiostato denominado C4 foi realizado em anaerobiose plena (injeção de N₂) a 150 rpm em meio MRS acrescidos de 15,8 g/L de glicerol. A taxa de diluição utilizada nesta condição foi de $0,75 \text{ h}^{-1}$. A razão entre glicose e glicerol no meio foi igual a 0,55 mol_{GLC}/mol_{GLR} e a razão consumida foi de 0,73 mol_{GLC}/mol_{GLR}.

A produtividade alcançada neste estado estacionário foi igual a 5,17 g/L.h e a taxa de produção específica global de PDO foi de 1,92 g_{PDO}/g_X.h.

As velocidades globais específicas de consumo de glicose e glicerol foram respectivamente iguais a 10,07 g/L.h e 7,13 g/L.h. Os principais resultados estão descritos na Tabela 20.

Nestas condições de cultivo, houve consumo de 13,43 g/L de glicose, gerando 2,70 g/L de biomassa seca, 11,44 g/L de lactato, 2,21 g/L de acetato, 1,09 g/L de etanol e 2,69 g/L de CO₂. O consumo de 9,50 g/L de glicerol resultou em 6,90 g/L de PDO.

As equações que representam a estequiometria das reações nesta condição são as seguintes:

Através do balanço de carbono, pode-se verificar que foram consumidos 5,3 g de carbono oriundos da glicose e 2,7 g (34%) de fontes desconhecidas gerando 8,1 g de carbono em produtos como biomassa, lactato, etanol, acetato e CO₂.

Os coeficientes estequiométricos $Y_{X/C}$, $Y_{LAC/C}$, $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e $Y_{CO_2/C}$ corrigidos foram iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,19 mol_{LAC}/mol_C, 0,06 mol_{ACE}/mol_C, 0,04 mol_{ETH}/mol_C e 0,09 mol_{CO₂}/mol_C, respectivamente.

O mapa metabólico da condição C4 está apresentado na Figura 38. Neste caso, pode-se observar que o valor teórico para a formação de CO₂ foi o mesmo encontrado experimentalmente.

Tabela 20: Principais resultados de C4 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO₂/GLC} (g _{CO₂} /g _{GLC})
C4	2,67	13,12	9,57	11,29	2,18	1,06	6,85	2,61	0,20	0,72	0,86	0,17	0,08	0,20
	2,69	13,12	9,49	11,25	2,16	1,07	6,79	2,69	0,20	0,72	0,86	0,16	0,08	0,21
	2,73	14,04	9,45	11,77	2,30	1,14	7,06	2,77	0,19	0,75	0,84	0,16	0,08	0,20
Média EE	2,70	13,43	9,50	11,44	2,21	1,09	6,90	2,69	0,20	0,73	0,85	0,16	0,08	0,20
CV (%)	1,15	3,94	0,65	2,51	3,45	4,08	2,05	2,97	2,78	2,46	1,42	0,77	0,67	2,03

Figura 38: Mapa metabólico do experimento C4.

5.6.5 C5

O experimento em quimiostato, denominado C5, foi realizado sob as mesmas condições de cultivo que os demais, ou seja, em meio MRS com 15 g/L de glicerol a 150 rpm e 37°C. No entanto, a taxa de diluição utilizada foi igual a 0,90 h⁻¹.

Este valor imposto para a taxa de diluição é bem próximo do $\mu_{X,Máx}$ encontrado para o microrganismo sob as mesmas condições no cultivo em batelada (igual a 0,99 h⁻¹). Apesar disso, atingiu-se o estado estacionário e os principais resultados, bem como o consumo de glicose e glicerol e a produção dos metabólitos estão apresentados na Tabela 21.

Nestas condições, o consumo de glicerol foi igual a 10,73 g/L, resultando em uma concentração de PDO igual a 5,33 g/L, representando um $Y_{PDO/GLR}$ igual a 0,74 g_{PDO}/g_{GLR}. A produtividade no estado estacionário foi igual a 4,80 g/L.h e a taxa de produção específica global de PDO foi de 2,07 g_{PDO}/g_X.h.

As velocidades globais específicas de consumo de glicose e glicerol foram respectivamente iguais a 9,65 g/L.h e 6,52 g/L.h. O mapa metabólico em quantidades molares no estado estacionário está apresentado na Figura 39.

As equações estequiométricas encontradas representando o consumo de glicose e de glicerol para esta condição, estão descritas a seguir:

A razão molar entre glicose e glicerol no meio foi igual a 0,60 mol_{GLC}/mol_{GLR}, no entanto foram consumidos 0,77 mol_{GLC}/mol_{GLR}. Através do balanço de carbono, pode-se verificar que foram consumidos 4,3 g de carbono advindos da glicose e 2,3 g (35%) de fontes desconhecidas gerando 6,6 g de carbono em produtos como biomassa, lactato, etanol, acetato e CO₂.

Tabela 21: Principais resultados de C5 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO₂/GLC} (g _{CO₂} /g _{GLC})
C5	2,29	10,69	7,40	9,17	1,78	0,88	5,45	2,24	0,21	0,74	0,86	0,17	0,08	0,21
	2,35	10,71	7,24	9,15	1,73	0,92	5,32	2,31	0,22	0,73	0,85	0,16	0,09	0,22
	2,32	10,77	7,11	9,22	1,70	0,96	5,23	2,37	0,21	0,74	0,86	0,16	0,09	0,22
Média EE	2,32	10,73	7,25	9,18	1,74	0,92	5,33	2,31	0,21	0,74	0,86	0,16	0,09	0,22
CV (%)	1,25	0,40	2,05	0,39	2,17	4,67	2,14	2,82	1,23	0,14	0,21	2,54	4,29	2,45

Figura 39: Mapa metabólico experimento C5.

Baseando-se no balanço de carbono, os fatores de conversão corrigidos $Y_{X/C}$, $Y_{LAC/C}$, $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e $Y_{CO2/C}$ foram iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,19 mol_{LAC}/mol_C, 0,05 mol_{ACE}/mol_C, 0,04 mol_{ETH}/mol_C e 0,10 mol_{CO2}/mol_C, respectivamente.

5.6.6 C6

Este quimiostato foi realizado a 37°C, 150 rpm em anaerobiose em MRS com adição de glicerol bruto a uma taxa de diluição igual a 0,5 h⁻¹. Os resultados mostram que a adição do glicerol bruto não causou nenhum efeito negativo sobre as células.

A razão entre glicose e glicerol adicionada ao meio foi de 0,53 mol_{GLC}/mol_{GLR} e a razão consumida foi 0,63 mol_{GLC}/mol_{GLR}. Foram consumidos 16,18 g/L de glicose e formados 13,79 g/L de lactato, 2,73 g/L de acetato, 0,97 g/L de etanol e 3,58 g/L de CO₂, como mostrado na Tabela 22.

A produtividade de PDO alcançada nesta condição foi de 4,70 g/L.h e a taxa de produção específica global de PDO foi de 1,49 g_{PDO}/g_X.h. O consumo de glicerol foi igual a 13,47 g/L, gerando 9,39 g/L de PDO, representando um $Y_{PDO/GLR}$ de 0,70 g_{PDO}/g_{GLR}. O mapa metabólico no estado estacionário está apresentado na Figura 40.

Tabela 22: Principais resultados de C6 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO₂/GLC} (g _{CO₂} /g _{GLC})
C6	3,26	16,24	13,60	13,90	2,78	0,96	9,51	3,58	0,20	0,70	0,86	0,17	0,06	0,22
	3,13	16,19	13,49	13,76	2,75	0,96	9,43	3,58	0,19	0,70	0,85	0,17	0,06	0,22
	3,10	16,13	13,35	13,69	2,69	0,98	9,29	3,58	0,19	0,70	0,85	0,17	0,06	0,22
		16,16	13,45	13,81	2,70	0,99	9,32	3,58		0,69	0,85	0,17	0,06	0,22
Média EE	3,16	16,18	13,47	13,79	2,73	0,97	9,39	3,58	0,20	0,70	0,85	0,17	0,06	0,22
CV (%)	2,56	0,31	0,76	0,64	1,47	1,56	1,09	0,00	2,24	0,45	0,39	1,17	1,77	0,31

Figura 40: Mapa metabólico do experimento C6.

As velocidades de consumo de glicose e de glicerol alcançadas foram iguais a 8,09 g_{GLC}/L.h e 6,73 g_{GLR}/L.h, respectivamente.

O modelo estequiométrico encontrado para estas condições está descrito nas seguintes equações:

Através do balanço de carbono, pode-se observar que 6,5 g de carbono foram utilizados da glicose e foram gerados 9,6 g de carbono, totalizando 3,1 g de carbono advindo de outras fontes. Sendo assim, com a correção nos fatores de conversão tem-se: $Y_{X/C}$, $Y_{LAC/C}$, $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e $Y_{CO_2/C}$ iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,19 mol_{LAC}/mol_C, 0,06 mol_{ACE}/mol_C, 0,03 mol_{ETH}/mol_C e 0,10 mol_{CO2}/mol_C, respectivamente.

5.6.7 C7

O experimento contínuo denominado C7 foi realizado a 37°C em meio MRS com adição de 25,3 g/L de glicerol e com injeção de oxigênio.

As bactérias ácido lácticas consomem oxigênio através da ação das flavoproteínas oxidases, incluindo NADH oxidase, piruvato oxidase, α -glicerofosfato oxidase, ácido L-amino oxidase e lactato oxidase (KANDLER et al., 1983). As enzimas NADH oxidases reduzem o oxigênio a H₂O₂ ou H₂O e regeneram NAD⁺ requerido na glicólise. Sob condições aeróbias, o piruvato pode ser catabolizado em acetil-P pela enzima piruvato oxidase ou pela piruvato formiato liase e este, por sua vez produz acetato juntamente com a formação de ATP (LOPEZ DE FELIPE; GAUDU, 2009). O acúmulo de acetato, ao invés de lactato, pode ser interessante para o processo, por isso resolveu-se avaliar a influência sobre os *Lactobacillus reuteri*.

A ideia inicial era avaliar o efeito do oxigênio em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (OD) no meio à partir 5%. No entanto, a transferência de oxigênio na configuração que o reator apresentava foi baixa. A adição de oxigênio puro e o aumento da frequência de agitação não foram suficientes para controlar o OD em valores superiores a 5%.

A Figura 41 apresenta a porcentagem de oxigênio dissolvido no meio (%OD), a frequência de agitação e a porcentagem de CO₂ ao longo deste experimento. Pode-se observar que mesmo a 350 rpm a concentração de oxigênio dissolvido no meio diminuiu ao longo do tempo, terminando o experimento em 0%. As barras pontilhadas na Figura 41 indicam a mudança da condição do experimento.

Figura 41: Frequência de agitação e porcentagens de OD e de CO₂ ao longo do experimento C7.

