UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ROGÉRIO DA SILVA SANTOS

**Produção conjunta de 1,3-Propanodiol e 2,3-Butanodiol
por *Klebsiella pneumoniae* a partir de glicerina residual
proveniente da fabricação de biodiesel**

Lorena-SP
2012

ROGÉRIO DA SILVA SANTOS

**Produção conjunta de 1,3-Propanodiol e 2,3-Butanodiol
por *Klebsiella pneumoniae* a partir de glicerina residual
proveniente da fabricação de biodiesel**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de conversão de biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata

Versão Original

Lorena-SP
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Santos, Rogério da Silva

Produção conjunta de 1,3-Propanodiol e 2,3-Butanodiol por *Klebsiella pneumoniae* a partir de glicerina residual proveniente da fabricação de biodiesel / Rogério da Silva Santos. – 2012.

132 p. : il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2012.

Orientador: Arnaldo Márcio Ramalho Prata

1. Biodiesel 2. Glicerol 3. *Klebsiella pneumoniae* 4. 2,3-Butanodiol
5. 1,3-Propanodiol. I. Título. II. Prata, Arnaldo Márcio Ramalho, orient.

620.95 - CDU

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que sem ele, jamais imaginaria ter chegado até aqui. Sua presença em minha vida me fortalece em sabedoria, paz e alegria.

Aos meus pais Lauro Teodoro dos Santos e Isabel Lemos da Silva dos Santos, por todo amor, carinho, paciência e dedicação.

Ao professor doutor Arnaldo Márcio Ramalho Prata pela oportunidade, paciência, dedicação e credibilidade depositada em mim ao longo desses anos de pós-graduação, que além de um orientador exemplar tornou-se um grande amigo.

Aos amigos do laboratório Ana, Júlia, Thaís, Marta, Thiago e Stephanie pela ajuda nas coletas e discussões do trabalho.

Aos funcionários e amigos Nicanor, Rita e Paulinho pela paciência, bom humor e orientações em diversas ocasiões.

A grande mulher e esposa, Évelin Gomes da Silva, que tem me dado suporte, e que me ajudou muito a encarar as dificuldades que a vida acadêmica nos proporciona. Muito obrigado pela paciência e companheirismo.

Enfim, um grande abraço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento desse estudo.

RESUMO

SANTOS, R.S. **Produção conjunta de 1,3-Propanodiol e 2,3-Butanodiol por *Klebsiella pneumoniae* a partir de glicerina residual proveniente da fabricação de biodiesel.** 2012.132 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.

Dentre as principais preocupações relacionadas à cadeia de produção do biodiesel está o excedente de glicerina bruta. Esta corresponde a cerca de 10% da massa total resultante do processo de produção do biodiesel e vem sendo acumulada e armazenada nas usinas, formando grandes estoques de resíduos e deixando diversas empresas diante de um passivo ambiental agravante. Uma forma de diminuir esse problema é utilizá-la para formulação de meios de fermentação para obtenção de produtos de interesse econômico. Exemplos são as produções de dióis como; 1,3-Propanodiol (1,3-PD) e 2,3-Butanodiol (2,3-BD). Estes são monômeros de grande aplicação no mercado, sendo o 1,3-PD usado para fabricação de poliuretanos, compostos cíclicos e novos tipos de poliésteres. O 2,3-BD é utilizado como anticongelante, biocombustível e como um importante aromatizante. Assim, no presente trabalho propõe-se valorizar a glicerina residual da fabricação de biodiesel, visando sua bioconversão em 2,3-BD e 1,3-PD, pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. Para tanto, a proposta deste trabalho compreendeu quatro etapas conjuntas: 1. Estabelecer um tratamento adequado para a glicerina residual de forma a permitir o crescimento bacteriano e formação dos dióis. 2. Adequar à composição do meio de fermentação, quanto às concentrações de glicerol, com suplementação de glicose, extrato de levedura e elementos traço Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} no processo fermentativo. 3. Definir a melhor condição de transferência de oxigênio em sistema descontínuo, associada à concentração de substrato, para a melhor formação de produtos. 4. Avaliar o procedimento de separação dos produtos do meio pela técnica de *salting-out*. Os estudos da etapa 1 e 2 foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL com 50 mL de meio. Na etapa 3, o estudo de aeração e agitação foi realizado em fermentador Bioflo III (New Brunswick Sci. Co.) de 1,25 L. Com os resultados obtidos, concluiu-se que o tratamento realizado foi adequado para o emprego da glicerina residual como fonte de carbono para o crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Além disso, os trabalhos realizados em frascos revelaram uma produção máxima, em agitação de 200 rpm, de 0,545 g/L.h de 2,3-BD e produção de 0,180 g/L.h de 1,3-PD em agitação de 160 rpm. Sendo que a glicose e o extrato de levedura tiveram efeitos positivos e significativos na produtividade de 2,3-BD e 1,3-PD. Nos ensaios onde foram utilizados maiores transferência de oxigênio observou-se decréscimos na produção de 1,3-PD e uma melhora significativa na produção de 2,3-BD. No estudo de recuperação dos dióis, foi possível recuperar 82% dos dióis utilizando carbonato de potássio 70% na temperatura de 20 °C e no tempo de reação de 6 horas.

Palavras-chave: Biodiesel. Glicerol. *Klebsiella pneumoniae*. 2,3-Butanodiol. 1,3-Propanodiol.

ABSTRACT

SANTOS, R.S. **Joint production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* from crude glycerine of the biodiesel production.** 2012.132 p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena / SP, 2012.

Among the main concerns related to the production of biodiesel is the surplus of crude glycerine. This corresponds to approximately 10% of the total mass of the biodiesel production process and has been accumulated and stored in the biodiesel plants, creating enormous amounts of waste and serious environmental problems. A way to lessen this problem is to use it for the formulation of fermentation medium to obtain products of economic interest. Examples are the production of diols such as, 1,3-propanediol (1,3-PD) and 2,3-butanediol (2,3-BD). These monomers are large market application, and the 1,3-PD used for the manufacture of polyurethanes, cyclic compounds and new types of polyesters. The 2,3-BD is used as antifreeze, biofuel and as an important flavoring. Thus, in present work aims to enrich the residual glycerine from biodiesel production to its bioconversion in 2,3-BD and 1,3-PD by bacterium *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. Therefore, the purpose of this consisted of four joint steps: 1st. Establish an appropriate treatment for residual glycerine to allow bacterial growth and diols formation. 2nd. To adapt the composition of fermentation medium, as concentrations of residual glycerine, with glucose supplementation, yeast extract and trace elements of Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} in the fermentation process. 3rd. Define the best condition of oxygen transfer in a batch system, associated with substrate concentration for the best product formation. 4th. To evaluate the separation procedure of products through the of *salting-out* technique. Studies of step 1 and 2 were conducted in 250 mL *Erlenmeyer* flasks with 50 mL medium. In step 3, the study aeration and agitation was performed in Bioflo III fermentor (New Brunswick Sci Co.) was 1,25 L. With the results, it was concluded that the treatment was adequate for use of residual glycerine as carbon source for growth of the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. Furthermore, the work carried out on bottles showed a maximum production 2,3-BD of 0.545 g/L.h in agitation of 200 rpm and production 1,3-PD of 0.180 g/Lh in agitation of 160 rpm. With glucose and yeast extract had positive and significant effects on productivity of 2,3-BD and 1,3-PD. For tests were used higher oxygen transfer observed decrease in the production of 1,3-PD and a significant improvement in the production of 2,3-BD. In the study of recovery of diols, it was possible to recover 82% of diols using 70% potassium carbonate at temperature of 20 °C and in reaction time of 6 hours.

Keywords: Biodiesel. Glycerol. *Klebsiella pneumoniae*. 2,3-Butanediol. 1,3-Propanediol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Reação global e reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos.....	18
Figura 2.2- Fluxograma da Destilação e Clareamento da Glicerina Fonte: GERVAJIO (2005).....	22
Figura 2.3- Esquema do Processo usando Trocadores Iônicos para produção de glicerina purificada. Fonte: GERVAJIO (2005).....	23
Figura 2.4- 2,3-Butanodiol e suas três formas isoméricas.....	27
Figura 2.5- Síntese química do 1,3-Propanodiol (A) Método Degussa iniciado com acroleína e (B) Método SHELL iniciado com óxido de etileno.....	28
Figura 2.6- Via metabólica mista representando a formação de 2,3-BD a partir de monossacarídeos sob condições aeróbias (Huang et al. 2011).....	34
Figura 2.7- Enzimas envolvidas na biossíntese do 2,3-BD e as vias anabólicas envolvidas na formação da isoleucina, valina e leucina, respectivamente.....	35
Figura 2.8- Rotas bioquímicas da fermentação do glicerol (BIEBL et al., 2009).	36
Figura 4.1- Etapa de decantação da glicerina residual da fabricação de biodiesel com óleo de algodão.....	47
Figura 4.2- Foto representativa dos ensaios realizados da primeira e segunda etapa do trabalho em incubadora de movimento circular (modelo INNOVA 4000).....	50
Figura 4.3- Ilustração representativa do efeito <i>salting-out</i> (UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON, 2012).....	54
Figura 5.1- Fase de decantação no tratamento da glicerina residual.....	59
Figura 5.2- Aspecto da glicerina antes e após o tratamento. Do lado esquerdo a glicerina bruta e do direito a glicerina tratada.....	61
Figura 5.3- Consumo de glicerol em meio contendo glicerina residual e glicerina PA ao final de 20 horas de fermentação por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	62
Figura 5.4- Concentração de glicerol em função do tempo para os ensaios com 20,0 g/L, 50,0 g/L e 80,0 g/L de substrato durante a fermentação por <i>K. pneumoniae</i>	63

- Figura 5.5-** Concentração final de células dos ensaios com a bactéria *K. pneumoniae* em meio correspondentes as três concentrações de glicerina inicial.....65
- Figura 5.6-** Variação da concentração celular da bactéria *Klebsiella pneumoniae* em 20,0 g/L, 50,0 g/L e 80 g/L de glicerol, proveniente da glicerina PA e residual tratada, na presença de 10% de glicose.....67
- Figura 5.7-** Concentrações finais de 1,3-PD em função da concentração de glicerol, com 20 horas de fermentação.....69
- Figura 5.8-** Concentrações finais de 2,3-BD em função da concentração de glicerol, com 20 horas de fermentação.....70
- Figura 5.9-** Concentrações de 1,3-PD em função do tempo, nas três concentrações de glicerol, durante a fermentação dos meios contendo glicerina PA e glicerina residual PA.....71
- Figura 5.10-** Concentrações de 2,3-BD em função do tempo, nas três concentrações de glicerol, durante a fermentação dos meios contendo glicerina PA e glicerina residual PA73
- Figura 5.11-** Concentração celular, de glicerol e de produtos em função tempo, obtidas durante os ensaios em que se empregou a agitação de 160 rpm.....76
- Figura 5.12-** Concentração celular, de glicerol e de produtos em função tempo, obtidas durante os ensaios em que se empregou a agitação de 180 rpm (ponto central).....78
- Figura 5.13-** Concentração celular, de glicerol e de produtos em função tempo, obtidas durante os ensaios em que se empregou a agitação de 200 rpm. (continua).....80
- Figura 5.14-** Superfície de resposta para produtividade volumétrica máxima de 2,3-BD em função das variáveis codificadas extrato de levedura e agitação.....89
- Figura 5.15-** Superfície de resposta para produtividade volumétrica máxima de 1,3-BD em função das variáveis codificadas elementos traços (metais) e agitação92
- Figura 5.16-** Concentrações de células, substrato e produtos em função do tempo, durante os ensaios de fermentação em sistema descontínuo.....97
- Figura 5.17-** Superfície de resposta para produtividade volumétrica máxima de 1,3-PD em função das variáveis codificadas k_La inicial (K) e da concentração de glicerina residual (G).102