Apesar da variabilidade do OD, foi alcançado o estado estacionário nesta condição. A razão molar entre glicose e glicerol no meio foi igual a 0,34 mol_{GLC}/mol_{GLR}, no entanto foram ambos consumidos em um razão igual a 1,08 mol_{GLC}/mol_{GLR}.

Foram alcançados um Q_{PDO} igual a 2,03 g/L.h e um q_{PDO} igual a 0,61 g_{PDO}/g_X.h. A produção de PDO foi igual a 4,07 g/L e o consumo de glicerol igual a 7,98 g/L.

Para este experimento, como foi variada a porcentagem gasosa de entrada no reator e isso não foi mensurado, não foi possível quantificar a vazão de saída do reator. Consequentemente, não pode-se encontrar a concentração de CO₂ na saída, o que dificulta o fechamento do balanço de carbono. Pode-se observar, que nos onze experimentos realizados, apenas três deles apresentaram uma diferença entre o valor de produção de CO₂ teórico e o real superior a 15%. Sendo assim, para efeito de comparação, somente para este caso considerou-se a produção de CO₂ igual ao teórico, ou seja, igual a 4,55 g/L.

O consumo de glicose foi de 16,51 g/L resultando em uma produção de biomassa, lactato, acetato, etanol e CO₂ iguais a 3,34 g/L, 13,37 g/L, 5,28 g/L, 0,71 g/L e 4,55 g/L, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 23.

As velocidades de consumo Q_{GLC} e Q_{GLR} foram iguais a 8,26 g_{GLC}/L.h e 3,99 g_{GLR}/L.h.

O mapa metabólico deste estado estacionário está apresentado na Figura 42 e os modelos estequiométricos encontrados para descrever o consumo de glicose e glicerol nesta condição estão representados pelas equações a seguir.

Pode-se verificar, através do balanço de carbono, que foram consumidos 6,6 g de carbono oriundos da glicose e 4,0 g de fontes desconhecidas (35%) gerando 10,6 g de carbono em produtos como biomassa, lactato, etanol, acetato e CO₂.

Os fatores de conversão corrigido pelo balanço, $Y_{X/C}$, $Y_{LAC/C}$, $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e $Y_{CO_2/C}$ foram iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,17 mol_{LAC}/mol_C, 0,10 mol_{ACE}/mol_C, 0,02 mol_{ETH}/mol_C e 0,12 mol_{CO2}/mol_{GLC}, respectivamente.

Tabela 23: Principais resultados de C7 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO₂/GLC} (g _{CO₂} /g _{GLC})
C5	3,27	16,52	7,60	13,29	5,21	0,76	3,73		0,20	0,49	0,80	0,32	0,05	0,00
	3,33	16,56	8,19	13,38	5,32	0,67	4,21		0,20	0,51	0,81	0,32	0,04	0,00
	3,42	16,50	8,16	13,39	5,31	0,70	4,20		0,21	0,51	0,81	0,32	0,04	0,00
Média EE	3,36	16,53	7,97	13,42	5,30	0,73	4,13	4,55	0,20	0,52	0,81	0,32	0,04	0,00
CV (%)	3,34	16,51	7,98	13,37	5,28	0,71	4,07	-	0,20	0,51	0,81	0,32	0,04	0,00

Figura 42: Mapa metabólico do experimento C7.

5.6.8 C8

O experimento em quimiostato denominado C8 foi realizado em anaerobiose plena (injeção de N₂) a 150 rpm em meio MRS acrescidos de 25,6 g/L de glicerol. A taxa de diluição utilizada nesta condição foi de 0,5 h⁻¹. A razão entre glicose e glicerol no meio foi igual a 0,32 mol_{GLC}/mol_{GRL} e a razão consumida foi de 0,52 mol_{GLC}/mol_{GRL}.

A produtividade alcançada neste estado estacionário foi igual a 4,77 g/L.h e a taxa de produção específica global de PDO foi de 1,54 g_{PDO}/g_X.h. As velocidades globais de consumo de glicose e glicerol foram respectivamente iguais a 7,74 g/L.h e 7,85 g/L.h. Os principais resultados estão descritos na Tabela 24.

Nestas condições de cultivo, houve consumo de 15,48 g/L de glicose, gerando 3,11 g/L de biomassa seca, 13,15 g/L de lactato, 3,46 g/L de acetato, 0,74 g/L de etanol e 3,59 g/L de CO₂. Foram formados 9,54 g/L de PDO a partir de 15,71 g/L de glicerol consumidos.

As equações que representam a estequiometria das reações nesta condição são as seguintes:

Através do balanço de carbono, pode-se verificar que foram consumidos 6,2 g de carbono advindos da glicose e 3,3 g de fontes desconhecidas (35%) gerando 9,5 g de carbono em produtos como biomassa, lactato, etanol, acetato e CO₂. Sendo assim, Y_{X/C}, Y_{LAC/C}, Y_{ACE/C}, Y_{ETH/C} e Y_{CO2/C} foram iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,18 mol_{LAC}/mol_C, 0,07 mol_{ACE}/mol_C, 0,02 mol_{ETH}/mol_C e 0,10 mol_{CO2}/mol_C, respectivamente. O mapa metabólico para este experimento está apresentado na Figura 43.

Tabela 24: Principais resultados de C8 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO₂/GLC} (g _{CO₂} /g _{GLC})
C8	3,15	15,44	15,63	13,16	3,43	0,77	9,50	3,59	0,20	0,61	0,85	0,22	0,05	0,23
	3,04	15,45	15,71	13,13	3,44	0,76	9,52	3,59	0,20	0,61	0,85	0,22	0,05	0,23
	3,13	15,55	15,77	13,16	3,51	0,71	9,61	3,59	0,20	0,61	0,85	0,23	0,05	0,23
Média EE	3,11	15,48	15,71	13,15	3,46	0,74	9,54	3,59	0,20	0,61	0,85	0,22	0,05	0,23
CV (%)	1,96	0,40	0,43	0,15	1,17	4,11	0,63	0,00	1,90	0,32	0,33	0,77	4,49	0,39

Figura 43: Mapa metabólico do experimento C8.

5.6.9 C9

O experimento C9 foi realizado da mesma forma que C2, ou seja, foi mantida a razão entre glicose e glicerol. No entanto, foram adicionados ambos os substratos ao meio de cultura. A concentração final de glicose foi igual a 26,3 g/L e de glicerol igual a 22,7 g/L com um “r” de 0,59 mol_{GLC}/mol_{GLR} e um “r” consumido de 0,84 mol_{GLC}/mol_{GLR}.

Q_{GLC} e Q_{GLR} foram iguais a 9,25 g_{GLC}/L.h e 5,65 g_{GLR}/L.h, respectivamente. Nestas condições de cultivo, houve consumo de 18,51 g/L de glicose, gerando 2,96 g/L de biomassa seca, 10,08 g/L de lactato, 1,96 g/L de acetato, 1,66 g/L de etanol e 3,72 g/L de CO₂ (Tabela 25). Foram alcançados um Q_{PDO} igual a 3,83 g/L.h e um q_{PDO} igual a 1,29 g_{PDO}/g_X.h. A produção de PDO foi igual a 7,65 g/L e o consumo de glicerol igual a 11,30 g/L.

O mapa metabólico para esta condição está apresentado na Figura 44 e as equações estequiométricas que representam estes resultados são as seguintes:

Através do balanço de carbono, pode-se verificar que foram consumidos 7,4 g de carbono advindos da glicose e 0,96 g de fontes desconhecidas (11%) gerando 8,4 g de carbono em produtos como biomassa, lactato, etanol, acetato e CO₂. Sendo assim, os fatores de conversão corrigidos pelo balanço Y_{X/C}, Y_{LAC/C}, Y_{ACE/C}, Y_{ETH/C} e Y_{CO2/C} foram iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,17 mol_{LAC}/mol_C, 0,05 mol_{ACE}/mol_C, 0,05 mol_{ETH}/mol_C e 0,12 mol_{CO2}/mol_C, respectivamente.

Tabela 25: Principais resultados de C9 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO₂/GLC} (g _{CO₂} /g _{GLC})
C9	2,89	18,25	11,08	10,46	1,87	1,55	7,32	3,69	0,16	0,66	0,57	0,10	0,08	0,20
	3,00	18,46	11,35	10,73	1,84	1,71	7,66	3,80	0,16	0,67	0,58	0,10	0,09	0,21
	2,97	18,81	11,47	11,21	2,16	1,74	7,99	3,69	0,16	0,70	0,60	0,11	0,09	0,20
Média EE	2,96	18,51	11,30	10,80	1,96	1,66	7,65	3,72	0,16	0,68	0,58	0,11	0,09	0,20
CV (%)	2,02	1,52	1,79	3,53	9,13	6,13	4,42	1,79	1,64	2,70	2,00	7,71	4,93	2,51

Figura 44: Mapa metabólico experimento C9.

5.6.10 C10

Esta condição foi realizada da mesma forma que C9, no entanto as concentrações de glicose e glicerol no meio foram maiores. A concentração final no meio MRS foi igual a 36 g/L e 28,7 g/L de glicose e glicerol, respectivamente.

A razão molar entre glicose e glicerol no meio suprida foi igual a 0,64 mol_{GLC}/mol_{GLR} e a consumida igual a 0,81 mol_{GLC}/mol_{GLR}. A média do consumo de glicose no estado estacionário foi igual a 19,7 g/L, resultando em g/L: 11,98 de lactato, 2,78 de acetato, 1,74 de etanol e 3,69 de CO₂. Q_{GLC} foi igual a 9,85 g_{GLC}/L.h e Q_{GLR} igual a 6,33 g_{GLR}/L.h.

O consumo de glicerol foi de 12,66 g/L e a concentração de PDO alcançada foi de 8,21 g/L (Tabela 26). A produtividade de PDO neste estado estacionário foi igual a 4,11 g/L.h e a taxa de produção específica global de PDO foi de 1,30 g_{PDO}/g_X.h.

O mapa metabólico deste experimento está apresentado na Figura 45 e as equações estequiométricas são representadas por:

Através do balanço de carbono, pode-se observar que 7,9 g de carbono foram utilizados da glicose e foram gerados 9,8 g de carbono, totalizando 1,9 g (20%) de carbono advindo de outras fontes. Sendo assim, com a correção nos fatores de conversão tem-se: Y_{X/C}, Y_{LAC/C}, Y_{ACE/C}, Y_{ETH/C} e Y_{CO2/C} iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,16 mol_{LAC}/mol_C, 0,06 mol_{ACE}/mol_C, 0,05 mol_{ETH}/mol_C e 0,10 mol_{CO2}/mol_C, respectivamente.

Tabela 26: Principais resultados de C10 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO₂/GLC} (g _{CO₂} /g _{GLC})
C10	3,09	20,01	12,95	11,96	2,81	1,72	8,28	3,69	0,15	0,64	0,60	0,14	0,09	0,18
	3,17	19,70	12,69	12,03	2,82	1,76	8,27	3,69	0,16	0,65	0,61	0,14	0,09	0,19
	3,19	19,38	12,33	11,94	2,72	1,75	8,08	3,69	0,16	0,66	0,62	0,14	0,09	0,19
Média EE	3,15	19,70	12,66	11,98	2,78	1,74	8,21	3,69	0,16	0,65	0,61	0,14	0,09	0,19
CV (%)	1,70	1,60	2,47	0,36	1,95	1,18	1,41	0,00	3,25	1,27	1,55	1,13	2,64	1,60

Figura 45: Mapa metabólico experimento C10.

5.6.11 C11

Nos experimentos C9 e C10 pode-se observar que a glicose não é o substrato limitante deste processo, uma vez que o aumento da concentração deste substrato no meio de alimentação não gerou um aumento na concentração celular. Sendo assim, outro substrato pode estar limitando estes processo. Pode ser que o limitante deste processo seja a fonte de nitrogênio ou de algum aminoácido essencial para o crescimento de *L. reuteri*.

Como o meio utilizado é um meio complexo, é difícil descobrir quem é o substrato limitante. Sendo assim, primeiramente optou-se em aumentar as concentrações de peptona (15 g/L) e dos extratos de carne (15 g/L) e levedura (10 g/L) no meio MRS na alimentação. A concentração de glicose para esta condição foi igual a 22,2 g/L e de glicerol igual a 21,3 g/L. Sendo assim, obteve-se um “r” suprido igual a 0,56 mol_{GLC}/mol_{GLR}.

A concentração de biomassa alcançada no estado estacionário foi igual a 3,08 g/L. O consumo de glicose foi de 18,44 g/L e produziu 11,44 g/L de lactato, 2,35 g/L de acetato, 1,58 g/L de etanol e 3,69 g/L de CO₂ (Tabela 27). Q_{GLC} e Q_{GLR} foram iguais a 9,42 g_{GLC}/L.h e 6,22 g_{GLR}/L.h, respectivamente. O “r” consumido nesta condição foi igual a 0,79 mol_{GLC}/mol_{GLR}.

O consumo de glicerol foi de 12,43 g/L e a produção de PDO foi igual a 7,89 g/L. Sendo assim, Q_{PDO} foi igual a 3,95 g/L.h e q_{PDO} igual a 1,28 g_{PDO}/g_x.h.

O mapa metabólico está apresentado na Figura 46 e as equações estequiométricas que representam este estado estacionário são as seguintes:

Tabela 27: Principais resultados de C11 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO₂/GLC} (g _{CO₂} /g _{GLC})
C11	2,96	18,58	12,44	11,27	2,33	1,49	7,83	3,69	0,16	0,63	0,61	0,13	0,08	0,20
	3,09	18,77	12,46	11,42	2,39	1,58	7,97	3,69	0,16	0,64	0,61	0,13	0,08	0,20
	3,19	19,17	12,40	11,63	2,35	1,68	7,88	3,69	0,17	0,64	0,61	0,12	0,09	0,19
Média EE	3,08	18,84	12,43	11,44	2,35	1,58	7,89	3,69	0,16	0,64	0,61	0,12	0,08	0,20
CV (%)	3,74	1,60	0,22	1,60	1,23	6,05	0,89	0,00	2,26	0,81	0,19	1,92	4,46	1,59

Figura 46: Mapa metabólico experimento C11.

Através do balanço de carbono, pode-se verificar que foram consumidos 7,5 g de carbono oriundos da glicose e 1,3 g (15%) de fontes desconhecidas gerando 8,8 g de carbono em produtos como biomassa, lactato, etanol, acetato e CO₂. Sendo assim, os coeficientes estequiométricos $Y_{X/C}$, $Y_{LAC/C}$, $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e $Y_{CO2/C}$ foram iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,17 mol_{LAC}/mol_C, 0,05 mol_{ACE}/mol_C, 0,05 mol_{ETH}/mol_C e 0,11 mol_{CO2}/mol_C, respectivamente.

5.6.12 C12

Os resultados do experimento C11 mostraram que a adição de peptona e extratos de levedura e de carne no meio MRS na alimentação não afetou a produção de biomassa, tampouco alterou as concentrações de PDO. Com isso, parece que este processo não está limitado por nenhuma fonte de carbono ou nitrogênio. Pode ser que não haja uma maior produção de biomassa devido a alguma inibição causado por algum dos produtos. Porém, para garantir que esta limitação não existe, foi realizado um experimento onde o meio MRS foi concentrado, ou seja, todos os seus componentes presentes no meio foram aumentados 25% em massa. A concentração de glicose e de glicerol no meio foi de 23,5 g/L e 18,8 g/L, respectivamente.

O ensaio foi realizado com uma taxa de diluição de 0,5 h⁻¹, 37°C, 150 rpm e em anaerobiose. A razão molar entre glicose e glicerol no meio de alimentação foi igual a 0,64 mol_{GLC}/mol_{GLR} e o “r” consumido foi igual a 0,85 mol_{GLC}/mol_{GLR}.

Neste estado estacionário, foram consumidos 19,31 g/L de glicose e formados 3,34 g/L de biomassa, 13,15 g/L de lactato, 2,85 g/L de acetato, 2,04 g/L de etanol e 3,80 g/L de CO₂, como mostrado na Tabela 28.

A produtividade de PDO alcançada nesta condição foi de 4,38 g/L.h e a taxa de produção específica global de PDO foi de 1,31 g_{PDO}/g_X.h. O consumo de glicerol foi igual a 11,87 g/L, gerando 8,76 g/L de PDO, representando um $Y_{PDO/GLR}$ de 0,74 g_{PDO}/g_{GLR}. O mapa metabólico no estado estacionário está apresentado na Figura 47.

Tabela 28: Principais resultados de C12 - Consumo de substratos, formação de produtos e fatores de conversão nos estados estacionários.

Estado estacionário	X (g/L)	GLC (g/L)	GLY (g/L)	LAC (g/L)	ACE (g/L)	ETH (g/L)	PDO (g/L)	CO ₂ (g/L)	Y _{X/GLC} (g _X /g _{GLC})	Y _{PDO/GLR} (g _{PDO} /g _{GLR})	Y _{LAC/GLC} (g _{LAC} /g _{GLC})	Y _{ACE/GLC} (g _{ACE} /g _{GLC})	Y _{ETH/GLC} (g _{ETH} /g _{GLC})	Y _{CO₂/GLC} (g _{CO₂} /g _{GLC})
C12	3,50	19,28	11,90	13,09	2,79	1,96	8,72	3,80	0,18	0,73	0,68	0,14	0,10	0,20
	3,28	19,30	11,89	13,08	2,81	1,95	8,75	3,80	0,17	0,74	0,68	0,15	0,10	0,20
	3,23	19,36	11,82	13,26	2,95	2,21	8,82	3,80	0,17	0,75	0,68	0,15	0,11	0,20
Média EE	3,34	19,31	11,87	13,15	2,85	2,04	8,76	3,80	0,17	0,74	0,68	0,15	0,11	0,20
CV (%)	4,24	0,22	0,36	0,76	3,06	7,22	0,59	0,00	4,42	0,95	0,56	2,84	7,01	0,22

Figura 47: Mapa metabólico experimento C12.

As equações estequiométricas encontradas estão representadas a seguir:

Através do balanço de carbono, pode-se verificar que foram consumidos 7,7 g de carbono advindos da glicose e 2,3 g (23%) de fontes desconhecidas gerando 10,0 g de carbono em produtos como biomassa, lactato, etanol, acetato e CO₂. Sendo assim, os coeficientes estequiométricos $Y_{X/C}$, $Y_{LAC/C}$, $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e $Y_{CO_2/C}$ foram iguais a 0,04 mol_X/mol_C, 0,18 mol_{LAC}/mol_C, 0,06 mol_{ACE}/mol_C, 0,05 mol_{ETH}/mol_C e 0,10 mol_{CO2}/mol_C, respectivamente.

5.7 REAÇÕES ESTEQUIOMÁETRICAS ENCONTRADAS NOS QUIMIOSTATOS

Para facilitar a compreensão, a Tabela 29 apresenta as doze equações estequiométricas encontradas em diferentes quimiostatos que serão discutidas nos grupos de comparação entre as condições. Os valores de glicerol, PDO e outros glicerol (supostamente o 3-HPA) estão apresentados por mol de glicose.

Tabela 29: Equações estequiométricas encontradas para os doze quimiostatos.

CONTÍNUOS	Condição	r meio (mol _{GLC} /mol _{GLR})	r utilizado (mol _{GLC} /mol _{GLR})	REAGENTES (mols _{reagentes} /mol _{GLC})			PRODUTOS (mols _{produtos} /mol _{GLC})						
				GLC	OUTRAS	GLR	BIOM	LAC	ACE	ETH	CO ₂	PDO	OUTROS GLR
C1	D=0.25 h ⁻¹	0,45	0,51	1		1,97	0,28	1,74	0,71	0,18	0,97	1,72	0,26
		0,51	0,56	1		1,79	0,26	1,71	0,53	0,18	0,95	1,47	0,32
C1 médio		0,48	0,53			1,88	0,27	1,72	0,62	0,18	0,96	1,58	0,30
C2	D=0.50 h ⁻¹	0,61	0,60	1		1,68	0,32	1,40	0,54	0,28	0,81	1,43	0,25
		0,60	0,56	1		1,77	0,33	1,40	0,61	0,19	1,03	1,50	0,27
		0,53	0,61	1		1,65	0,37	1,50	0,48	0,31	0,99	1,35	0,30
		0,63	0,66	1		1,51	0,36	1,44	0,58	0,29	0,92	1,33	0,18
C2 médio		0,59	0,61			1,65	0,35	1,44	0,55	0,27	0,94	1,40	0,25
C6	GLR Bruto	0,56	0,63	1		1,59	0,35	1,70	0,51	0,23	0,91	1,34	0,25
C7	OD 5%	0,34	1,08	1		0,92	0,36	1,62	0,96	0,17	-	0,57	0,35
C8	+GLR	0,32	0,52	1		1,94	0,36	1,70	0,67	0,19	0,95	1,44	0,50
C9	+GLC+GLR	0,59	0,84	1		1,19	0,28	1,17	0,32	0,35	0,82	0,98	0,22
C10	++GLC++GLR	0,64	0,81	1		1,23	0,28	1,22	0,42	0,35	0,77	0,97	0,26
C11	+EXTRATOS	0,56	0,79	1		1,26	0,29	1,22	0,38	0,33	0,80	0,97	0,29
C12	MRS 125%	0,64	0,85	1		1,18	0,31	1,36	0,44	0,41	0,81	1,05	0,13

A Tabela 30, por sua vez, apresenta os fatores de conversão ou a estequiometria das reações corrigidas pelo balanço de carbono, ou seja, em mols de produtos por mols de carbono consumidos. Pode-se observar que, dentre as condições testadas, o $Y_{X/C}$ só foi diferente na condição C1.