- Figura 5.18**-Superfície de resposta para produtividade volumétrica máxima de 2,3-BD em função das variáveis codificadas k_La inicial (M) e da concentração de glicerina residual (N).....104
- Figura 5.19**-Superfície de resposta para recuperação dos dióis utilizando carbonato de potássio em função das variáveis codificadas Temperatura (B) e concentração do sal (C).....108
- Figura 5.20**-Superfície de resposta para recuperação dos dióis utilizando carbonato de sódio em função das variáveis codificadas Temperatura (B) e concentração do sal (C).....112

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1-	Espécies produtoras de 2,3-BD, tipo de isômeros, substratos e respectivos sistemas de produção.....	31
Tabela 2.2-	Espécies produtoras de 1,3-PD e respectivos sistemas de produção	33
Tabela 4.1-	Composição do meio empregado por Frazer e McCaskey (1989)...	47
Tabela 4.2-	Composição de meio adaptado de Liu et al. (2007).	48
Tabela 4.3-	Concentração dos sais empregados em 50 mL de meio de fermentação como fonte dos elementos traços, baseado em Qin et al. (2006).	49
Tabela 4.4-	Concentrações de glicerol e de glicose empregadas no estudo do efeito do co-substrato.	51
Tabela 4.5-	Valores reais e codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^3 completo.	51
Tabela 4.6 -	Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 completo.	52
Tabela 4.7-	Valores reais e codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^2 completo.	53
Tabela 4.8-	Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 completo.	53
Tabela 4.9-	Valores reais e codificados das variáveis analisadas no planejamento 2^3 completo para cada sal.....	54
Tabela 4.10-	Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 completo para cada sal.....	55
Tabela 5.1-	Concentração de glicerol da glicerina residual, após os tratamentos com ácido fosfórico.....	60
Tabela 5.2-	Concentrações de glicose durante as fermentações com <i>K. pneumoniae</i> em meio contendo glicerol e glicose, em diferentes concentrações.	64
Tabela 5.3-	Parâmetros fermentativos referentes as fermentações em meios contendo glicerina residual e glicerina PA.	67
Tabela 5.4 -	Parâmetros fermentativos quanto à produção de 1,3-PD e 2,3-BD em glicerina residual e glicerina PA.....	73
Tabela 5.5-	Concentrações de glicose durante a fermentação dos ensaios referente à matriz do planejamento fatorial 2^3 completo.....	81
Tabela 5.6-	Parâmetros fermentativos, fator de conversão de substrato em produto e fator de conversão de substrato em células em glicerina	

residual tratada com 10% de glicose, para todos os ensaios do planejamento fatorial 2^3 completo.	82
Tabela 5.7- Parâmetros fermentativos, velocidades específicas máximas de produtos, substrato e célula em glicerina residual tratada com 10% de glicose, para todos os ensaios do planejamento fatorial 2^3 completo.	83
Tabela 5.8- Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 completo e suas variáveis e respostas.	87
Tabela 5.9- Estimativas dos efeitos e suas contribuições no modelo proposto para 2,3-BD.	88
Tabela 5.10- Análise de variância dos fatores tempo, temperatura, concentração de sal e interações do modelo proposto na produção de 2,3-BD. ...	88
Tabela 5.11- Estimativas dos efeitos e suas contribuições no modelo proposto para a produtividade em 1,3-PD.	90
Tabela 5.12- Análise de variância dos fatores tempo, temperatura, concentração de sal e interações para o modelo proposto na produção de 1,3-PD.	91
Tabela 5.13- Condições iniciais de agitação e aeração correspondentes aos níveis de k_La inicial.	93
Tabela 5.14- Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo com os parâmetros fermentativos, fator de conversão de substrato em produto, fator de conversão de substrato em células, e produtividade em células, de 2,3-BD e 1,3-BD em glicerina residual tratado.	99
Tabela 5.15- Velocidades específicas máximas encontradas durante os ensaios fermentativos referentes a matriz do planejamento 2^2 completo. .	100
Tabela 5.16- Estimativas dos efeitos e suas contribuições no modelo proposto para 1,3-PD.	101
Tabela 5.17- Análise de variância dos fatores k_La (K) e concentração de glicerina residual (G) e interações para o modelo proposto na produção de 1,3-PD.	101
Tabela 5.18- Estimativas dos efeitos e suas contribuições no modelo proposto para 2,3-BD.	103
Tabela 5.19- Análise de variância dos fatores tempo, temperatura, concentração de sal e interações para o modelo proposto na produção de 2,3-BD.	103
Tabela 5.20- Matriz de planejamento fatorial utilizada com o sal carbonato de potássio.	105
Tabela 5.21- Estimativas dos efeitos e suas contribuições no modelo proposto.	106

Tabela 5.22- Análise de variância dos fatores tempo, temperatura, concentração de sal de K_2CO_3 e interações.....	107
Tabela 5.23- Matriz de planejamento fatorial utilizada com o sal carbonato de sódio	109
Tabela 5.24- Estimativa dos efeitos, erro puro e as contribuições de cada termo para o modelo.....	110
Tabela 5.25- Análise de variância dos fatores tempo, temperatura, concentração de sal de Na_2CO_3 e interações.	110

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 O biodiesel	17
2.2 O glicerol	19
2.3 Purificação da glicerina bruta	21
2.4 A conversão microbiana de glicerol	23
2.5 2,3-Butanodiol	26
2.6 1,3-Propanodiol.....	28
2.7 Micro-organismos produtores de 2,3-BD e 1,3-PD	30
2.8 Metabolismo de formação de 1,3-PD e 2,3-BD	33
2.9 Recuperação dos produtos	43
3. OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Matéria prima	46
4.2 Micro-organismo	47
4.3 Inóculo.....	48
4.4 Condições de fermentação	49
4.4.1 Meios de fermentação.....	49
4.4.2 Condições de cultivo	49
4.5 Sequência experimental.....	50
4.5.1 Estudo do efeito da concentração da glicerina com co-substrato	50
4.5.2 Avaliação da necessidade de adição de extrato de levedura, de elementos traços e a influência da agitação.....	51
4.5.3 Estudo da transferência de oxigênio e da concentração de glicerina inicial.....	52
4.5.4 Recuperação dos dióis.....	54
4.6 Métodos analíticos	55
4.6.1 Concentração de substrato e produtos da fermentação	55
4.6.2 Densidade da glicerina.....	56
4.6.3 Concentração celular	56
4.7 Forma de análise dos resultados	56

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Tratamento da glicerina residual.....	59
5.2 Estudo do efeito da concentração de glicerol e do uso de glicose como co-substrato	61
5.3. Avaliação da agitação e da necessidade de adição de extrato de levedura e elementos traços	75
5.4. Avaliação da transferência de oxigênio e da concentração inicial de substrato	93
5.5 - Recuperação dos dióis	105
6. CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS	115

1. INTRODUÇÃO

A comunidade científica vem se preocupando há bastante tempo com o aquecimento global e suas consequências em relação a nosso clima. O motivo principal para o surgimento destas mudanças climáticas é o consumo desenfreado de fontes não renováveis de energia, principalmente de combustíveis fósseis. Assim, diversos grupos de pesquisa no mundo estão motivados a buscar novas formas de energias renováveis que possam gerar menos resíduos e um menor impacto negativo no meio ambiente.

A busca por fontes alternativas de energias renováveis, assegurando um desenvolvimento sustentável, levou o Brasil a adotar o biodiesel em sua matriz energética. Hoje, o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2010, de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada, nesse mesmo ano, para cerca de 5,8 bilhões de litros. De maneira geral, para cada litro de biodiesel são produzidos cem mililitros de glicerina residual. Portanto, percebe-se um grande excedente de glicerina, denominada pelo mercado como uma “uma bolha de glicerina” criada no Brasil, pois esta não é totalmente absorvida pelo mercado.

O glicerol é considerado uma fonte de carbono facilmente assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbias e anaeróbias para a obtenção de energia metabólica. A sua conversão por micro-organismos em produtos de maior valor agregado constitui uma alternativa potencial para o aproveitamento desse resíduo. Assim, a produção de 2,3-Butanodiol (2,3-BD) e 1,3-Propanodiol (1,3-PD) por processos fermentativos pode ser justificada pela demanda destes compostos no mercado nacional e internacional em função de sua aplicabilidade como intermediário químico. Vários processos biotecnológicos estão sendo estudados com a finalidade de produzir 2,3-BD e 1,3-PD como compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos e 2,3-BD para combustíveis.

Dentro deste contexto, o presente trabalho avalia o potencial da glicerina residual para a produção de 2,3-BD e 1,3-PD por *Klebsiella pneumoniae*. Para isto, o trabalho foi dividido em quatro etapas experimentais, sendo as três primeiras envolvendo processos fermentativos e quarta etapa envolvendo o processo de separação dos dióis do meio fermentado

Na primeira etapa visou-se estabelecer um tratamento adequado para a glicerina residual de forma a permitir o crescimento da bactéria e a respectiva conversão desta fonte de carbono nos referidos dióis. Já na segunda etapa foi realizado um estudo para definição do meio de fermentação formulado com a glicerina residual tratada, avaliando-se concentrações de glicerina residual, extrato de levedura e elementos traço. Na terceira etapa, os ensaios fermentativos foram estudados sob condições de transferência de oxigênio, em biorreator, variando-se a concentração de substrato, em sistema descontínuo. Por fim, na quarta etapa foi realizado um estudo visando à recuperação de 1,3-PD e de 2,3-BD do meio fermentado pela técnica *salting-out*.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo contribuir com novas alternativas para produção de 1,3-PD e 2,3-BD sob o ponto de vista de redução de custos do meio de cultura, além de contribuir com a redução de passivo ambiental oriundo do excesso de glicerina residual provenientes das usinas de biodiesel. Ao mesmo tempo, o estudo permitiu estabelecer parâmetros de processo que permitam a produção simultânea de 1,3-PD e 2,3-BD de meio fermentado utilizando a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. E por fim, estudos com sais de carbonato permitiram identificar o melhor sal de carbonato para separação dos dióis do meio fermentado, assim como a temperatura e o tempo de reação deste sal com o meio fermentado.

O presente trabalho se insere no programa de pesquisa do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), que tem como um dos objetivos o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento de matérias-primas residuárias, especialmente os resíduos agro-industriais visando à produção de insumos por via biotecnológica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O biodiesel

As buscas por fontes alternativas de energia vem sendo intensificadas e estudadas de forma significativa em todo mundo. A crise mundial econômica, o elevado preço do petróleo e a pressão da sociedade para um desenvolvimento sustentável têm estimulado empresas por todo o mundo a empregar processos que produzam energia limpa a partir de recursos renováveis. O biodiesel e o bioetanol apresentam-se como alternativas mais viáveis como fontes não convencionais de energia (COELHO et al., 2009). O biodiesel se apresenta como uma extraordinária alternativa para o desenvolvimento em países de economia emergente como o Brasil. Uma vez que é um combustível derivado de fontes renováveis, de menor custo de produção quando comparado aos combustíveis fósseis, auxilia a criação de novas empresas e, assim, mais postos de trabalho. Além disso, ajuda o desenvolvimento tecnológico local (BILGEN et al., 2008).

Segundo Ramos et al. (2000), o biodiesel é definido como um mono alquil éster de ácidos graxos derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais e gordura animal, obtido por um processo de transesterificação, no qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos (Figura 2.1). Encontra-se registrado na Environment Protection Agency–EPA–USA como combustível e aditivo para combustíveis, podendo ser usado puro (B100), em mistura (B20 ou 20%) ou como aditivo (B1, B2,... B5). Outros processos têm sido considerados para alterar as propriedades físicas dos óleos vegetais. Pode se citar a diluição, micro-emulsão com álcool e o craqueamento catalítico. Ainda assim, o processo de transesterificação tem se apresentado como a melhor opção, pela sua simplicidade. A produção comercial do biodiesel consiste em reagir óleo de origem animal ou vegetal (soja, milho, girassol e mamona, entre outros) com um álcool de cadeia curta livre de água (metanol ou etanol) na presença de catalisadores tais como hidróxido de sódio, metilato de sódio, hidróxido de potássio ou metilato de potássio, obtendo-se o biodiesel e a glicerina como subproduto (TURCHIELLO, 2005).