Tabela 30: Fatores de conversão corrigidos pelo balanço de carbono dos experimentos em quimiostatos.

Condições	$Y_{X/C}$ (mol _X /mol _C)	$Y_{LAC/C}$ (mol _{LAC} /mol _C)	$Y_{ACE/C}$ mol _{ACE} /mol _C)	$Y_{ETH/C}$ (mol _{ETH} /mol _C)	$Y_{CO2/C}$ (mol _{CO2} /mol _C)
C1	0.03	0.20	0.07	0.02	0.11
C2	0.04	0.17	0.07	0.04	0.11
C3	0.04	0.19	0.06	0.03	0.10
C4	0.04	0.19	0.06	0.04	0.09
C5	0.04	0.19	0.05	0.04	0.10
C6	0.04	0.19	0.06	0.03	0.10
C7	0.04	0.17	0.10	0.02	0.12
C8	0.04	0.18	0.07	0.02	0.10
C9	0.04	0.17	0.05	0.05	0.12
C10	0.04	0.16	0.06	0.05	0.10
C11	0.04	0.17	0.05	0.05	0.11
C12	0.04	0.18	0.06	0.05	0.10

5.8 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE DILUIÇÃO

Como descrito anteriormente, foram realizados experimentos contínuos em cinco diferentes taxas de diluição, sendo 0,25 (C1); 0,50 (C2); 0,65 (C3); 0,75 (C4) e 0,90 h⁻¹ (C5). A Figura 48 apresenta o consumo de glicose e de glicerol, a produção de biomassa, lactato e PDO e Q_{PDO} nos diferentes D.

Pode-se observar que o aumento de D causou uma diminuição no consumo de glicose, na produção de biomassa, de lactato, acetato e CO₂, conforme o modelo proposto por MONOD (1942). Até o D igual a 0,5 h⁻¹ as concentrações de glicose e glicerol residuais no meio foram baixas, como mostrado através dos mapas metabólicos de cada condição. Com o aumento de D, houve sobra de ambos os substratos, o que não é interessante para o processo.

Da mesma forma que a glicose, o aumento de D gerou uma diminuição no consumo de glicerol e na produção de PDO. No entanto, a produtividade permaneceu com valores próximos nas maiores taxas de diluição, aproximadamente 5 g/L.h. A Figura 49 apresenta a influência de D sobre " r ", Q_{PDO} , Q_{GLC} e Q_{GLR} .

Figura 48: Perfis dos consumos de glicose e glicerol, produção de biomassa, lactato, acetato, etanol, CO_2 e PDO nas diferentes taxas de diluição.

Pode-se observar que há uma tendência de aumento de " r " consumido com o aumento de D , o que não é interessante para o processo, uma vez que o ideal, em termos de custo de matéria prima, seria diminuir a concentração de glicose no meio e aumentar a de glicerol. As velocidades de consumo de glicose e de glicerol foram menores para D igual a $0.25 h^{-1}$ e, assim como a produtividade, permaneceu em valores próximos com o aumento de D .

Figura 49: Razão entre glicose e glicerol consumidos, produtividade de PDO e velocidades de consumo de glicose e glicerol nas diferentes taxas de diluição.

Os fatores $Y_{PDO/GLR}$ se mantiveram acima de 0,70 g_{PDO}/g_{GLR} (0,84 mol_{PDO}/mol_{GLR}) em todos os D testados (Figura 50). Este fato também foi observado por PAPANIKOLAOU et al. (2000) em experimentos realizados em quimiostato com *C. butyricum*. Segundo os autores, isso demonstra que as enzimas constituintes do *regulon* dha funcionam tanto em baixas como em altas taxas de diluições.

Para o lactato, pode-se observar que o menor $Y_{LAC/GLC}$ ocorreu na taxa de diluição igual a 0,5 h^{-1} (Figura 50). Para este valor de D também se observou uma menor produção de lactato. Este fato pode ser explicado através do balanço de carbono, pois nestas condições foi utilizada uma porcentagem menor de carbono (28%) oriundos de fontes desconhecidas. Em análise da variação do $Y_{LAC/C}$, observou-se o mesmo perfil, conforme apresentado na Figura 51.

Em relação ao etanol e ao acetato, pode-se notar que estes produtos são inversamente proporcionais. Os menores valores de $Y_{ACE/GLC}$ ocorram em D igual a 0,75 e 0,90 h^{-1} , onde obteve-se maiores $Y_{ETH/GLC}$.

Figura 50: Fatores de conversão de substratos a produtos dos estados estacionários nas diferentes taxas de diluição.

A mesma observação foi feita com os fatores de conversão. Com isso, optou-se em analisar novamente os fatores de conversão corrigidos pelo consumo de carbono corrigido pelo balanço (Figura 51). Nesta análise pode-se observar que não houve mudanças nas curvas de tendências para o $Y_{X/C}$, $Y_{LAC/C}$ e $Y_{CO2/C}$ em relação aos fatores de conversão dos produtos a glicose. No entanto, não foi observado uma aumento de $Y_{ETH/C}$ com o aumento da taxa de diluição, da mesma que o $Y_{ETH/GLC}$. Os valores de $Y_{ETH/C}$ foram iguais nas taxas de diluição 0,5, 0,75 e 0,90 h⁻¹.

Não é possível aprofundar nos resultados, uma vez que a tentativa de fechar um balanço de carbono e analisar o fluxo das vias metabólicas em meio complexo pode gerar muitos erros. No entanto, para uma análise comparativa pode ser útil. Esses

resultados mostram a importância de considerar as fontes de carbono advindas da peptona e dos extratos de carne de levedura para melhor entendimento do metabolismo.

Figura 51: Fatores de conversão de substratos a carbono corrigidos pelo balanço nos estados estacionários nas diferentes taxas de diluição.

A mudança nos valores dos fatores de conversão pode indicar uma mudança no metabolismo sob a influência da taxa de diluição. Em cultivos com *C. butyricum* o glicerol é utilizado com fonte de carbono e tem como subprodutos, além do PDO, o lactato, butirato, CO₂, acetato e etanol (ZENG, 1996). Na formação de acetato e butirato são geradas moléculas de ATP. PAPANIKOLAU et al. (2000) observaram em cultivos contínuos com *C. butyricum* F2b em diferentes taxas de diluição que estes produtos não estão diretamente relacionados a produção de biomassa, provavelmente porque eles

competem na geração de ATP. Os autores observaram que em determinado D há uma alteração no metabolismo celular e que a taxa de diluição utilizada determina se haverá mais formação de acetato ou butirato. Resultados similares com *C. butyricum* DSM 5431 também indicam que o aumento de D aumenta a razão estequiométrica entre acetato e butirato (ZENG, 1996). Estes resultados demonstram a relevância na análise de D para a produção do produto de interesse.

Para este presente trabalho, a influência de D sobre o $Y_{PDO/GLR}$ foi pequena com variação de 0,84 a 0,89 $\text{mol}_{PDO}/\text{mol}_{GLR}$. Pode-se observar na Figura 48 que para a produção de PDO valores acima de $0,25 \text{ h}^{-1}$ a concentração final deste produto (*titer*) diminui. No entanto, com valores abaixo de $0,5 \text{ h}^{-1}$ perde-se em produtividade. Uma análise econômica deve ser realizada para a escolha de D no processo de produção de PDO em quimiostato.

Para os demais experimentos realizados optou-se na utilização de D igual a $0,5 \text{ h}^{-1}$, pois apresentou alta produtividade e houve um consumo total de glicose e glicerol. O fator de conversão global $Y_{PDO/GLR}$ representado pelo coeficiente angular da relação entre a velocidade específica de consumo de PDO e a velocidade de consumo de glicerol é de $0,79 \text{ g}_{PDO}/\text{g}_{GLR}$ ou $0,96 \text{ mol}_{PDO}/\text{mol}_{GLR}$ (Figura 52). Estes resultados indicam que o menor valor encontrado nestes experimentos que foi $0,84 \text{ mol}_{PDO}/\text{mol}_{GLR}$, representando um rendimento global de glicerol a PDO de 87,5%. É possível que os 12,5% consumidos de glicerol tenham produzido o intermediário 3-HPA. No entanto, no método utilizado para análise de cromatografia líquida (HPLC) este composto não foi identificado.

Figura 52: Relação entre q_{PDO} e q_{GLR} para cálculo do valor experimental verdadeiro de $Y_{PDO/GLR}$.

Com estes quimiostatos, também foi possível calcular o coeficiente de manutenção das células (m_s) e o valor experimental verdadeiro de $Y_{X/GLC}$ através da correlação entre a velocidade específica de consumo de glicose (q_{GLC}) e μ (D), proposta por PIRT (1965) demonstrada na equação 33.

$$q_{GLC} = \frac{\mu}{Y_{X/GLC}} + m_s \quad (33)$$

Para o cálculo de q_{GLC} , para fins de comparação, considerou-se que o consumo dos carbonos advindos da peptona e dos extratos de levedura e de carne fossem oriundos da glicose. Sendo assim, o valor encontrado para m_s foi igual a 0,65 $g_{GLC}/g_X \cdot h$ e $Y_{X/GLC}$ foi de 0,16 g_X/g_{GLC} ou 0,28 mol_X/mol_{GLC} (Figura 53).

Figura 53: Cálculo de m_s e $Y_{X/GLC}$ nos quimiostatos com diferentes D.

Não foram encontrados na literatura revisada valores de $Y_{X/GLC}$ e m_s para o *Lactobacillus*. Porém, alguns autores realizaram este cálculo para *C. butyricum* em meio contendo apenas glicerol como fonte de carbono ($Y_{X/GLR}$). CHATZIFRAGKOU et al. (2011) realizaram experimentos em quimiostato com *C. butyricum* VPI 1718 e o $Y_{X/GLR}$ calculado foi igual a 0,029 g/g e m_s de 1,607 g/g.h. Segundo os autores, a formação de PDO é parcialmente associada ao crescimento. Este fato explicaria os diferentes valores encontrados por PAPANIKOLAOU et al. (2000) com a cepa *C. butyricum* F2b, que foram iguais a 0,057 g/g de $Y_{X/GLR}$ e 1,47 g/g.h para o coeficiente de manutenção. Os valores encontrados para o *L. reuteri* são bem distintos dos encontrados para *C. Butyricum*, mostrando diferenças no metabolismo.