Figura 2.1-Reação global e reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos.

No Brasil, a produção e comercialização de biodiesel possuem importantes vantagens devido à disponibilidade de terras cultiváveis. Além disso, podem ser cultivadas dezenas de espécies vegetais oleaginosas como, por exemplo, o girassol, o pinhão-mansão, o algodão, a mamona, a soja e a canola, entre outras. Destacam-se a mamona e o girassol devido ao fato de se desenvolverem até mesmo em solos menos produtivos, com um baixo custo de produção. A topografia brasileira também favorece a mecanização, que, aliada com a disponibilidade de água, o clima e os processos agrícolas industriais já desenvolvidos e conhecidos pela sua eficiência, permitem a produção de até duas safras ao ano (BIODIESELBR, 2007a).

O planejamento para a produção de biodiesel no Brasil está adiantada, uma vez que o governo federal estabeleceu a obrigatoriedade da sua adição ao combustível de petróleo mediante a lei 11097/2005 (BIODIESELBR, 2007b). O sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) é

expressivo e está significativamente acelerado, já que houve a antecipação do ano de 2013 para 2010 com a adição de 5% de biodiesel em todo o diesel consumido no país. As perspectivas são de chegar até 10% de mistura em 2014 e em 20% em 2020 alcançar 20%, a exemplo do que prevê a Europa para seus países, além de Argentina e Colômbia, na América Latina (GLOBORURAL, 2011).

Dentre as principais preocupações existentes na cadeia do biodiesel está o excedente de glicerina bruta gerado pela sua produção. A glicerina corresponde a cerca de 10% da massa total resultante do processo de produção do biodiesel. Desde 2007, este vem sendo armazenado e acumulado em usinas de produção, formando grandes estoques, deixando o país diante de um passivo ambiental gerado a partir do biodiesel. Existe uma série de incertezas relacionadas à destinação da glicerina, tanto por parte dos empresários, quanto dos pesquisadores. Assim, pesquisas são desenvolvidas com a finalidade de encontrar o melhor destino para a glicerina que vem se acumulando mundialmente como resultado do aumento na produção do biodiesel (GONÇALVES et al., 2006; BIODIESELBR, 2007).

2.2 O glicerol

O glicerol é classificado, segundo a IUPAC, como 1,2,3-Propanotriol. É comum na sua forma comercial, com 95% de pureza, ser chamado de glicerina.

O glicerol caracteriza-se por ser um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool em todas as proporções, pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano, e insolúvel em hidrocarbonetos. É higroscópico, inodoro e seu teor máximo de água chega a 0,5% (KIRKOTHEMER, 2007).

A glicerina é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, correspondendo a aproximadamente 10% do volume produzido. Atualmente, com a adição de 5% de biocombustível ao óleo diesel no Brasil, são produzidos 2,6 milhões de toneladas de biodiesel por ano. Em média, deste total, 10% são de glicerina bruta (BIOENERGIA, 2011).

A glicerina bruta obtida a partir da reação de transesterificação para formação de biodiesel apresenta impurezas que podem chegar a 20% de toda massa, tais como: água residual, catalisador (alcalino ou ácido), álcool residual, impurezas dos reagentes, ésteres, dióis, monoésteres, oligômeros de glicerina e

polímeros (MOTA et. al. 2009) Essas impurezas podem variar em função do óleo vegetal utilizado, que possui influência tanto das condições edafoclimáticas quanto do tipo oleaginosa cultivada(FERRARI et al., 2005; OOI et al., 2004).

O preço médio da glicerina bruta, que em 2005 chegou a R\$ 3,00 o quilo, no final de 2007 já estava entre R\$ 1,60 e R\$ 1,70. Nas regiões onde operam usinas de biodiesel, o valor médio em 2011 caiu para R\$ 0,20 e R\$ 0,30 o quilo. Atualmente o quilograma da glicerina bruta está cotado próximo a R\$ 0,10 sendo a glicerina farmacêutica (99,5%) próximo de R\$ 500,00. Este baixo valor é atribuído ao conteúdo de altos teores de impurezas e ao grande volume deste produto gerado pelas indústrias. Com a queda do preço da glicerina, em função de seu excedente, é possível que este venha a tomar o mercado do sorbitol pois ela apresenta as mesmas propriedades. Atualmente, o sorbitol é utilizado como umectante e para conservar bebidas e alimentos, tais como: refrigerantes, balas, bolos, pastas de queijo ou carne e ração animal seca (SIGMA ALDRICK, 2012; BIOENERGIA, 2011; BIODIESELBR, 2007).

Para tornar o glicerina residual em produto puro são necessários processos para sua purificação que incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para a remoção, principalmente do potássio, e do sódio, utilizados como catalisadores. No entanto, os tratamentos de purificação são de custos excessivamente elevados para os pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerina poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando, conseqüentemente, os problemas e riscos ambientais (YONG et al., 2001). Com o excedente extremamente elevado de glicerina, a indústria de biodiesel pode agregar valores na matriz industrial com a venda dos subprodutos ou sua utilização para a síntese de moléculas de alto valor agregado, como por exemplo a produção de 2,3-BD e 1,3-PD por processo fermentativo, objeto de estudo nesse trabalho. Portanto, é interessante a busca pela purificação da glicerina ou pelo seu reaproveitamento direto, sem tratamento, o que proporcionaria uma maior viabilidade econômica do processo de produção de biodiesel, permitindo que este se torne ainda mais competitivo no crescente mercado de biocombustíveis (RIVALDI et al., 2007).

2.3 Purificação da glicerina bruta

A purificação da glicerina bruta é considerada um processo complexo e oneroso para que essa matéria prima alcance as exigências em grau de pureza necessárias para sua utilização em cosméticos, produtos químicos, alimentícios e farmacêuticos. Desta forma, a tecnologia exigida para a purificação, além de ter um custo elevado, é pouco dominada (PASTORI, 2010).

O método tradicional de purificação consiste na adição de solução ácida à glicerina bruta até um pH 4 ou 4,5, para eliminar sabões e outras impurezas orgânicas, seguida de filtração dos ácidos graxos formados. O filtrado é neutralizado com NaOH até pH 6,5. Após esse tratamento a glicerina bruta contém ainda alguns compostos como: glicerol, água, NaCl, metanol ou etanol e resíduos de outras matérias orgânicas.. O aquecido a 65 °C permite a evaporação da água, do metanol ou etanol (RIVALDI et al., 2007; OPPE; SALVAGNINI; TAQUEDA, 2007).

A evaporação é uma operação que depende de consumo energético, geralmente elevado, efetuada quase sempre em evaporadores de múltiplos efeitos, utilizando baixas pressões. Durante a evaporação da água concentram-se o glicerol e o sal. Deve-se ter o cuidado para remover o sal que se cristaliza e este precisa ser continuamente removido. O sal restante dissolvido na glicerina concentrada é sedimentado em tanques cônicos por um período de seis horas. A glicerina sobrenadante é armazenada e pode ser vendida como glicerina de grau técnico (OPPE; SALVAGNINI; TAQUEDA, 2007). Todo o esquema do processo convencional pode ser visualizado na Figura 2.2.

Para obter uma glicerina com grau USP (pureza acima de 99%), efetua-se o refino desta por meio de destilação. A glicerina é destilada sob vácuo de 0,600-1,330 kPa absoluto e injeta-se vapor d'água durante a destilação para manter a temperatura abaixo dos 200°C. Este procedimento é realizado para prevenir a polimerização e a decomposição da glicerina, que se inicia a 204 °C. Uma condensação controlada do vapor separa a glicerina do vapor d'água. A glicerina condensada, com até 99% de pureza sofre desodorização por sopro de vapor, em um vaso sob alto vácuo, sendo finalmente clareada com carvão ativado e filtrada para se obter glicerina acima de 99,5% de pureza (MANCIONILA, 2009).

Figura 2.2-Fluxograma da Destilação e Clareamento da Glicerina Fonte: GERVAJIO (2005).

Atualmente, a purificação da glicerina por troca iônica está recebendo grande aceitação devido à simplicidade das operações (Figura 2.3), o baixo consumo de energia e a disponibilidade das resinas de troca iônica adequadas para o processo. Com este método é possível obter a glicerina refinada isenta de sais. O tratamento da glicerina bruta é similar ao processo convencional até a obtenção do filtrado neutralizado. Em seguida, é feita a purificação por troca iônica que consiste na passagem de material pré-filtrado por sucessivos leitos de resinas (OPPE; SALVAGNINI; TAQUEDA, 2007). Com a passagem do material através do leito de resinas, eliminam-se ácidos graxos livres residuais, cor, odor e impurezas minerais presentes. A concentração final da solução purificada de glicerina é feita pela evaporação simples e também com o uso de evaporadores de múltiplo efeito, de modo a se obter uma glicerina com pureza de aproximadamente 99%. A descoloração final é realizada pela passagem da glicerina tratada através do leito de carvão ativado seguido por filtração. O produto final é uma glicerina de grau farmacêutico (GERVAJIO, 2005).

Figura 2.3-Esquema do Processo usando Trocadores Iônicos para produção de glicerina purificada. Fonte: GERVAJIO (2005).

Já na purificação do glicerol utilizando resinas de troca iônica, as mesmas devem ser ativadas e regeneradas por um ácido diluído (sulfúrico ou clorídrico) que carrega a resina com o H^+ . O sódio, assim como outros cátions como cálcio, magnésio e ferro são similarmente removidos com a troca pelo íon hidrogênio sobre o grupo sulfônico da resina. As resinas de troca iônica utilizadas nesse processo, em sua maioria, são feitas de aminas alifáticas e fenol com formaldeído sendo que tem alta capacidade de remoção de cor das soluções de glicerina (GERVAJIO, 2005).

2.4 A conversão microbiana de glicerol

A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado, como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (ITO et al., 2005). Nos micro-organismos eucarióticos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos (WANG et al., 2001). Já em humanos, este participa na termo regulação do corpo, na resistência a altas temperaturas, na resistência dos músculos em atividades físicas e na resposta neural da variação da glicemia (YANG et al., 1999).

O glicerol recuperado de processos de produção de biodiesel e parcialmente livre de impurezas pode ser utilizado como substrato por várias espécies de micro-organismos. As características físicas, químicas e nutricionais da glicerina bruta dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel. A glicerina bruta contém elementos nutricionais, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que são factíveis de serem utilizados por micro-organismos para o seu crescimento em processos fermentativos (THOMPSON; HE, 2006). Também é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbia e anaeróbia para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (DILLIS et al., 1980).

Vários estudos foram desenvolvidos visando a utilização de glicerol como fonte de carbono por micro-organismos, especialmente por bactérias. Muitos estão voltados, principalmente, em estudos de mecanismos de assimilação de glicerol para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (PAPANIKOLAOU et al., 2002; CHENG et al 2007).

O transporte do glicerol através da membrana celular constitui a primeira etapa para o seu metabolismo. De uma forma geral, a assimilação de glicerol por parte dos micro-organismos envolve os transportes passivo e ativo (LAGES; SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999) através da membrana plasmática. O transporte passivo inclui a difusão simples (permeação não específica) e a difusão facilitada mediada por proteínas localizadas nas camadas mais internas da membrana plasmática, as permeases. A difusão simples, sendo ATP não dependente, requer um gradiente de concentração para o transporte do substrato através da membrana. Consequentemente, a concentração do substrato no interior da célula sempre é inferior à aquela encontrada no meio de cultura (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estudos mostraram a existência de permeases FPS1, específicas para transporte de glicerol. O glicerol é um dos poucos substratos que atravessam a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas. Em bactérias como *Escherichia coli*, a proteína do tipo poro-canal-G1pF atua por sensibilidade mecânica sem gasto energético, na presença

de glicerol. Este facilitador permite a assimilação, além de glicerol, de pequenas moléculas de polihidroxiálcoois, ureia e glicina, mas exclui moléculas carregadas como gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxia-cetona fosfato (LUYTEN et al., 1995; HOLST et al., 2000). Quanto aos mecanismos genéticos, foram descritos três genes responsáveis pela assimilação e regulação do conteúdo intercelular de glicerol em *Saccharomyces cerevisiae*, o *gup1* e *gup2* (HOLST et al., 2000) e *fps1* (associados diretamente ao transporte facilitado e que são expressos conforme estímulos provocados nas células, como o estresse osmótico).