Também foi possível analisar com estes experimentos se os produtos gerados são diretamente proporcionais a formação de biomassa. Para esta análise, relacionou-se a

velocidade específica de formação de produtos e o consumo de glicerol com D (Figura 54). Pode-se observar através das regressões lineares que a produção de lactato, PDO, acetato e CO₂ estão diretamente relacionados a formação de biomassa, assim como o consumo de glicerol, mesmo não sendo utilizado como fonte de carbono.

Figura 54: Correlações entre as velocidade específica de formação de produtos e consumo de glicerol e as taxas de diluição testadas.

5.9 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO GLICEROL BRUTO

O experimento C6 foi realizado nas mesmas condições do experimento C2, ambos com meio MRS acrescidos de 15 g/L de glicerol, D=0,5 h⁻¹ e em anaerobiose (injeção de N₂). A única diferença entre eles foi o uso do glicerol bruto em C6.

Pode-se observar que a adição de glicerol bruto no meio de cultura não influenciou a produção de PDO, $Y_{PDO/GLY}$ e a produtividade quando comparada ao experimento C2, indicando que as impurezas contidas no glicerol bruto não interferem no processo. Além disso, não afetou a produção de biomassa, mostrando que este glicerol pode ser usado na produção de PDO.

As razões molares entre glicose e glicerol utilizadas foram praticamente iguais em ambos, sendo $0,61 \text{ mol}_{GLC}/\text{mol}_{GLR}$ em C2 e $0,63 \text{ mol}_{GLC}/\text{mol}_{GLR}$ em C6.

Os fatores de conversão $Y_{X/GLC}$ e $Y_{CO_2/GLC}$ também não sofreram influência. No entanto houve maior formação de lactato e menor de acetato e etanol, representados pelos fatores de conversão $Y_{X/LAC}$ (18% maior em C6), $Y_{ACE/GLC}$ (7% a menos em C6) $Y_{ETH/GLC}$ (14% a menos em C6) (Tabela 29).

Observou-se que a quantidade de carbono utilizada oriunda de outras fontes foi 24% maior, o que poderia explicar esta diferença. Na análise com os fatores de conversão corrigidos pelo consumo de carbono, nota-se os valores de $Y_{X/C}$, $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e $Y_{CO_2/C}$ são iguais nas duas condições. Somente o $Y_{LAC/C}$ apresentou uma diferença de 11%, que pode ser causada apenas pelas diferenças dos experimentos ou até mesmo um erro operacional (Tabela 30).

A vantagem de se utilizar o glicerol bruto no processo industrial é muito grande, uma vez que não há necessidade de um pré-tratamento deste composto, fazendo com que seja economicamente mais viável.

Não foram encontrados trabalhos com *L. reuteri* que utilizam glicerol bruto para a produção de PDO. No entanto, PFLUGL et al. (2014) realizaram experimentos com *L. diolivorans* em meio com glicerol de diferentes origens e afirmam que não houve inibição no crescimento e na produção de PDO.

Existem muitos trabalhos relatados com o uso do glicerol bruto para diferentes bactérias. MOON et al. (2010) avaliaram o efeito do glicerol oriundo de duas fontes diferentes em cultivos em batelada usando bactérias do gênero da *Klebsiella* e *Clostridium*. Segundo os autores, todas as cepas de *Klebsiella* testadas apresentaram resistência aos diferentes tipos de glicerol. Porém, para algumas cepas de *Clostridium* apresentaram um efeito inibitório dependendo do tipo de glicerol bruto utilizado. Isso também foi observado por GONZALEZ-PAJUELO et al. (2004).

5.10 EFEITO DO OXIGÊNIO NOS CULTIVOS EM QUIMIOSTATO

Como dito anteriormente, o experimento C7 foi realizado para analisar a influência do oxigênio dissolvido no meio de cultura no metabolismo de *L. reuteri*, uma vez que este microrganismo é facultativo. Para fins de comparação, o experimento C8 foi adotado como controle, pois representa o experimento com o mesmo “r” e com as mesmas condições de cultivo, com exceção da composição dos gases de entrada e da frequência de agitação.

Pode-se observar que a adição de oxigênio aumentou a razão entre glicose e glicerol consumidos pelas bactérias de 0,52 mol_{GLC}/mol_{GLR} para 1,08 mol_{GLC}/mol_{GLR} (Tabela 29). Isso indica que houve um desvio na rota de formação de PDO desfavorecendo o consumo de glicerol, consequentemente menor $Y_{PDO/GLY}$, produção e produtividade de PDO.

Estes resultados indicam claramente que o oxigênio compete com o glicerol na regeneração de NAD⁺ e não com o lactato, como proposto por LOPEZ DE FELIPE; GAUDU (2009) para *Lactococcus lactis*. Uma vez que $Y_{LAC/GLC}$ foi apenas 5% menor que no cultivo em anaerobiose.

Este fato pode estar relacionado com as enzimas responsáveis pela produção de acetato através do piruvato. No genoma do *L. reuteri*, como mencionado anteriormente, não foram comprovadas as enzimas responsáveis pela transformação do piruvato em acetil-P, diferentemente do *L. plantarum* ou mesmo do *L. lactis* (GUIDONE et al., 2013; LOPEZ DE FELIPE; GAUDU, 2009). Consequentemente, o piruvato não é catabolizado em acetil-P e não há competição com o oxigênio no consumo de NADH.

A presença do oxigênio provocou um aumento de 43% no $Y_{ACE/GLC}$, consequentemente maior produção de ATP. No entanto, esta energia produzida a mais não gerou um aumento na biomassa. Este fato também foi observado na análise do fator de conversão corrigido pelo balanço. O $Y_{ACE/C}$ em C7 foi 43% maior que em C8 e também não foi observado diferenças no $Y_{X/C}$. Segundo SAKAMOTO; KOMAGATA (1996) a atividade das flavoproteínas oxidases presentes na bactéria ácido lácticas resultam na formação de H₂O₂. Este composto por sua vez pode ter causado um efeito tóxico sobre as células, assim como foi observado para *L. plantarum* P5 (MURPHY; CONDON, 1984).

5.11 EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NO MEIO DE CULTURA

O experimento C8 foi realizado em meio MRS com uma adição de 25,6 g/L de glicerol (r igual a $0,32 \text{ mol}_{\text{GLC}}/\text{mol}_{\text{GLR}}$), ou seja com uma razão entre glicose e glicerol menor que o C2, que foi igual $0,59 \text{ mol}_{\text{GLC}}/\text{mol}_{\text{GLR}}$.

A razão consumida entre glicose e glicerol foi de $0,52 \text{ mol}_{\text{GLC}}/\text{mol}_{\text{GLR}}$, o que representa um valor 15% menor ao utilizado em C2, indicando que o consumo de glicerol em C8 foi um pouco maior e isso pode ter gerado estas alterações no metabolismo. Porém, 15,7 g/L de glicerol não foram consumidos. Estes resultados mostram que aumentar a concentração de glicerol no meio para obter maiores concentrações de PDO não é eficaz, uma vez que o metabolismo da glicose está diretamente relacionado, ou seja, se não há disponibilidade de glicose, não há consumo de glicerol.

Na Tabela 29, pode-se observar que a adição deste composto favoreceu a produção de lactato ($Y_{\text{LAC/GLC}}$ 18% maior que em C2) e de acetato ($Y_{\text{ACE/GLC}}$ 22% maior que em C2), além de diminuir a produção de etanol ($Y_{\text{ETH/GLC}}$ 30% menor).

No entanto, através da Tabela 30, observa-se que apenas os valores corrigidos de $Y_{\text{ETH/C}}$ de C2 e C8 foram diferentes, indicando que a adição de glicerol favoreceu a formação de etanol, consequentemente, desfavoreceu a produção de PDO.

Quanto ao $Y_{\text{PDO/GLC}}$, C8 apresentou um valor 13% menor que C2. Essa proporção duas vezes maior de glicerol consumido deu origem a outros produtos, possivelmente ao 3-HPA. Segundo TOBAJAS et al. (2009) o “ r ” ideal no meio de cultura para a produção do 3-HPA é de $0,33 \text{ mol}_{\text{GLC}}/\text{mol}_{\text{GLR}}$, que é praticamente o mesmo utilizado para esta condição.

5.12 INFLUÊNCIA DAS MODIFICAÇÕES DO MEIO MRS NOS EXPERIMENTOS EM QUIMIOSTATOS

Com o objetivo principal de aumentar a produtividade e a concentração final de PDO foram realizados experimentos em quimiostatos em diferentes composições do meio MRS.

5.12.1 Efeito do aumento das concentrações de glicose e glicerol no meio MRS nos experimentos em quimiostatos

Nos experimentos C9 e C10 foi mantida a razão molar entre glicose e glicerol em relação a C2, no entanto a concentração de ambos foi aumentada. A adição de glicose no meio teve como objetivo aumentar a concentração celular. Assim, o consumo deste substrato juntamente com o consumo de glicerol seria maior e, conseqüentemente, haveria maior produção de PDO. No entanto, conforme os resultados apresentados para experimentos C9 e C10, observou-se que, em relação a C2, não houve diferenças significativas entre as formações de biomassa.

Apesar da mesma razão entre glicose e glicerol adicionada no meio nos experimentos C2, C9 e C10, a razão consumida foi diferente. A adição dos substratos no meio fez com que houvesse maior consumo de glicose em relação ao glicerol, fazendo com que o “r” utilizado fosse, aproximadamente, 37% maior em relação a C2.

O consumo de glicose aumentou 23% em C10 em relação a C2, ou seja, em C10 foram consumidos 19,7 g/L. No entanto, este aumento no consumo não foi utilizado para a geração de biomassa. Nota-se que o aumento nas concentrações de glicose e glicerol favoreceu, principalmente, a via de formação de etanol. Como o etanol e o glicerol competem na formação de NAD^+ , as alterações no meio provocaram uma diminuição no consumo de glicerol e de formação de PDO. Provavelmente, esta preferência por uma rota metabólica foi provocada pelo excesso de glicose no meio, uma vez que durante o experimento com excesso de glicerol (C8) este fato não foi observado.

Pode-se observar também que nos experimentos C9 e C10 houve sobra de glicose no meio, indicando que este substrato pode não ser o limitante do processo. A busca pelo substrato limitante é interessante, uma vez que esta pode ser a chave para o aumento da concentração celular, conseqüentemente maior formação de PDO.

Deve-se lembrar que a concentração celular alcançada no estado estacionário em quimiostato permanece constante devido à limitação de nutrientes indispensáveis para o crescimento.; caso contrário, a concentração celular aumentaria com tempo. Este nutriente é denominado de substrato limitante. Ou seja, a concentração celular é controlada pelo residual do substrato limitante, o qual determina o equilíbrio entre crescimento e morte da população (JAMES, 1961). No entanto, isso acontece se não houver nenhum produto que iniba o crescimento.

Como já mostrado na secção 5.3.3, o lactato é um metabólito tóxico e provavelmente este produto está determinando a concentração celular alcançada em cada estado estacionário. Ou seja, os resultados indicam que a concentração celular está sendo controlada pela inibição gerada pelo lactato, ao invés de o ser por um substrato.

Para embasar esta afirmação seria interessante retirar o lactato presente no meio e observar o comportamento da biomassa. Para isso, optou-se por tentar precipitar o lactato presente no meio com carbonato de cálcio. No entanto, uma vez que o meio é complexo, estando presentes outros íons (como por exemplo sulfatos) com maior afinidade com o cálcio, o lactato não precipita. Isso explica a não observância de sua precipitação.

O lactato poderia ser retirado do meio reacional por diálise, como proposto por COSTA et al. (1999). Os autores utilizam um sistema de troca iônica acoplado ao biorreator para extrair os ácidos orgânicos, o que tornou possível manter a concentração desses ácidos em baixos níveis no biorreator, evitando a inibição do crescimento celular.

Este sistema pode ser interessante para o processo de produção de PDO por *L. reuteri*, uma vez que facilitaria o processo de *downstream* e poderiam ser alcançados maiores concentrações finais de PDO. Além disso, o lactato também é um produto de interesse comercial e a produção simultânea de ambos com altos fatores de conversão é uma das vantagens para escolha deste processo.

O ácido láctico é utilizado principalmente pelas indústrias alimentícias, químicas, cosméticas e farmacêuticas. Além disso, têm grande potencial para a produção do ácido polilático (PLA)(ABDEL-RAHMAN et al., 2013). Recentemente, o interesse por polímeros poliláticos está crescendo por serem verdadeiramente biodegradáveis, além de poderem ser produzidos a partir de recursos renováveis (ABDEL-RAHMAN et al., 2013; SAUER et al., 2010).

5.12.2 Efeito da adição de peptona e dos extratos de levedura e de carne no meio MRS nos cultivos em quimiostatos

Uma vez que foi observado que a glicose pode não ser o substrato limitante e não é possível afirmar que o efeito tóxico do lactato é o limitante do processo, foram adicionados ao meio peptona e os extratos de levedura e de carne no meio de

alimentação. Estes compostos são ricos em aminoácidos e vitaminas que poderiam estar limitando este processo. O experimento com a adição destes compostos foi o C11 e foi comparado com o C2.

Verificou-se que a modificação no meio não alterou a formação de biomassa, indicando que não havia limitação do processo pelos nutrientes presentes na peptona e nos extratos.

Da mesma forma que nos experimentos C9 e C10, a adição de peptona e extratos gerou um aumento entre a razão consumida de glicose e glicerol. No caso de C11, “r” foi igual a $0,79 \text{ mol}_{\text{GLC}}/\text{mol}_{\text{GLR}}$, representando um valor 31% maior que em C2.

A produção de etanol também foi favorecida e houve uma diminuição na produção de PDO. Ambos podem ser observados pelos fatores de conversão $Y_{\text{ETH/C}}$ e $Y_{\text{PDO/GLR}}$ (Tabela 29 e 30).

5.12.3 Efeito do aumento da concentração de nutrientes do meio MRS em 25% nos cultivos contínuos

Para confirmar que não há fontes de carbono, de nitrogênio ou até mesmo de alguns nutrientes limitando o crescimento celular nos cultivos em quimiostato, realizou-se o experimento C12. Neste ensaio, o meio MRS foi concentrado em 25% e utilizado como meio de alimentação.

Ao compará-lo ao ensaio C2, observou-se que houve um aumento de apenas 10% na concentração celular. Não é possível afirmar que houve um aumento efetivo da biomassa ou se é apenas uma variação entre os experimentos. No entanto, a produção de etanol foi 67% maior que em C2 e o consumo de glicerol 15% menor.

Nesta condição, apesar do consumo de glicerol ter sido menor, obteve-se um elevado fator de conversão $Y_{\text{PDO/GLR}}$ ($0,89 \text{ mol}_{\text{PDO}}/\text{mol}_{\text{GLR}}$) (Tabela 29). Como pode-se observar, em todos os experimentos uma parte do glicerol consumido não é transformado em PDO. De acordo com a reação de obtenção de PDO a partir de glicerol, esta parcela de glicerol pode estar gerando o 3-HPA. Sendo assim, pode-se dizer que esta condição foi a que menos favoreceu a formação deste intermediário.

5.12.4 Comparação dos ensaios com meio MRS modificado

A maioria dos fatores de conversão corrigidos pelo balanço de carbono dos experimentos C9, C10, C11 e C12 são estatisticamente iguais quando comparados a C2, com exceção do $Y_{ACE/C}$, $Y_{ETH/C}$ e do $Y_{PDO/GLR}$ (Tabela 30 e Figura 55). Toda a tentativa de concentrar o meio MRS gerou um favorecimento na rota de formação de etanol e diminuiu o consumo de glicerol, além de diminuir a produção de acetato. Com isso, verificou-se que estas condições para a produção de PDO não são interessantes.

Também foi verificado que nos experimentos em que houve adição de glicose no meio, a glicose adicionada não foi totalmente consumida. O consumo máximo deste substrato foi estatisticamente igual em C10, C11 e C12 quando comparados a C2, e em média igual a 19,6 g/L. A mesma observação foi feita com o consumo de glicerol. Consequentemente, esses ensaios apresentaram um mesmo “r” consumido (Tabela 29). Isso indica que para estas condições, visto que ambos os substratos se apresentavam em excesso, a capacidade máxima de assimilação do microrganismo foi igual $0,8 \text{ mol}_{GLC}/\text{mol}_{GLR}$. Claro que esta condição pode estar limitada pela inibição que o lactato gera sobre as células.

5.13 PRODUÇÃO DE PDO EM QUIMIOSTATO

Os experimentos em quimiostato foram realizados para avaliar quais as melhores condições para a produção de PDO em termos de produtividade, fator de conversão e maior concentração final deste produto. Além disso, pode-se verificar quais as rotas preferenciais do metabolismo em cada condição utilizada. A Figura 55 apresenta os fatores de conversão corrigidos pelo balanço de carbono (glicose mais carbonos advindos de outras fontes) e os valores de $Y_{PDO/GLR}$.

Figura 55: Fatores de conversão corrigidos pelo balanço de carbono e $Y_{PDO/GLR}$ dos experimentos em quimiostato.

Verifica-se que a condição C1, com D igual a $0,25 \text{ h}^{-1}$, foi a que apresentou um menor $Y_{X/C}$, aliás foi a única condição em que este valor foi diferente dos demais. No entanto, a concentração máxima celular alcançada neste caso foi uma das maiores, com $3,27 \text{ g/L}$ (Figura 56).

A taxa de diluição igual a $0,5 \text{ h}^{-1}$ com o meio MRS (C2) e com meio MRS suplementado (C9, C10, C11 e C12) desfavoreceram o $Y_{LAC/X}$ em relação aos demais em anaerobiose. Este fato também pode ser observado na Figura 56, onde percebe-se que

estas condições produziram uma menor quantidade de lactato quando comparado aos outros estados estacionários.

A melhor condição, dentre as testadas, para a produção de acetato foi na presença de oxigênio (C7). Neste estado estacionário, obteve-se um $Y_{ACE/GLC}$ igual a 0,96 mol_{ACE}/mol_{GLC} (ou $Y_{ACE/C}$ corrigido igual a 0,10 mol_{ACE}/mol_{GLC}) e uma concentração final igual a 5,28 g/L.

Os ensaios com os menores fatores $Y_{ETH/C}$ foram C1, C7 e C8. Nestas condições também foi observado maior $Y_{ACE/C}$, isso aconteceu provavelmente por causa da maior formação de acetato, indicando uma preferência na via de regeneração de NADH pelo consumo de glicerol (no caso de C1 e C8) ou pelo oxigênio (C7). Ambos, glicerol e oxigênio, competem com o etanol na formação de NAD⁺. Em C8, houve adição de glicerol no meio e isso também favoreceu o consumo de glicerol e fez com que menos etanol fosse produzido.

Figura 56: Consumo de substratos e formação de produtos dos experimentos em quimiostato.

Com os resultados obtidos não foi possível identificar um padrão para os $Y_{CO_2/C}$, que variou entre 0,09 a 0,12 mol_{CO₂}/mol_C. Em termos de produção de CO₂, observou-se

que houve uma diminuição na formação deste produto com o aumento de D e um aumento da produção na presença de oxigênio. No entanto, as modificações realizadas no meio não afetaram a produção do mesmo, mantendo-se em torno de 3,7 g/L.

Segundo PFLUGL et al. (2012), a formação de PDO pode estar associada a formação de acetato. A correlação entre elas sugere que a formação de 2 mols de PDO requer a formação de 1 mol de acetato. Os resultados obtidos nos quimiostatos estão de acordo com os resultados encontrados pelos autores (Figura 57). Todos os valores de $Y_{PDO/ACE}$ estão em torno de 2 mol_{PDO}/mol_{ACE}, com exceção do ensaio com injeção de oxigênio (C7), devido a competição de NADH entre o glicerol e o oxigênio.

Figura 57: Relação entre as produções de PDO e acetato no ensaios em quimiostato.

A maior produção de PDO encontrada ocorreu durante a condição C1, quando o consumo de glicerol também foi maior. Quanto ao fator de conversão $Y_{PDO/GLR}$, observa-se que ele se manteve elevado em C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C12 (Figura 55). No entanto, a presença de oxigênio (C7) e as modificações realizadas no meio como a adição de glicerol (C8), de glicose (C9 e C10) e de extratos e peptona (C11) desfavoreceram esta via.

Em termos de produtividade de PDO, verificou-se que as melhores condições foram nos ensaios com D maior ou igual a 0,5 h⁻¹ (C2, C3, C4, C5, C6 e C8) e na condição em que o glicerol foi adicionado no meio (C8). Porém, a única condição onde se verifica o consumo total do glicerol foi a C2.

Para todas as condições foram calculados os valores das produtividades específicas globais (q_{PDO}) afim de se obter uma relação entre este parâmetro e a produtividade do PDO. No entanto, observou-se que não há uma relação direta entre

eles, uma vez que o ensaio com maior produtividade não foi o que apresentou maior valor de q_{PDO} (Figura 58).

Figura 58: Produtividade específica global e produtividade de PDO dos estados estacionários.

A produtividade alcançada em C2 foi de 4,9 g/L.h e, como dito anteriormente, é a maior encontrada para *L. reuteri*. Quanto aos outros microrganismos produtores naturais de PDO, como a *Klebsiella* e o *Clostridium*, pode-se observar que existem valores maiores do que este reportados na literatura (MENZEL et al.; GONZALEZ-PAJELO et al.). Apesar disso, *L. reuteri* continua sendo um ótimo candidato para a produção de PDO.