Por outro lado, mecanismos de transporte ativo simporte glicerol/H⁺ e simporte glicerol/Na⁺ (dependentes de ATP) foram descritos em numerosas espécies de leveduras, entre elas *Debaryomyces hansenii*, *Pichia sorbitophila*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* (LAGES; SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999). Tanto o acúmulo de glicerol por estresse, como a existência de mecanismos ativos, são comuns numa grande variedade de leveduras (LAGES; LUCAS, 1997). Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática o glicerol pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas independentes. Uma das rotas, provavelmente a principal para a oxidação de glicerol, consiste na fosforilação do glicerol pela enzima glicerol-quinase para formar glicerol-3-fosfato, que é reduzido a dihidroxiacetona fosfato pela enzima mitocondrial glicerol fosfo-ubiquinona oxidoredutase dependente de FAD (GANCEDO; SERRANO, 1989).

Estudos demonstraram que os genes que controlam a síntese das enzimas glicerol-quinase e fosfo-ubiquinona oxidoredutase são *gut1* e *gut2*, respectivamente (GRAUSLUND; LOPES; RONNOW, 1999). A síntese dessas enzimas é reprimida durante o crescimento celular em substratos fermentescíveis como glicose, mas desregulado quando o glicerol ou o etanol é utilizado como principal fonte de carbono (GRAUSLUND; RONNOW, 2000).

A dihidroxiacetona fosfato é considerada uma importante molécula intermediária para a gliconeogênese (síntese de hexoses), assim como para a obtenção de numerosos compostos através das vias oxidativas, incluindo ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, etanol e outros compostos de interesse comercial. Portanto, outra possível via catabólica do glicerol corresponde à sua oxidação e consequente formação de dihidroxiacetona pela enzima glicerol dehidrogenase. A dihidroxiacetona é fosforilada à

dihidroxiacetona fosfato pela enzima dihidroxiacetona quinase, dependente de Adenosina Trifosfato (ATP).

O crescimento de micro-organismos em fontes de carbono alternativas aos carboidratos, como L-malato, acetato ou glicerol, requer a capacidade de sintetizar hexoses necessárias para a produção de mucopeptídeos da parede celular, armazenagem de glicogênio e outros compostos derivados de hexoses, como as pentoses, envolvidos na biossíntese de ácidos nucleicos (MOAT, FOSTER, SPECTOR, 2002). Além disso, Greenfield e Claus (1969) fazem referência à capacidade de algumas bactérias, entre elas *Acetobacter suboxydans*, de oxidar a molécula de dihidroxiacetona fosfato pela via pentose-fosfato, incrementando o número de bioprodutos possíveis de serem obtidos por via biotecnológica a partir de glicerol. Em espécies de leveduras do gênero *Yarrowia sp.*, e em bactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* e *Bacillus welchii* (ZHAO, CHEN, YAO, 2006; CHENG et al., 2007) observa-se que, sob condições de anaerobiose, o glicerol sofre desidratação pela enzima glicerol desidratase para produzir 3-dihidroxi propionaldeído. Posteriormente, este intermediário é transformado pela enzima NADH dependente 1,3-Propanodiol oxido-reductase para gerar 1,3-Propanodiol, principal intermediário para produção de polímeros, resinas e aditivos de importantes aplicações industriais (GONZÁLEZ, PAJUELO et al., 2006; CHENG et al., 2007). Uma vez que o glicerol é assimilado no interior da célula, numerosos compostos são produzidos como consequência do seu metabolismo.

2.5 2,3-Butanodiol

O 2,3-Butanodiol (2,3-BD), um líquido incolor e inodoro, também conhecido como 2,3-Butilenoglicol, 2,3-Dihidroxibutano e dimetileno glicol, principal produto da fermentação butileno-glicólica, é considerado um composto de grande interesse econômico. Apresenta massa molecular de 90,121 g/mol e pode existir na forma de três isômeros (Figura 2.4) ;D-(-)-, L-(+)- e meso-. Dextro- [L-(+)-] e o levo- [D-(-)-] são as formas opticamente ativas e a meso- a forma opticamente inativa

(CELINSKA; GRAJEK , 2009).

Figura 2.4-2,3-Butanodiol e suas três formas isoméricas.

O 2,3-Butanodiol tem um ponto de ebulição entre 177 °C e 180 °C, dependendo do seu isômero. O isômero leve possui baixo ponto de congelamento em (-60 °C), o que justifica o seu uso comercial como anticongelante (MAGEE; KOSARIC, 1987). O 2,3-BD, juntamente com a acetoína, é considerado uns dos sub-produtos da fermentação mais abundantes no vinho. Geralmente, este aromatizante não afeta as qualidades sensoriais das bebidas alcoólicas, mas em elevadas concentrações pode modificar o “bouquet” e o corpo do vinho, devido a seu gosto levemente amargo e sua viscosidade. Na indústria de alimentos, a desidrogenação catalítica do 2,3-BD produz diacetil, aromatizante presente em diversos produtos (ROMANO et al., 1998). Pode também ser utilizado como combustível líquido, uma vez que possui um calor de combustão (27.200 kJ/kg) maior que do metanol (22.100 kJ/kg) e próximo ao do etanol (29.100 kJ/kg) (VOLOCH et al., 1985).

Além dessas, várias outras aplicações para o 2,3-BD são citadas na literatura. Uma característica muito importante desse solvente é a sua grande potencialidade como intermediário químico, principalmente em substituição a derivados do petróleo. Este é um composto biodegradável, sendo que a bactéria *Klebsiella pneumonia* é capaz de produzi-lo e também de consumi-lo. Essa biodegradabilidade demonstra que o 2,3-BD pode ser empregado como um solvente ou agente de ligação para a produção de tintas e polímeros, os quais não agredem o meio ambiente (CELINSKA; GRAJEK, 2009; AFSCHAR et al., 1993).

O início da produção fermentativa do 2,3-BD se deu em razão da necessidade de obtenção do 1,3-Butadieno para fabricação da borracha sintética na época da Segunda Guerra Mundial. A Alemanha produzia por via sintética e na

escassez de petróleo foi forçada a desenvolver um novo processo industrial (LUERCE, 2002).

2.6 1,3-Propanodiol

O 1,3-Propanodiol (1,3-PD) é um composto intermediário da síntese de compostos cíclicos e monômeros para poliésteres, poliuretanos e polipropileno tereftalato. Sabe-se que os processos químicos tradicionais de produção são altamente nocivos devido aos compostos tóxicos formados. Atualmente, o 1,3-PD é produzido quase exclusivamente pela empresa SHELLTM a partir de um derivado do petróleo, o óxido de propileno (Figura 2.5 B), e pela DUPONTTM, ambas nos EUA, mediante a acroleína por processo Degussa (Figura 2.5 A). A seguir podem ser identificadas as reações em ambos os processos utilizados para produção deste composto (CHENG, 2007; XIU et al., 2007).

Figura 2.5- Síntese química do 1,3-Propanodiol (A) Método Degussa iniciado com acroleína e (B) Método SHELL iniciado com óxido de etileno.

O 1,3-PD caracteriza-se como um produto químico especial devido às suas aplicações, e nos dias atuais representa também como uma *commodity* química (SHELDON et al., 2007). Nos últimos anos, os avanços tecnológicos na preparação de 1,3-PD resultaram em preços mais baixos no mercado, atualmente em US\$ 1,76 o quilo. O mercado desse composto em 2008 já ultrapassava mais de 45 mil toneladas (KRAUS, 2008).

O campo de aplicação desse composto é abrangente, atingindo diferentes setores comerciais, desde a produção de polímeros, tintas, resinas de poliéster, lubrificantes e anticongelante, até a produção de cosméticos. O 1,3-PD também pode ser aplicado em polímeros encontrados em vidros e coletes à prova de bala, baseado em uma família de materiais transparentes, cuja composição pode ser adaptada para melhorar propriedades tais como: transparência, resistência ao impacto e estabilidade a raios UV. As propriedades únicas desses copolímeros decorrem da combinação de 2,2,4,4-Tetrametil-1,3-Ciclobutanodiol com 1,3-PD e Dimetil Tereftalato. Este polímero pode ser utilizado em óculos resistente ao impacto, lentes, facilita a furação de vidro e na produção de vidro balístico de arquitetura. O 1,3-PD também apresenta uma aplicação importante na indústria como intermediário para produção de biocida, por exemplo o PCT 3015, que é um pesticida de baixo custo e alto desempenho de uso geral em monoculturas. Além disso, o 2-Bromo-2-Nitro-1,3-Propanodiol é utilizado como um biocida industrial para a prevenção de incrustações biológicas em áreas como a de recirculação de água de resfriamento (SAXENA et al., 2009).

Recentes aplicações do 1,3-PD, como monômero de poliéster e plásticos biodegradáveis, tem levado a uma forte necessidade do mercado para a produção deste químico a granel e de preferência por via biológica. A principal vantagem deste poliéster biodegradável, em comparação a outros poliésteres biodegradáveis obtidos a partir de fontes renováveis, é a possibilidade de suas propriedades físicas poderem ser facilmente modificadas para atender às especificações de fabricação do plástico final. A produção por processo fermentativo de 1,3-PD em escala industrial encontra-se limitada devido à maioria dos micro-organismos produtores (*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium* *Propionibacterium* e *Anaerobiospirillum*) serem considerados patogênicos e requerem condições estritas de anaerobiose e nutrientes específicos para seu desenvolvimento. Uma solução futura para aumento de escala consistiria na utilização de ferramentas da engenharia genética para inserir genes que expressem enzimas formadoras de 1,3-PD em micro-organismos mais adaptados às condições industriais, como, por exemplo, a bactéria *Escherichia coli* (GONZALEZ-PAJUELO et al., 2006).

2.7 Micro-organismos produtores de 2,3-BD e 1,3-PD

Várias espécies microbianas são capazes de sintetizar 2,3-BD e 1,3-PD como produto final da fermentação, mas poucas espécies podem ser consideradas produtoras de quantidades significativas destes compostos industrialmente. Espécies do gênero *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Serratia* são notáveis produtoras de 2,3-BD. Até o momento, *Klebsiella pneumoniae* e *Paenibacillus polymyxa* apresentam-se como as principais espécies para produção industrial de 2,3-BD. As espécies *Enterobacter aerogenes* e *Serratia marcescens* são consideradas espécies promissoras para produção de 2,3-BD (Huang et al., 2011).

Importante citar que diferentes micro-organismos produzem diferentes estereoisômeros, mas é comum a formação dos dois isômeros durante a fermentação. As bactérias *Klebsiella sp.* (*K. pneumoniae* ou *K. oxytoca*) e *P. polymyxa* demonstram ser potencialmente aplicáveis para a produção de 2,3-BD, sendo que as vantagens e desvantagens devem ser analisadas com cuidado e para cada tipo de processo empregado (JI; HUANG; OUYANG, 2011). Outro aspecto importante é que *Klebsiella sp* comumente produz duas vezes mais 2,3-BD que a *P. polymyxa*. A grande vantagem dessa espécie é sua facilidade de ser cultivada, crescendo rapidamente em meios simples e metabolizando todos os açúcares presentes em hidrolisados de celulose ou hemicelulose (CHANDEL et al., 2010; KOSARIC et al., 1990). Entretanto, sua patogenicidade, devido ao encapsulamento, deve ser analisada, pois pode ocasionar infecções graves, o que é geralmente considerado um obstáculo a ser ultrapassado para o seu uso em produção industrial (MAGEE; KOSARIC, 1987).

A maioria das pesquisas sobre a fermentação butileno-glicólica utiliza *Klebsiella pneumoniae* como agente fermentador (WANG et al. 2010; MA et al. 2009., QIN et al. 2006; PRATA; GARCIA, 2004). As principais características dessa bactéria, citadas por Huang et al. (2011), são a estabilidade genética, evitando problemas de degeneração por sucessivas repicagens, a flexibilidade quanto à utilização de substratos para a fermentação e a ausência de problemas de inibição pelo produto formado, permitindo obter concentrações de 2,3-BD na ordem 92 g/L (QIN et al., 2006) e até 150,0 g/L (MA et al., 2009) no meio de fermentação, utilizando batelada alimentada. A capacidade da *Klebsiella*

pneumoniae de utilizar diferentes açúcares para a fermentação faz com que essa espécie, principalmente a cepa NRLL B-199, seja a mais utilizada em estudos de fermentação de melaço de milho (WANG et al., 2010), glicose (WANG et al., 2010; MA et al., 2009; QIN et al., 2006), talos de alcachofra (LI et al., 2010), hidrolisados celulósicos (YU et al., 1984), hemicelulósicos (SADDLER et al., 1983; ROSSI et al., 2006) e amiláceos (WANG et al., 2010). Os pesquisadores Eiteman e Miller (1995) observaram que a bactéria *Klebsiella pneumoniae* é também capaz de metabolizar o ácido succínico e produzir 2,3-Butanodiol a partir do mesmo.

Na Tabela 2.1 são apresentadas as cepas mais utilizadas nas pesquisas envolvendo a produção de 2,3-BD e suas respectivas formas de produção e substratos usados.

Tabela 2.1- Espécies produtoras de 2,3-BD, tipo de isômeros, substratos e respectivos sistemas de produção.

Espécie	Isômeros	Substrato	Sistema	Referência
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Glicose	Batelada alim.	Ma et al. (2009)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Glicose	Batelada alim.	Qin et al. (2006)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Melaço de milho	Batelada alim.	Wang et al. (2010)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Talos de alcachofra	Batelada alim. SSF	Li et al. (2010)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Hidrolisado de milho	Batelada alim	Cheng et al.(2010)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Glicose	Batelada alim	Ji et al. (2010)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Sabugo de milho	Batelada SSF	Cao et al. (1997)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Glicose	Batelada alim	Zeng et al. (1991)
<i>Serratia marcescens</i>	meso-	Sacarose	Batelada alim	Zhang et al. (2010)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	D-(-)-	Tubérculo de alcachofra	Batelada	Gao et al. (2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	D-(-)-(3),meso-(2)	Glicose	Batelada	Moes et al.(1985)
<i>Bacillus licheniformis</i>	D-(-)-, meso-	Glicose	Frascos sem agitação	Nilegaonkar et al.(1992)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	D-(-)-, meso-	Glicose	Batelada	Alam et al. (1990)

Adaptado de Huang et al. (2011)

Conhecidas como produtoras naturais de 1,3-PD a partir de glicerol estão as bactérias dos gêneros *Klebsiella* (HUANG; GONG; GTHUANG, 2002; NEMETH et al., 2003; YANG et al., 2007), *Clostridium* (MALAOU; MARCZAK, 2001; RAYNAUD et al., 2003); *Citrobacter* (BARBIRATO et al., 1998; SEIFERTET al., 2001) e *Enterobacter* (BARBIRATO et al., 1998; ZHU et al., 2002). Também fazem parte desse grupo várias espécies do gênero *Clostridium*, como a não patogênica *Clostridium butyricum* (PAPANIKOLAOU et al., 2000; PAPANIKOLAOU et al., 2008) e *C. pasteurianum* (BIEBL, 2001), que crescem em glicerol e produzem 1,3-PD.

Bactérias como *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii* são consideradas anaeróbias facultativas e se desenvolvem de forma simples em diversos meios de fermentação e por serem, elas são potencialmente patogênicas e requerem a atenção especial à segurança durante seu crescimento. Ao longo do tempo, além da bactéria *K. pneumoniae*, outras espécies do mesmo gênero vêm sendo também exploradas em pesquisas envolvendo o 1,3-PD, como a bactéria *K. oxytoca* (YANG et al., 2007).

Dentre os micro-organismos citados, *C. butyricum* e *K. pneumoniae* são considerados os melhores produtores naturais de 1,3-PD e recebem maior atenção devido à sua tolerância a altas concentrações de substrato, ótimo rendimento e produtividade. Poucas pesquisas são encontradas envolvendo *Enterobacter agglomerans*, *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. reuteri*, que são citados por Casali (2011) como potenciais produtores de 1,3-PD usando glicerol.

Bactérias do gênero *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Clostridium* normalmente produzem 1,3-PD a partir do glicerol via dihidroxiacetona, dihidroxiacetona fosfato e piruvato.

A maioria das pesquisas envolvendo a produção de 1,3-PD por bactérias utiliza células livres em processo descontínuo. Porém, alguns trabalhos mostram uma grande melhoria na produtividade quando usado o processo descontínuo alimentado (ZHENG et al., 2008).

Na Tabela 2.2 estão as espécies e alguns dos processos mais estudados para a produção de 1,3-PD.

Tabela 2.2- Espécies produtoras de 1,3-PD e respectivos sistemas de produção

Cepas	Sistema	Referência
<i>K. pneumoniae</i> M 5a1	Batelada alim.	Cheng et al. (2007)
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Batelada alim.	Mu et al. (2006)
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Batelada alim.	Liu et al. (2007)
<i>K. oxytoca</i> LDH 3	Batelada alim	Yang et al. (2007)
<i>K. pneumoniae</i> AC 15	Batelada alim	Zheng et al. (2008)
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	Batelada alim	Mu et al. (2008)
<i>C. butyricum</i> F 2b	Contínuo com 2 estágios	Papanikolaou et al. (2000)
<i>C. butyricum</i> F 2b	Contínuo com 2 estágios	Papanikolaou et al. (2008)
<i>C. freundii</i> DSM 30040	Contínuo com 2 estágios	Boenigk et al. (1993)
<i>K. pneumoniae</i> XJPD-Li	Batelada alim. aeróbio	Ma et al. (2009)
<i>K. pneumoniae</i> ZJU 5205	Células imobilizadas	Zhao et al. (2006)
<i>C. freundii</i> DSM 30040	Células imobilizadas	Pflugmacher e Gottschalk (1994)

Adaptado de SAXENA et al. (2009).

2.8 Metabolismo de formação de 1,3-PD e 2,3-BD

A produção de 2,3-BD e 1,3-PD por processo fermentativo é feita geralmente apenas com o uso de bactérias. Muitas são capazes de fermentar açúcares até glicerol, mas em sua maioria poucas conseguem converter o glicerol para 1,3-PD. Outras bactérias têm habilidade de converter glicerol em uma mistura de açúcares em 1,3-PD (HUANG et al., 2011). Já uma variedade de monossacarídeos (hexoses e pentoses) pode ser fermentada para produzir 2,3-BD como pode ser visualizado na Figura 2.6 (SYU, 2001). No metabolismo bacteriano os monossacarídeos devem primeiro ser convertidos em piruvato antes da formação dos principais produtos. A partir da glicose, o piruvato pode ser formado através da via Embden-Meyerhof-Parnas (Glicolítica). Da mesma forma, a produção de piruvato a partir de pentoses deve proceder através de uma combinação da via pentose-fostato e via Glicolítica (JANSEN; TSAO, 1983). Além de gerar o 2,3-BD, o piruvato produzido a partir dos monossacarídeos pode ser convertido de uma mistura de acetato, formiato, lactato, succinato, acetoína e etanol, pela via fermentativa que leva a produção de 2,3-BD (MADDOX, 1996).

Figura 2.6-Via metabólica mista representando a formação de 2,3-BD a partir de monossacarídeos sob condições aeróbias (Huang et al. 2011).

Pode-se observar pela via metabólica mista a biossíntese do 2,3-BD a partir de açúcares mais simples como hexoses e pentoses. A partir do piruvato, três enzimas chaves são envolvidas, a α -acetolactato sintase catabólica (ALS, EC 4.1.3.18), a α -acetolactate descarboxilase (ALDC, EC 4.1.1.5) e a 2,3-BD dehidrogenase (BDH, EC 1.1.1.76), também chamada de acetoína redutase (EC 1.1.1.4). A enzima α -ALS catabólica tem uma seletividade excelente sob condições ligeiramente ácidas ($\text{pH}=6$) e, portanto, distinta da enzima α -ALS anabólica ($\text{pH}=8$), cujo o ótimo está próximo de $\text{pH}=7$. Na Figura 2.7 está ilustrada a respectiva rota enzimática envolvendo as enzimas α -ALS catabólica que leva a formação de 2,3-BD e α -ALS anabólica envolvidas nas fases anabólicas de síntese da valina-leucina e isoleucina (BLOMQVIST,1993).

Figura 2.7-Enzimas envolvidas na biossíntese do 2,3-BD e as vias anabólicas envolvidas na formação da isoleucina, valina e leucina, respectivamente.

Na fase inicial, o piruvato é complexado com pirofosfato de tiamina (TPP) para formar acetil-TPP. Este composto é posteriormente condensado com uma segunda molécula de piruvato para formar α -acetolactato (MAGEE; KOSARIC, 1987). A enzima α -ALS catabólica, em meio ácido, realiza a segunda etapa da reação para formação, no final da via, em 2,3-BD.

Em condições aeróbias, a α -ALS é rapidamente inativada, cessando a formação do 2,3-BD. No entanto, neste caso, o piruvato é transformado em acetil-CoA pela ação do complexo piruvato desidrogenase (PDC), que não é sintetizado em ambientes anaeróbios e é geralmente inibido por NADH (MADDOX, 1996). Acetil-CoA formada é então canalizada principalmente para o ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs). Quando as condições de cultura não são totalmente aeróbias, lactato desidrogenase (CE 1.1.1.27), piruvato formilase (CE 2.3.1.54) e α -ALS catabolizam o piruvato para formar formiato, lactato e 2,3-BD. O formiato pode ser metabolizado mais tarde para dióxido de carbono e hidrogênio pelo complexo formiato hidrogênio liase, que pode ser inibida em condições aeróbias, pela presença de nitrato e em condições anaeróbias (GOTTSHALK, 1986).

O succinato ilustrado na Figura 2.6 origina do fluxo de carbono envolvendo o fosfoenol piruvato (PEP) no ponto de ramificação, onde PEP é carboxilado para oxalacetato pelo PEP carboxilase (CE 4.1.1.31), e depois para succinato, sob estritas condições anaeróbicas (BLOMQVIST,1993).

Vários trabalhos estudam os genes responsáveis para a formação das enzimas chaves para assimilação glicerol para formação de 2,3-BD. Estes estudos concentram-se nas bactérias como *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*.

A Figura 2.8 apresenta as rotas bioquímicas para assimilação do glicerol e os respectivos produtos formados pela fermentação deste por bactérias (BIEBL et al.,2009).

Figura 2.8-Rotas bioquímicas da fermentação do glicerol (BIEBL et al., 2009).

Com a entrada do glicerol na célula por difusão, este pode ser metabolizado de dois modos, compreendendo quatro enzimas codificadas pelo dha regulador, sendo que este é induzido por dihidroxiacetona (DHA), na ausência de um receptor de elétrons, tais como oxigênio, fumarato, ou nitrato. As enzimas do dha regulador que não estão diretamente envolvidos na formação do 1,3-PD convertem o glicerol em DHA por um NAD⁺ dependente. O primeiro modo é a oxidação do glicerol pela glicerol-dehidrogenase (GDH) até dihidroxiacetona (DHA) com formação de equivalentes redutores (NADH₂), que é fosforilado pela dihidroxiacetona quinase (DHAK) e direcionado para o metabolismo central. Depois, o piruvato pode ser convertido a acetilcoenzima A (acetil-CoA), dióxido de carbono e hidrogênio pela oxidoredutase ferredoxina pirúvica e hidrogenase. Assim, os equivalentes redutores (NADH₂) formados podem ser recuperados para produzir etanol e 2,3-BD (HONDA et al., 1980).

Já no segundo modo, glicerol é desidratado para 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) pela enzima glicerol desidratase (GDHt), que depois é convertido para 1,3-propanodiol pela enzima 1,3-propanodiol oxidoredutase (PDOR) com oxidação de NADH₂ (FORAGE; LIN, 1982).