Todos os resultados obtidos indicam que o lactato é o principal produto inibitório do processo, uma vez que os resultados de toxicidade indicaram esta inibição. Além disso, foram adicionados todos os possíveis substratos limitantes do processo contínuo e não foi observado um aumento na concentração celular.

Como mencionado anteriormente, a forma mais adequada para a retirada do lactato do meio reacional seria através de um reator com membrana. No entanto, com os recursos disponíveis para a presente pesquisa, não foi possível testar esta hipótese.

Mesmo assim, com base nos resultados obtidos, afirma-se que a retirada do lactato e modificações no processo contínuo, como reciclo de células ou até um processo contínuo com células imobilizadas podem aumentar consideravelmente a concentração de PDO e alcançar produtividades maiores.

5.14 COMPARAÇÃO ENTRE OS EXPERIMENTOS EM BATELADA, BATELADA REPETIDA E CONTÍNUO

A produtividade de PDO encontrada no experimento em batelada B1 para a linhagem de *Lactobacillus* usada está compatível com os resultados encontrados na literatura. No entanto, a produtividade encontrada no experimento em batelada repetida com decantação é a maior reportada para produção de PDO. Na literatura revisada para esta pesquisa, não foi encontrado nenhum trabalho que utiliza a técnica de decantação de células em batelada repetida para a produção do produto de interesse. Além disso, os resultados em quimiostato também são os maiores reportados para o gênero *Lactobacillus sp.*

A máxima concentração celular alcançada foi em BR2, igual a 4,1 g/L. O fator de conversão $Y_{PDO/GLR}$ e a produção de PDO foram próximos em todos os ensaios, em torno de 0,70 g_{PDO}/g_{GLR} e 10 g/L. Os principais resultados para diferentes tipos de processo estão na Figura 59. Vale frisar que os dados apresentados para o quimiostato referem-se a condição C2.

Pode-se observar que a produtividade de PDO não está diretamente relacionada com a concentração celular, uma vez que o ensaio que alcançou a maior delas não foi o mais produtivo. Isso pode ser observado mais claramente pela velocidade específica de produção global: o maior valor encontrado foi em BR2.

Nota-se que a velocidade de consumo de glicose está diretamente relacionada à produtividade, ou seja, quanto maior Q_{GLC} , maior Q_{PDO} . Provavelmente, a transformação do glicerol em PDO é a rota energeticamente mais viável de se regenerar o NADH produzido na via da glicose. Por isso que os experimentos contínuos apresentaram mais Q_{PDO} , uma vez que em estado estacionário Q_{GLC} é constante. A regressão linear entre Q_{GLC} e Q_{PDO} na Figura 59 indica esta proporcionalidade.

Esta relação entre Q_{PDO} e Q_{GLC} parece estar relacionada à composição do meio de cultura, pois quando a comparação é feita entre os resultados obtidos em C2 com os resultados em diferentes composições no meio de cultura (C9, C10, C11 e C12) esta proporcionalidade não existe. Nestes últimos quimiostatos realizados houve uma maior velocidade de consumo de glicose, no entanto as produtividades foram iguais ou menores que as alcançadas em C2.

Figura 59: Comparação entre os diferentes tipos de processo.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem concluir que:

- ✓ A padronização do inóculo é uma etapa importante, pois reduz a fase lag de crescimento das células. Além de diminuir a variabilidade dos experimentos.
- ✓ A presença de glicerol no meio MRS influencia o metabolismo da glicose no *L. reuteri*. Este substrato atua como aceptor de elétrons, desviando a rota para a produção de acetato, consequentemente, favorecendo a produção de células e reduzindo a produção de etanol.
- ✓ O glicerol, assim como a xilose e a frutose, não são utilizados como fontes de carbono e energia para *L. reuteri*.
- ✓ Dentre as concentrações de substratos testados nos testes de tolerância, observou-se que a glicose tampouco o glicerol causaram uma inibição no crescimento celular.
- ✓ Nos testes de toxicidade, dentre as concentrações testadas, o lactato foi no único produto inibitório no crescimento celular.
- ✓ Dentre as condições testadas em batelada, a maior produtividade obtida foi na condição de anaerobiose, pH 5,5 e 37°C. No entanto, a maior concentração final de PDO alcançada no ensaio com a temperatura mais baixa (30°C). Nesta condição, a produtividade foi menor, uma vez que as células cresceram em uma velocidade mais baixa quando comparado ao cultivo realizado a 37°C.
- ✓ A melhor condição testada nos ensaios em batelada repetida ocorreu retirando-se 80% do volume do caldo fermentado e com decantação de células. Os valores de produtividade de PDO nesta condição foram 3 vezes maiores que o ensaio em batelada (anaerobiose, pH 5,5 e 37°C).
- ✓ Nos ensaios em quimiostato, a maior produção de PDO foi alcançada na condição com meio MRS e taxa de diluição igual a 0,25 h⁻¹. Porém, em termos de produtividade e consumo total de substratos presentes no meio de alimentação a melhor condição foi com a taxa de diluição igual a 0,5 h⁻¹ e meio MRS. Nesta condição, Q_{PDO} foi 3,5 vezes maior que o melhor resultado obtido na batelada.

- ✓ Os valores de produtividades alcançados neste trabalho para *Lactobacillus reuteri* são os maiores reportados na literatura. Dentre os diferentes tipos de processo testados, conclui-se que os mais adequados, em termos de produção de PDO, são os processos em batelada repetida e quimiostato.
- ✓ Para os experimentos realizados em meio MRS, observou-se que quanto maior a velocidade de consumo de glicose, maior a produção de PDO.
- ✓ O aumento da taxa de diluição nos ensaios em quimiostato, causaram uma diminuição no consumo de glicerol, consequentemente na formação de PDO. No entanto, a produtividade se manteve alta e constante para os valores de D iguais a 0,5 até 0,9 h⁻¹.
- ✓ Todos os produtos gerados no metabolismo da glicose estão diretamente associados ao crescimento.
- ✓ A adição de glicerol bruto no meio de cultura não influenciou a produção de PDO, Q_{PDO} e $Y_{PDO/GLR}$ quando comparados com os resultados obtidos com o glicerol puro. A possibilidade de utilização do glicerol bruto é interessante, uma vez que o custo desta matéria-prima é desprezível.
- ✓ A presença de oxigênio no meio desfavoreceu a rota de produção de PDO, consequentemente, o $Y_{PDO/GLR}$. Pode-se concluir que o oxigênio compete com o glicerol na regeneração de NAD⁺.
- ✓ A adição de substratos como a glicose e o glicerol no meio de alimentação não gerou alterações significativas na produção de PDO o que permite concluir que a adição destes compostos favoreceu a rota de produção de etanol. Além disso, pôde-se observar que a concentração celular dos experimentos em quimiostatos não foi afetada, indicando que a glicose não é o substrato limitante do processo contínuo. A adição de peptona e extratos de carne e levedura e o meio concentrado em 25% no meio de alimentação também não aumentou a biomassa nos estados estacionários.
- ✓ Com isso, conclui-se que o processo pode não estar limitado por um substrato limitante, mas sim por um produto inibitório, no caso, o lactato, como demonstrado nos ensaios de toxicidade. Embora esta hipótese não tenha sido testada diretamente, é possível que a retirada do mesmo do meio reacional aumentará a concentração final de PDO e possivelmente a sua produtividade.

- ✓ Além do interesse no mercado pelo 1,3-propanodiol, há um interesse na produção de lactato. Sendo assim, a obtenção de ambos os produtos em um só processo através dos cultivos com *L. reuteri* em cofermentação de glicose e glicerol, poderia ser tornar este processo economicamente viável.

7 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

O presente trabalho apresenta a possibilidade de produção do PDO por *Lactobacillus reuteri*, principalmente pelo altos valores de produtividade alcançados nos processos em batelada repetida com decantação e em quimiostato. No entanto, quando comparado a outros microrganismos, observou-se que a concentração alcançada de PDO ainda é pequena.

Sendo assim, modificações genéticas neste microrganismo a fim de aumentar a produção de PDO seriam interessantes. Com por exemplo, a inativação da via de produção de etanol, uma vez que foi observado que este produto compete o glicerol na formação de NADH.

A retirada do lactato do meio reacional através de reatores de membrana também é interessante, uma vez que aumentará a produção de PDO. Além disso, seriam produzidos dois produtos de interesse no mercado, conseqüentemente, tornaria o processo mais viável.

Por fim, seria interessante um trabalho de otimização do meio de cultura MRS, com o objetivo de reduzir os custos de matéria-prima para a produção destes compostos.

8 REREFÊNCIAS

ABBAD-ANDALOUSSI, S. et al. Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 515-22, 1998.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnol Advances**, v. 31, n. 6, p. 877-902, 2013.

ALVAREZ, M. D. et al. Glycerol metabolism of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: Cloning and expression of two glycerol kinase genes. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 170-181, 2004.

ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. <http://www.anp.gov.br/>, 2012. Acesso em: 10/02/2015.

_____. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. <http://www.anp.gov.br/>, 2014. Acesso em: 10/02/2014.

ARSKOLD, E. et al. Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 1, p. 206-212, 2008.

AXELSSON, L. et al. Production of a broad-spectrum antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 2, n. 2, p. 131-6, 1989.

BAEZA-JIMENEZ, R. et al. Effect of glucose on 1,3-propanediol production by *Lactobacillus reuteri*. **Revista Mexicana De Ingenieria Quimica**, v. 10, n. 1, p. 39-46, 2011.

BIEBL, H. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* measurement of product inhibition by use of a ph-auxostat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 701-705, 1991.

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

BIEBL, H. et al. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 289-297, 1999.

BORZANI, W. et al. Kinetics of semicontinuous microbial transformation of whey by *Lactobacillus bulgaricus* varying the initial concentration of yeast autolyse. **Journal of Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 61-66, 1993.

BOUVET, O. M. M. et al. Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the enterobacteriaceae. **Research in Microbiology**, v. 146, n. 4, p. 279-290, 1995.

CASAS, I. A.; DOBROGOSZ, W. J. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, n. 4, p. 247-85, 2000.

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 101-12, 2011.

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

CLEUSIX, V. et al. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 101, 2007.

COLIN, T.; BORIES, A.; MOULIN, G. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 201-5, 2000.

COLIN, T. et al. Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Current Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 238-243, 2001.

COSTA, J. P. C. L. **Análise da produção do antitumoral retamicina em cultivos contínuos de *Streptomyces olindensis* ICB20 utilizando planejamento fatorial**. 2008. (Tese de doutorado). Engenharia Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

COSTA, J. P. C. L. et al. On-line dialysis of organic acids from a *Propionibacterium freudenreichii* fermentation - Evaluation of a new pH control strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 99-105, 1999.

DASARI, M. Crude glycerol potential described. **Feedstuffs**, p. 1-3, 2007.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DOBSON, R.; GRAY, V.; RUMBOLD, K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 217-226, 2012.