Estudos feitos com a purificação da enzima PDOR a partir de *L. brevis* e *L. buchneri* mostraram que esta é sintetizada durante a co-fermentação de glicerol/glicose. Este seria um método adicional de recuperação de NADH. A enzima requer Mn²⁺ e uma proteína octamérica com uma massa molecular de 350 kDa. As enzimas isoladas de ambas espécies mostram propriedades muito semelhantes as relatadas para *K. pneumoniae*. Quando a mesma enzima de *L. reuteri* foi comparada com a enzima dos lactobacilos, verificou-se serem diferentes. No entanto, todas as cepas de lactobacilos testadas com glicose e glicerol produziram 1,3-PD de uma maneira similar (CUNHA; FOSTER, 1992).

A temperatura ótima de formação de 2,3-BD e 1,3-PD parece ser diferente da temperatura ótima de crescimento da *Klebsiella pneumoniae*. Pirt e Callow citados por (PRATA, 1997) trabalhando com processo contínuo, em meio contendo sacarose, mostraram que o intervalo de 35 °C a 37 °C é o mais adequado para a formação do 2,3-Butanodiol e que a melhor temperatura para crescimento é de 30 °C.

Perego et al. (2003), utilizando uma cepa de *Bacillus licheniformis*, estudaram

o aumento progressivo da temperatura de 34 °C para 40 °C e verificaram que até 37 °C ocorreu um aumento na concentração final do produto, bem como na produtividade volumétrica média e máxima (considerando acetoína + 2,3-Butanodiol). Utilizando temperaturas maiores, observou-se a diminuição da concentração de 2,3-Butanodiol e da produtividade devido, talvez, à inativação térmica da biossíntese em temperaturas superiores a 37 °C.

Segundo Esener et al. (1981), quando utilizado glicerol como substrato para *Klebsiella pneumoniae* a velocidade específica máxima de formação de produto ocorreu a 37 °C. Garg e Jain (1995) concluíram que a temperatura ótima para o crescimento da bactéria e para a formação de produto situa-se na faixa de 30 °C a 40 °C, aproximadamente. A maioria dos trabalhos que envolvem a produção de 2,3-BD e 1,3-PD por *Klebsiella pneumoniae* são realizados a 37 °C (WANG et al. 2010; CHENG et al., 2010; MA et al., 2009; QIN et al., 2006; PRATA, 1997).

A concentração inicial de substrato no meio de fermentação também é bastante discutida na literatura. De acordo com dados de Saddler et al. (1983) a concentração de glicose ou xilose acima de 50 g/L resulta inibição da produção de 2,3-BD. Silveira et al. (1998) também relataram, que a formação de 2,3-BD e acetoína são dependentes das concentrações de sacarose inicial (S0) superiores a 60 g/L. Em condições não inibitórias, foi medido uma taxa máxima de consumo de sacarose de 1,5 g/L/h. Com S0= 204 g/L no entanto, esta medida diminuiu para 0,15 g/L/h. Na maioria dos processos as concentrações iniciais de açúcares estão raramente acima da faixa de 5-10%. Essas concentrações bastante baixas (ou até mesmo inferiores) são empregadas, principalmente, por causa de substâncias tóxicas presentes em materiais brutos (especialmente em hidrolisados de madeira), cuja concentração aumenta juntamente com a concentração da fonte de carbono (GARG; JAIN, 1995).

Frazer e Mccaskey (1991) e Garcia (1999) estudaram o efeito de compostos potencialmente tóxicos do hidrolisado de madeira na produção de 2,3-BD por *K. pneumoniae*. Ao contrário de meios complexos, houve uma melhora de rendimento na produção de 2,3-BD em meio sintético suplementado com açúcares puros, como glicose. Embora se tenha observado um aumento de velocidade específica de formação de produto com o aumento da concentração inicial de substrato, observou-se nítido decréscimo da velocidade específica de crescimento,

comprometendo a produtividade. Segundo XIU et al. (2007), teoricamente, 100% de glicerol pode ser transformado em 1,3-PD em um meio contendo glicerol/glicose, principalmente nos casos em que glicerol não é utilizado para formar biomassa. Os autores demonstraram que a concentração de biomassa e produção de 1,3-Propanodiol em glicerol puro pode ser melhorada utilizando glicose como co-substrato.

Segundo Celinska e Grajek (2009), a velocidade específica de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* diminui com o decréscimo da atividade de água. Esta baixa resistência osmótica pode explicar a inibição que altas concentrações de substrato provocam sobre esta bactéria. Uma das formas de se evitar o problema é a condução do processo em sistema descontínuo alimentado, o que permite ainda atingir altas concentrações de produto no meio (SILVEIRA et al., 1998). Também, para minimizar a inibição do crescimento celular em altas concentrações de substrato, durante a produção de 2,3-Butanodiol a partir do melaço, Afschar et al. (1991) empregaram o sistema de descontínuo com pulso de substrato e obtiveram uma concentração de 98,6 g/L de 2,3-Butanodiol.

Na bioprodução de 1,3-PD por bactérias de espécies como *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *E. agglomerans* e *C. butyricum* vários trabalhos comparam diferentes concentrações de glicerol (BARBIRATO et al., 1998). Fermentações utilizando *C. butyricum* em glicerol industrial diluído a uma concentração de 112 g/L resultaram em 63,4 g/L de 1,3-PD e rendimento de 0,69 g/g. Ao comparar a eficiência da fermentação entre as quatro bactérias, *C. butyricum* foi escolhido para um estudo mais aprofundado que consistiu na bioconversão de glicerol industrial. Nos testes realizados com essa bactéria, a fermentação contínua apresentou maior produtividade, mas a concentração final de 1,3-Propanodiol foi baixa. O processo descontínuo alimentado apresentou maior concentração final de 1,3-PD juntamente com uma maior produtividade.

O suprimento de oxigênio é um dos principais parâmetros que afetam a fermentação butileno-glicólica. Jansen et al. (1984) e Sablayrolles e Goma (1982) mostraram que a velocidade específica de formação de produto por *Klebsiella pneumoniae* é mais alta quando a concentração de oxigênio dissolvido se aproxima de zero. Entretanto, devido à baixa concentração celular, os rendimentos não são satisfatórios. Assim, a aeração é necessária para a formação de células, enquanto que uma menor concentração de oxigênio dissolvido é fundamental para

a síntese do 2,3-BD, devido ser um processo que se dá pelo metabolismo anaeróbio ou parcialmente aeróbio da bactéria (PIRT, 1975). Tal fato foi comprovado por testes de suplementação de ar em sistema descontínuo de sacarose por *Klebsiella pneumoniae* realizados por Silveira et al. (1993). Foram cinco diferentes condições de transferência de oxigênio testadas e, dependendo do suprimento de oxigênio, três diferentes fases podem ocorrer. Com oxigênio em solução, o crescimento celular é exponencial e a produção de butanodiol/acetoína depende do coeficiente de transferência de oxigênio (k_La). Com altos valores de k_La pode-se cessar completamente a formação de 2,3-BD e, quando a concentração de oxigênio dissolvido é zero, o crescimento torna-se linear. Mesmo comportamento foi observado por Garcia (1999) no estudo das condições iniciais para a produção de 2,3-BD em sistema descontínuo alimentado, utilizando o valor de k_La inicial da fase descontínua igual a 100 h^{-1} . Nestas condições foi possível obter valores de produtividades em 2,3-BD em torno de $2,9 \text{ g/h}$ ($2,15 \text{ g/L.h}$).

Normalmente, a biossíntese de 1,3-Propanodiol é feita sob condição anaeróbia. Em condições aeróbias, o glicerol pode ser convertido para 3-HPA que é tóxico para as células (SLININGER; BOTHAST, 1985). No entanto, em condições micro-aeróbia ou em baixa aeração, verificou-se que 1,3-PD pode ser obtido por *K.pneumoniae* (CHENG et al., 2007;. MA et al., 2009). Estes estudos indicaram que o oxigênio, como um acceptor de elétrons, poderia aumentar a formação de 1,3-Propanodiol.

Hao et al. (2008) relataram a produção de 1,3-PD sob condição aeróbia com oito cepas diferentes de *Citrobacter* e *Klebsiella*. O processo de fermentação aeróbia pode não só reduzir o custo de produção, mas também minimizar o acúmulo de 3-HPA.

Na produção de 1,3-PD, o pH é um dos fatores que influenciam diretamente o crescimento da bactéria pois as atividades das enzimas dos micro-organismos dependem do pH extracelular (PIRT, 1975). O pH ideal para o crescimento pode ser diferente daquele para a formação de produto. Para estudar o efeito do pH no processo de produção de 1,3-PD tem sido avaliado o pH na faixa de 6,5-7,5, (BARBIRATO et al. 1998). Rosso et al. (1995) estudou a velocidade específica máxima de crescimento em função do pH e temperatura, e descreveram um modelo para o crescimento microbiano. Neste trabalho, os parâmetros físicos, tais

como temperatura e pH, tiveram um papel significativo sobre o crescimento dos micro-organismos e a produção de 1,3-PD. Jalsutram et al. (2011) analisaram o uso de carbonato de cálcio durante a produção de 1,3-PD e observaram seu importante papel como tampão e consequentemente a manutenção do pH do meio durante a fermentação. O pH atua como regulador do metabolismo das bactérias e esta influência é acentuada no processo envolvendo a formação de vários subprodutos, principalmente 1,3-PD e 2,3-BD (GARG; JAIN, 1995). Como a maioria das bactérias cresce mais lentamente em pH baixo, há uma maior disponibilidade de piruvato para ser utilizado na produção de 2,3-BD, visto que, ao crescerem, as células requerem uma quantidade menor de piruvato para a síntese de material celular (TEIXEIRA, 1999).

Segundo Garg e Jain (1995), o pH representa o segundo maior influência sobre a produção de 2,3-BD. Em seus trabalhos, condições alcalinas favoreceram a formação de ácidos orgânicos, com uma redução simultânea no rendimento em 2,3-BD. Contrário a isto, em condições ácidas, a síntese de ácidos orgânicos é reduzida e a síntese de 2,3-BD é aumentada.

O pH ótimo para a produção de dióis depende fortemente dos micro-organismos e substratos utilizados. A maioria dos processos de fermentação anaeróbia é associada com a formação de ácidos orgânicos. Assim, durante o curso da fermentação, a cultura acidifica e as concentrações de tóxicos excretados pelas bactérias podem aumentar. Alguns micro-organismos desenvolveram estratégias defensivas, como encontrar uma alternativa no metabolismo com a produção de compostos menos tóxicos, tais como álcoois ou glicóis (HOUDT et al., 2007). Maddox (1996) explica o fenômeno, descrevendo que a formação de 2,3-BD é fruto do acúmulo de produtos que acidificam o meio alterando o pH interno. Assim, o resultado da diferença de pH no gradiente transmembranar provoca acúmulo de acetato, induzindo as enzimas envolvidas na síntese de 2,3-BD. Assim, a redução do pH da cultura provoca um aumento no gradiente de pH e a produção de 2,3-BD ocorre antes do pH externo tornar-se muito alto.

Jansen et al. (1984) avaliaram a influência do pH sobre a produção de 2,3-BD por *Klebsiella oxytoca* utilizando xilose como substrato. Os autores observaram que entre 4,4 e 5,8 o rendimento do produto não parece ser muito afetado, atingindo um pico de produção entre pH 5,2 e 5,6. Utilizando valores de pH próximo a 6,0, o rendimento de 2,3-Butanodiol diminui. Segundo os

pesquisadores, esta diminuição ocorre devido à redução da atividade das enzimas produtoras de 2,3-BD. No mesmo trabalho, foi avaliado o efeito do pH sobre a velocidade específica de crescimento e sobre o rendimento em produto. Verificou-se que a máxima velocidade específica de crescimento em aerobiose ocorre em pH 5,2. Já outros autores, como Blomqvist et al. (1993) verificaram que o pH ótimo para a ação da enzima acetolactato sintase, necessária para a produção de 2,3-BD, se situa em torno de 5,8; que o acetato tem o poder de ativar esta enzima, e que a atividade enzimática é inibida por fosfato e sulfato. Segundo Magee e Kosaric (1987), o pH ideal para a atividade da acetolactato sintase se encontra também próximo a 5,8, no qual a maioria das moléculas de ácido acético se encontra em sua forma dissociada. Prata (1997) empregou o pH 5,8 para a produção de 2,3-BD em sistema descontínuo alimentado, com a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, em meio preparado com o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. O autor concluiu que este valor de pH é adequado para esta fermentação. Já Grover et al. (1990) examinaram o efeito do pH inicial sobre a produção de 2,3-BD a partir de hidrolisado de madeira, por *Klebsiella pneumoniae*, e verificaram um pH inicial entre 5,5 e 6,0.

Outros sistemas de fermentação também são encontrados na literatura em relação à produção de 2,3-BD e 1,3-PD. Silveira (1991) estudou a cinética desta fermentação, utilizando sacarose como substrato, em sistema descontínuo, obtendo uma concentração máxima de 74,0 g/L. O mesmo autor realizou ainda alguns ensaios em sistema descontínuo alimentado, e sugere que este sistema seja preferencialmente empregado para a produção de 2,3-Butanodiol. As estratégias de alimentação em biorreatores são realizadas com a finalidade de se estudar melhor a diferença de metabolismo frente às diferentes condições de aeração e o conseqüente aumento da produção dos produtos de interesse. Nesses estudos, pode-se verificar que as altas concentrações de alimentação levaram a um acúmulo de substrato no meio melhorando sensivelmente a produção de 2,3-BD.

2.9 Recuperação dos produtos

A principal barreira econômica para a comercialização de 2,3-BD e 1,3-PD pode não ser a fermentação, mas, sim, a separação destes do meio. Dessa forma, um dos principais desafios para encontrar um processo energeticamente eficiente e econômico de separação de 2,3-BD e 1,3-PD já vem sendo estudado (XIU; ZENG, 2008).

A recuperação de 2,3-BD e 1,3-PD a partir de caldos fermentados é especialmente difícil devido aos seus altos pontos de ebulição, grande afinidade por água, presença de constituintes dissolvidos e sólidos no meio de fermentação. Em estudos anteriores, muitas técnicas de separação, tais como a destilação (AFSCHAR et al., 1993), arraste com vapor (GARG; JAIN, 1995), osmose reversa (XIU; ZENG, 2008) e pervaporação (QURESHI et al., 1994) foram estabelecidas com sucesso para a separação de 2,3-BD e 1,3-PD, inclusive algumas delas atingindo a escala piloto.

A grande quantidade de energia, no entanto, necessária para esses processos impede sua aplicação. Outros métodos, como recuperação por solventes (EITEMAN; GAINER, 1989), recuperação com base na conversão química de 2,3-BD (XIU; ZENG, 2008), *salting-out* (AFSCHAR et al., 1993) e vapor em contracorrente (GARG; JAIN, 1995) também foram investigados com algum sucesso, principalmente em escala laboratorial.

Na última década, alguns processos emergentes para recuperação de 2,3-BD e 1,3-PD foram estabelecidos de forma bem eficientes, incluindo extração em fase aquosa com dois solventes (GHOSH; SWAMINATHAN, 2003, JIANG et al., 2009; LI et al., 2010; SUN et al., 2009). No entanto, quase todos estes métodos apresentam algumas desvantagens ou limitações (XIU; ZENG, 2008). Uma das primeiras tentativas para resolver o problema foi a extração reativa proposta por Broekhuis et al. (1996), onde o produto alvo era convertido em um composto sem grupos hidroxila e, em seguida, recuperado por meio de extração com solvente. Formaldeído ou acetaldeído foram usados para formar derivados dioxano de 1,3-PD e 1,2-PD. Malinowski (2000) avaliou a formação de 2-Metil-1,3-Dioxano (2-MD) por reação reversível com acetaldeído catalisada por resina trocadora de íons Amberlite® ou Dowex® e com extração simultânea do produto por solventes

orgânicos como o-xileno, tolueno ou etilbenzeno. O 2-MD pode então ser convertido novamente para 1,3-PD por hidrólise. Foi relatado que o rendimento de 2-MD foi de 91% a 92%, a conversão global de 1,3-PD foi de 98% e a recuperação do dioxano no extrator orgânico foi de 75%. Contudo, o acetaldeído também pode reagir com as outras substâncias do caldo, como o etanol, 2,3-BD, glicerol, bem como com as proteínas solúveis.

Alguns dos métodos de recuperação do 2,3-BD e 1,3-PD de meios fermentados citados na literatura, proposto por Afschar et al. (1993), utilizam a técnica denominada “salting-out”. A técnica “salting-out” consiste na dissolução do sal e aquecimento do meio a 40 °C, formando duas fases distintas: uma contendo o diol (fase superior) e outra contendo água e o sal (fase inferior). Vários experimentos foram realizados para avaliar o efeito de diferentes sais na separação do diol de melaço e hidrolisado amiláceo fermentados por *Klebsiella pneumoniae*. Os melhores resultados foram obtidos com carbonato de potássio anidro, um sal altamente solúvel em água e, por outro lado, com baixa solubilidade em dióis.

Wang et. al (2008) concluíram que o coeficiente de *salting-out* (k) é maior utilizando Na_2CO_3 quando comparado com K_2CO_3 . Zhigang et. al. (2010) obtiveram 91,7% (m/m) de 2,3-BD utilizando um sistema composto por 32% (m/m) de etanol e 16% (m/m) de sulfato de amônio.

Afschar et al. (1993) verificaram que, com a adição de 53% (p/p) de carbonato de potássio anidro ao meio de melaço fermentado, livre de células e previamente clarificado, foi possível recuperar 94% (m/m) do diol presente. A concentração do diol na solução obtida foi de 97% (m/m).

No trabalho publicado por Qureshi et al. (1994) foi estudado um processo de destilação à vácuo com membrana, para a recuperação de 2,3-BD. O método consiste na utilização de uma membrana hidrofóbica microporosa de PTFE (politetrafluoretileno), sob um gradiente de temperatura, que permite a passagem de vapor d'água enquanto retém o 2,3-BD. O sistema permitiu obter uma solução com até 430 g/L de 2,3-BD.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi definir um processo fermentativo de produção de 2,3-Butanodiol e 1,3-Propanodiol, a partir da glicerina residual proveniente da fabricação de biodiesel de óleo de algodão, empregando a bactéria *Klebsiella pneumoniae*.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um tratamento adequado para a glicerina residual de óleo de algodão de forma a permitir o crescimento bacteriano e a formação dos produtos de interesse.
- Adequar a composição do meio de fermentação, quanto às concentrações de glicerol, com suplementação de glicose, extrato de levedura e elementos traços (íons Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+}) para o favorecimento do processo fermentativo.
- Definir a melhor condição de transferência de oxigênio em sistema descontínuo, associada à concentração de substrato, para o favorecimento do processo fermentativo.
- Definir o procedimento de separação dos produtos do meio pela técnica de *salting-out*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentação III do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

4.1 Matéria prima

A matéria prima correspondeu à glicerina bruta fornecida pela empresa BIOVERDE – Indústria e Comércio de Bicomustíveis LTDA, proveniente da produção de biodiesel a partir de óleo de algodão, com hidróxido de potássio como catalisador. Foi empregado o tratamento com variação de pH para sua purificação.

A glicerina bruta foi aquecida a 60 °C, visto que é bastante viscosa à temperatura ambiente. Conforme proposto por Rehman et al. (2008), o tratamento foi baseado no processo de acidificação com ácido fosfórico concentrado até pH 4,0 ou pH 3,0. Os materiais acidificados foram colocados em funis de separação onde ficaram em repouso durante 24 ou 48 horas para decantação (Figura 4.1). Assim, foram separadas tanto a fase leve, que é composta por ácidos graxos, quanto a pesada, composta por glicerina. Posteriormente, a fase pesada foi filtrada com algodão. O filtrado foi neutralizado a temperatura ambiente com NaOH 6N, até pH 6,5 e, em seguida, submetido a aquecimento em banho-maria à 65 °C por duas horas para eliminação do metanol usado durante a produção do biodiesel.

Amostras de glicerina foram recolhidas depois do tratamento e diluídas de forma adequada para determinação da concentração final e, assim, avaliar a eficiência do tratamento efetuado. As amostras foram analisadas conforme descrito no item 4.7.

Figura 4.1- Etapa de decantação da glicerina residual da fabricação de biodiesel com óleo de algodão.

4.2 Micro-organismo

Foi empregada, para todos os ensaios de fermentação, a bactéria *Klebsiella pneumoniae* NRRL B-199, fornecida pelo Northern Regional Research Laboratory, EUA e catalogada na American Type Culture Collection (ATCC), EUA, sob o código ATCC 8724. As culturas foram mantidas em ágar inclinado, contendo os nutrientes do meio sintético definidos por Frazer e McCaskey (1989), cuja composição está apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Composição do meio empregado por Frazer e McCaskey (1989).

Nutrientes	Concentração (g/L)
Fosfato dibásico de amônio ((NH ₄) ₂ HPO ₄)	4,0
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	1,0
Cloreto de Sódio (NaCl)	1,0
Fosfato dibásico de sódio (Na ₂ PO ₄)	1,0
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,2
Extrato de levedura	1,5
pH=7,0	

A preparação do meio de manutenção foi realizada com auxílio de balança analítica, com os nutrientes sendo dissolvidos em água deionizada e aquecidos até completa dissolução, sob constante agitação. A seguir, pela adição de HCl 1N o pH do meio foi ajustado até 7,0 e em seguida distribuído em tubos de ensaio, os quais foram fechados com tampão de algodão e esterilizados a 121 °C por 20 minutos. Os tubos contendo 6,0 mL do meio ainda quente foram inclinados sobre a bancada até completo resfriamento e consequente solidificação. A bactéria foi repicada e incubada em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 horas. Posteriormente, os tubos foram mantidos sob refrigeração a 4 °C. Para manutenção do micro-organismo a repicagem foi efetuada para um novo meio a cada 45 dias.

4.3 Inóculo

O inóculo foi preparado a partir de células obtidas do cultivo em frasco Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio (Tabela 4.2), sob agitação de 200 rpm, a 37 °C em incubadora de movimento circular (New Brunswick Sci. Co./modelo INNOVA 4000) por cerca de 18 horas. Após o cultivo, as células foram centrifugadas a 4000 x g por 30 minutos e ressuspensas no próprio meio para se obter a suspensão utilizada como inóculo. Em todos os ensaios a concentração inicial de células foi de 0,6 g/L.

Tabela 4.2- Composição de meio adaptado de Liu et al. (2007).

Componentes	Concentração g/L
Glicerina PA	20,0
Glicose	2,0
K ₂ HPO ₄	0,69
KH ₂ PO ₄	1,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
Extrato de levedura	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
pH=6,7	

4.4 Condições de fermentação

4.4.1 Meios de fermentação

Para os ensaios de avaliação do efeito da glicerina residual tratada, assim como para o estudo do efeito da concentração de glicerina no processo, foram utilizados meios constituídos por glicerina residual tratada em três concentrações distintas (20,0 g/L, 50 g/L e 80 g/L), suplementados com os nutrientes descritos na Tabela 4.2 e solução tampão de citrato de sódio 0,294 g/L e ácido cítrico 0,21 g/L.

Para os ensaios de estudo da agitação, da suplementação com extrato de levedura e com os íons Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} , foi empregado o meio com glicerina residual tratada na concentração ótima estudada na etapa anterior. Os metais utilizados foram provenientes de sais de sulfato, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Foi preparada uma solução mãe e concentrada dos sais sulfato, sendo que cada mL diluído em 50 mL de meio corresponde às concentrações dos sais descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Concentração dos sais empregados em 50 mL de meio de fermentação como fonte dos elementos traços, baseado em Qin et al. (2006).