DOLEYRES, Y. et al. Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 4, p. 467-474, 2005.

EL-ZINEY, M. G. et al. Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 10, p. 913-916, 1998.

EMPTAGE, M. et al. **Process for the biological production of 1,3-propanediol with high titer**. Wilmington: E. I. du Pont de Nemours and Company. US 6514733 B1 2003.

GENNIS, R. B.; STEWART, V. Respiration. In: NEIDHARDT, F. C. (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology**. 2. Washington, D.C.: ASM Press, v.1, 1996. p.217-261.

GONZALEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 442-446, 2004.

_____. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 391-396, 2005.

GUIDONE, A. et al. Aerobic metabolism and oxidative stress tolerance in the *Lactobacillus plantarum* group. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 1713-1722, 2013.

HERMANN, B. G.; PATEL, M. Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology - A techno-economic analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, n. 3, p. 361-388, 2007.

HEYNDRIX, M. et al. The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG-1212T2 and LMG-1213T1 and *C. pasteurianum* LMG-3285. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 637-642, 1991.

JAMES, T. W. Continuous culture of microorganisms. **Annual Review Microbiology**, v. 15, p. 27-46, 1961.

JIN, P. et al. Enhanced reducing equivalent generation for 1,3-propanediol production through cofermentation of glycerol and xylose by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 7-8, p. 1532-1542, Dec 2011.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 49, p. 209-24, 1983.

KANDLER, O.; STETTER, K. O.; KOHL, R. *Lactobacillus reuteri* sp-nov, a new species of heterofermentative lactobacilli. **Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene I Abteilung Originale C-Allgemeine Angewandte Und Okologische Mikrobiologie**, v. 1, n. 3, p. 264-269, 1980.

KANG, T. S.; KORBER, D. R.; TANAKA, T. Glycerol and environmental factors: effects on 1,3-propanediol production and NAD(+) regeneration in *Lactobacillus panis* PM1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 4, p. 1003-11, 2013a.

_____. Influence of oxygen on NADH recycling and oxidative stress resistance systems in *Lactobacillus panis* PM1. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 10, 2013b.

_____. Bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol in thin stillage-based media by engineered *Lactobacillus panis* PM1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 629-635, 2014.

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

_____. Simple strategy of repeated batch cultivation for enhanced production of 1,3-propanediol using *Clostridium diolis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1061-1068, 2012b.

KHAN, N. H. et al. Isolation and characterization of novel 1,3-propanediol-producing *Lactobacillus panis* PM1 from bioethanol thin stillage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 417-428, 2013.

KNIFTON, J. F. et al. **One-step production of 1, 3-propanediol from ethylene oxide and syngas with a cobalt-iron catalyst**. US6750373 B2 2004.

KONINGS, W. N. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 3-27, 2002.

KRAUS, G. A. Synthetic methods for the preparation of 1,3-propanediol. **Clean Soil Air Water**, v. 36, 2008.

KRAUTER, H.; WILLKE, T.; VORLOP, K. D. Production of high amounts of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by *Lactobacillus reuteri* with strongly increased biocatalyst lifetime and productivity. **New Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 211-217, Jan 2012.

LEJA, K.; CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biotechnological synthesis of 1,3-propanediol using *Clostridium* ssp. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 54, p. 11093-11101, Sep 2011.

LEVINE, S.; BERENSON, K. **Estatística - Teoria e Aplicações**. 3ª. Rio de Janeiro: 2005. 312 - 315

LI, Z. et al. Fermentative production of L-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 138-142, 2010.

LOPEZ DE FELIPE, F.; GAUDU, P. Multiple control of the acetate pathway in *Lactococcus lactis* under aeration by catabolite repression and metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1115-1122, 2009.

LUTHI-PENG, Q.; DILEME, F. B.; PUHAN, Z. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 2-3, p. 289-296, 2002.

LUTHI-PENG, Q.; SCHARER, S.; PUHAN, Z. Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 73-80, 2002.

MADIGAN, M. T. et al. Brock Biology of Microorganisms. In: 13TH (Ed.). **Brock Biology of Microorganisms**. San Francisco, United States, 2012. cap. Microbial Growth, p.330-377. ISBN 13: 978-0-321-64963-8.

MAERVOET, V. E. T. et al. *Citrobacter werkmanii*, a new candidate for the production of 1,3-propanediol: strain selection and carbon source optimization. **Green Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 2168, 2012.

MAERVOET, V. E. T. et al. Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 189-202, 2011.

MEESTERS, P.; HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G. High cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 5, p. 575-579, 1996.

MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 2, p. 82-86, 1997.

MIN, Y. N. et al. Glycerin-A New Energy Source for Poultry. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 1, p. 1-4, 2010.

MONOD, J. **Recherches sur la croissance des Cultures Bactériennes**. Paris: Hermann, 1942.

MOON, C. et al. Effect of biodiesel-derived raw glycerol on 1,3-propanediol production by different microorganisms. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 161, n. 1-8, p. 502-10, 2010.

MORITA, H. et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. **DNA Research**, v. 15, n. 3, p. 151-61, 2008.

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**, v. 3, n. 32, p. 639-48, 2009.

- MU, Y. et al. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 21, p. 1755-1759, 2006.
- MURPHY, M. G.; CONDON, S. Comparison of aerobic and anaerobic growth of *Lactobacillus plantarum* in a glucose medium. **Archives of Microbiology**, v. 138, n. 1, p. 49-53, 1984.
- NAKAMURA, C. E.; WHITED, G. M. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 454-459, 2003.
- OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 517-522, 1997.
- PAGLIARO, M. et al. From glycerol to value-added products. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 46, n. 24, p. 4434-4440, 2007.
- PAPANIKOLAOU, S. et al. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. **Journal of Biotechnology**, v. 77, n. 2-3, p. 191-208, 2000.
- PARVEZ, S. et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1171-1185, 2006.
- PASTERIS, S. E.; DE SAAD, A. M. S. Sugar-glycerol cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3853-3858, 2009.
- PFLUGL, S. et al. 1,3-Propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans*. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 133-140, 2012.
- _____. Heading for an economic industrial upgrading of crude glycerol from biodiesel production to 1,3-propanediol by *Lactobacillus diolivorans*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 499-504, 2014.
- PFLUGMACHER, U.; GOTTSCHALK, G. Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 313-6, 1994.
- PIRT, S. J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 163, n. 991, p. 224-31, 1965.
- RASCH, M. et al. Characterisation and modelling of oscillatory behaviour related to reuterin production by *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 2-3, p. 383-394, 2002.
- REIMANN, A.; BIEBL, H.; DECKWER, W. D. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 4, p. 359-363, 1998.

RHEE, S. K.; PACK, M. Y. Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**, v. 144, n. 1, p. 217-21, 1980.

RIVALDI, J. D. et al. Metabolism of biodiesel-derived glycerol in probiotic *Lactobacillus strains*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1735-1743, Feb 2013.

SAINT-AMANS, S. et al. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 8, p. 831-6, 1994.

SAKAMOTO, M.; KOMAGATA, K. Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 3, p. 210-216, 1996.

SAUER, M. et al. 16 years research on lactic acid production with yeast – ready for the market? **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 27, n. 1, p. 229-256, 2010.

SAXENA, R. K. et al. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 895-913, 2009.

SCHMIDELL, W. et al. Biotecnologia Industrial. In: BLÜCHER, E. (Ed.). **Biotecnologia industrial**. 2ª. São Paulo, v.2, 2001. cap. 14, p.277-331.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering: Basic Concepts. In: (Ed.). New York, United States, 2001. p.256-261.

STEVENS, M. J. et al. 1,3-Propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 61, 2011.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70º Aniversário do Biodiesel em 2007: Evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2068-71, 2007.

SUN, J. B. et al. Comparative genomic analysis of dha regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 263-272, 2003.

TALARICO, T. L. et al. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:NAD oxidoreductase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 943-948, 1990.

TALARICO, T. L. et al. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 12, p. 1854-1858, 1988.

TARANTO, M. P.; VALDEZ, G. F.; PEREZ-MARTINEZ, G. Evidence of a glucose proton motive force-dependent permease and fructose phosphoenolpyruvate:

phosphotransferase transport system in *Lactobacillus reuteri* CRL 1098. **FEMS Microbiol Lett**, v. 181, p. 109-112, 1999.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, n. 2, p. 261-265, Mar 2006.

TOBAJAS, M. et al. Unstructured kinetic model for reuterin and 1,3-propanediol production by *Lactobacillus reuteri* from glycerol/glucose cofermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 675-680, May 2009.

TOBAJAS, M. et al. A kinetic study of reuterin production by *Lactobacillus reuteri* PRO 137 in resting cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 218-225, 2007.

TORINO, M. I. et al. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 846-852, 2001.

TSENG, C. P.; MONTVILLE, T. J. Enzymatic regulation of glucose catabolism by *Lactobacillus plantarum* in an aerobic chemostat. **Biotechnology Progress**, v. 8, p. 126-31, 1992.

VALDEZ, G. F. et al. Shifts in pH affect the maltose/glycerol co-fermentation by *Lactobacillus reuteri*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 645-649, 1997.

VEIGA-DA-CUNHA, M.; FOSTER, M. A. 1,3 propanediol: NAD⁺ oxidoreductases of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 2005-10, 1992.

VOGEL, R. F. et al. Identification of *Lactobacilli* from sourdough and description of *Lactobacillus*-points sp-nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 2, p. 223-229, 1994.

VOLLENWEIDER, S.; LACROIX, C. 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 16-27, 2004.

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

WILLKE, T.; VORLOP, K. Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 9, p. 831-840, 2008.

XIU, Z. L. et al. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol-glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, n. 1, p. 42-52, 2007.

XUE, X. D. et al. Enhanced 1,3-propanediol production by supply of organic acids and repeated fed-batch culture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 681-687, 2010.

YE, J. J. et al. Regulation of the glucose:H⁺ symporter by metabolite-activated ATP-dependent phosphorylation of HPr in *Lactobacillus brevis*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 12, p. 3484-92, 1994.

ZAUNMÜLLER, T. et al. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 3, p. 421-429, 2006.

ZENG, A. P. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 4, p. 169-175, 1996.

ZENG, A. P.; BIEBL, H.; DECKWER, W. D. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: Recent progress. **Fuels and Chemicals from Biomass**, v. 666, p. 264-279, 1997.

ZHENG, P. et al. Overexpression of genes of the dha regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 2160-2169, 2006.

ZHU, C. J.; FANG, B. S. Application of a two-stage temperature control strategy to enhance 1,3-propanediol productivity by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 853-857, 2013.

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 Progress**, v. 18, n. 4, p. 694-699, 2002.

ZHUGE, B. et al. Expression of 1,3-propanediol oxidoreductase and its isoenzyme in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, n. 6, p. 2177-84, 2010.