Componentes	Concentração g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,008
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,004

4.4.2 Condições de cultivo

Os ensaios fermentativos foram divididos em três etapas experimentais, sendo as duas primeiras em incubadora e a última em um biorreator de bancada, em sistema descontínuo.

Na primeira e segunda etapas do trabalho, os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio, sob agitação de 150 rpm, a 37 °C e pH inicial igual a 6,7 empregando-se uma incubadora de movimento circular (New Brunswick Sci. Co./modelo INNOVA 4000) por um período de 20

horas (Figura 4.2). Na terceira etapa, os ensaios foram realizados em fermentador tipo tanque agitado modelo BIOFLO III (New Brunswick Sc. Co.), com capacidade útil de 1,25 litros, equipado com controle de temperatura, pH, agitação, aeração e medidor de oxigênio dissolvido. Esses ensaios foram realizados à 37 °C, pH inicial igual a 6,7 (ajustado com NaOH 6N) e volume do meio de fermentação igual a 1,0 L.

Figura 4.2 - Foto representativa dos ensaios realizados da primeira e segunda etapa do trabalho em incubadora de movimento circular (modelo INNOVA 4000).

4.5 Sequência experimental

4.5.1 Estudo do efeito da concentração da glicerina com co-substrato

Nesta primeira etapa, estudou-se o meio de fermentação formulado com a glicerina PA e residual, visando definir a melhor concentração para a sequência dos estudos. Para estudar o efeito da glicerina sobre a produção de 1,3-PD e 2,3-BD, foram empregadas três concentrações distintas de glicerina residual e glicerina PA, suplementados com glicose na proporção de 10% da concentração de glicerina. Para o primeiro grupo de ensaios foram empregados meios contendo glicerina PA, nas concentrações descritas na Tabela 4.4, sendo estes suplementados com os nutrientes descritos na Tabela 4.2. No segundo grupo de ensaios as fermentações foram realizadas em meio contendo glicerina residual

tratada, sendo estes também suplementados com glicose na proporção de 10% da concentração inicial de glicerina.

Tabela 4.4 – Concentrações de glicerol e de glicose empregadas no estudo do efeito do co-substrato.

Glicerina residual ou PA (g/L)	Glicose (g/L)
20	*SG
20	2,0
50	SG
50	5,0
80	SG
80	8,0

*sem adição de glicose

4.5.2 Avaliação da necessidade de adição de extrato de levedura, de elementos traços e a influência da agitação

Um estudo com base em um planejamento fatorial 2^3 completo foi realizado com o objetivo de avaliar o desempenho da bactéria *Klebsiella pneumoniae* em meio com uma maior quantidade de extrato de levedura e com os elementos traço citados por Qin et al. (2006). Também foi estudado o efeito da agitação sobre o crescimento da bactéria e a produção de 1,3-PD e 2,3-BD. A Tabela 4.5 apresenta os fatores e os níveis das variáveis estudadas nessa etapa e a Tabela 4.6 mostra a matriz do planejamento fatorial 2^3 completo contendo os fatores e os níveis codificados.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata, nas condições conforme descritas no item 4.4.2, em frascos Erlenmeyer de 250 mL e por cerca de 36 horas.

Tabela 4.5- Valores reais e codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^3 completo.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Agitação (rpm)	160 rpm	180 rpm	200 rpm
Metais (mL)	ausente	1,0 mL	2,0 mL
Extrato de Levedura (g/L)	ausente	1,0 g/L	2,0 g/L

Nível superior: +1, Nível inferior: -1 e Nível central: 0

Tabela 4.6 – Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 completo.

Ensaio	Metais	Extrato de levedura	Agitação
1	0	0	0
2	1	-1	-1
3	-1	-1	1
4	0	0	0
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	0	0	0
8	-1	1	-1
9	1	-1	-1
10	-1	-1	-1
11	1	1	1
12	-1	1	-1
13	1	-1	1
14	-1	1	1
15	-1	-1	-1
16	-1	1	1
17	1	1	-1
18	1	1	-1
19	1	1	1

4.5.3 Estudo da transferência de oxigênio e da concentração de glicerina inicial

Este estudo foi realizado com base em um planejamento fatorial 2^2 completo com triplicata do ponto central. A Tabela 4.7 mostra os fatores e os níveis das variáveis estudadas nessa etapa e na Tabela 4.8 encontra-se a matriz do planejamento contendo os dois fatores e os níveis codificados. Os ensaios foram realizados em biorreator de bancada, conforme descrito no item 4.4.2 e empregando-se o meio que proporcionou o melhor resultado na etapa anterior. As variáveis resposta para avaliação dos resultados foram as produtividades volumétricas encontradas para 1,3-PD e 2,3-BD.

Tabela 4.7 – Valores reais e codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^2 completo.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
k_La (h^{-1})	20	60	100
Glicerina residual (g/L)	20	50	80

Nível superior: +1, Nível inferior: -1 e Nível central: 0

Tabela 4.8 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 completo.

Ensaio	k_La	Glicerina Residual (g/L)
1	1	1
2	1	-1
3	-1	1
4	-1	-1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

4.5.4 Recuperação dos dióis

Para os estudos de recuperação de 2,3-BD e 1,3-PD foi empregada a técnica de *salting-out* (Figura 4.3). O meio fermentado foi inicialmente submetido a uma centrifugação para remoção de células. Em tubos de ensaio foram adicionados 15 mL de meio e o respectivo sal, Na_2CO_3 ou K_2CO_3 , nas proporções determinadas por um planejamento fatorial 2^3 completo. Após a dissolução do sal e aquecimento, os tubos permaneceram em repouso até se observar a formação de duas fases, permitindo a separação do diol. Os resultados foram analisados empregando-se como variável resposta a porcentagem de recuperação dos dióis. Para o desenvolvimento do trabalho, adotou-se a temperatura na faixa de 20-60 °C, concentração de cada sal, individualmente, na faixa de 30-70% e tempo de 6, 12 e 18 horas. Na Tabela 4.9 são apresentados os valores reais e codificados utilizados no planejamento. Os ensaios foram realizados conforme a matriz de planejamento experimental fatorial apresentada na Tabela 4.10.

Figura 4.3-Ilustração representativa do efeito *salting-out* (UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON, 2012).

Tabela 4.9 - Valores reais e codificados das variáveis analisadas no planejamento 2^3 completo para cada sal.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Sal (%)	30	50	70
Temperatura (°C)	20	40	50
Tempo (h)	6	12	18

Nível superior: +1, Nível inferior: -1 e Nível central: 0

Tabela 4.10- Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 completo para cada sal.

Ensaio	% Sal	Temperatura °C	Tempo
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	-1	1	1
6	-1	1	-1
7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Concentração de substrato e produtos da fermentação

As concentrações de glicose e de glicerina foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), em cromatógrafo WATERS, equipado com coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), acoplada a um detector de índice de refração RID-6A. O eluente utilizado foi ácido sulfúrico 0,01 N desgaseificado, a um fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura da coluna foi de 45 °C e o volume de amostra injetado de 20 µL. Os produtos da fermentação 2,3-BD e 1,3-PD, também foram quantificados por (HPLC), porém empregando-se coluna HAMILTON PRP-X300, acoplada a um detector de índice de refração RID-6A, operando nas seguintes condições: temperatura de 50 °C; eluente: água ultra-pura desgaseificada; fluxo do eluente: 0,8 mL/min e volume de amostra: 20 µL. Em ambos os casos as concentrações foram calculadas por curvas de calibração que correlacionam a concentração de cada um dos padrões com a área do respectivo pico.

4.6.2 Densidade da glicerina

A densidade da glicerina foi quantificada com auxílio de um picnômetro na temperatura de 25 °C e utilizando água como padrão.

4.6.3 Concentração celular

A concentração celular foi determinada por uma curva de calibração que correlaciona absorbância (densidade ótica) com a massa seca de células. Para a elaboração da curva foram obtidos 50 mL de uma suspensão celular a partir do meio utilizado em cada etapa do estudo. Foram feitas diluições para obtenção das suspensões celulares que foram submetidas à leitura de absorbância a 600 nm em espectrofotômetro BIOSPECTRO SP-22 e utilizando-se água destilada como branco. A massa seca foi determinada pela técnica de gravimetria, a partir da secagem de alíquotas de 5 mL da suspensão, em estufa a 100 °C, até atingir a massa constante.

4.7 Forma de análise dos resultados

Os resultados foram analisados em termos dos parâmetros fermentativos, fator de conversão de substrato em produto, fator de conversão de substrato em células, produtividade volumétrica em células e velocidades específicas de crescimento, de formação de produto e de consumo de substrato. Programas específicos de estatística foram empregados para análise das variáveis respostas mencionadas, nos ensaios em que um planejamento experimental foi empregado, obtendo-se superfícies de resposta que permitem definir as condições mais adequadas para a condução do processo. Neste caso, foram empregados os programas DESIGN-EXPERT 7.0. e STATISTICA versão 6.0. Estes programas fornecem tabelas de análise de variância dos resultados, identificando as variáveis que têm efeito significativo sobre o processo, assim como superfícies de resposta, que permitem definir as melhores condições para o processo, em

função das variáveis estudadas. Os parâmetros fermentativos, assim como sua forma de cálculo, estão apresentados a seguir.

- **Fator de conversão de glicerol em células ($Y_{X/S}$)**

Foi determinado pela relação entre a quantidade de células produzidas e a correspondente quantidade de glicerol consumido, durante o tempo considerado da fermentação, conforme a equação 1.

$$\text{(Equação 1)} \quad Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$$

em que:

$Y_{X/S}$ = fator de conversão de glicerol em células (g/g); X_f = concentração final de células (g/L); X_i = concentração inicial de células (g/L); S_f = concentração final de glicerol (g/L); S_i = concentração inicial de glicerol (g/L).

- **Fator de conversão de glicerol em produto ($Y_{P/S}$)**

Foi determinado pela relação entre a quantidade de diol produzido e a correspondente quantidade de glicerol consumido, durante o tempo considerado da fermentação, conforme a equação 2.

$$\text{(Equação 2)} \quad Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}$$

em que:

$Y_{P/S}$ = fator de conversão de glicerol em produto (g/g); P_f = concentração final de produto (g/L); P_i = concentração inicial de produto (g/L); S_f = concentração final de glicerol (g/L); S_i = concentração inicial de glicerol (g/L).

- **Produtividade volumétrica em células (Q_x)**

Foi determinada pela relação entre a variação da concentração de células e o intervalo do tempo correspondente, conforme a equação 3.

(Equação 3)
$$Q_x = \frac{X_f - X_i}{\Delta t}$$

em que:

Q_x = produtividade volumétrica em células (g/L.h); X_f = concentração final de células (g/L); X_i = concentração inicial de células (g/L); Δt = intervalo de tempo considerado da fermentação (h).

- **Produtividade volumétrica em Produto (Q_p)**

Foi determinada pela relação entre a variação da concentração de produto e o intervalo do tempo correspondente, conforme a equação 4.

(Equação 4)
$$Q_p = \frac{P_f - P_i}{\Delta t}$$

em que:

Q_p = produtividade volumétrica em produto (g/L.h); P_f = concentração final de produto (g/L); P_i = concentração inicial de produto (g/L); Δt = intervalo de tempo considerado da fermentação (h).

- **Velocidades específicas**

Inicialmente, aos dados experimentais foram alisados por polinômios utilizando o programa Micronal Origin 7.0. Os dados obtidos desse alisamento foram inseridos na planilha do programa Microsoft Excel 2010 desenvolvida por Gombert A.K., conforme consta em Hiss (2001). Através da planilha obtem-se as velocidades instantâneas, os valores das velocidades específicas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto em função do tempo para todos os ensaios realizados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tratamento da glicerina residual

Como a glicerina bruta de biodiesel produzido com óleo de algodão é proveniente de um processo onde se utilizou hidróxido de potássio como catalisador e metanol, foi realizado o tratamento citado no item 4.1, que de acordo com Hajec e Skopal (2010) proporciona a remoção de álcool, água, NaOH, ácidos graxos livres, sais de ácidos graxos, ésteres, compostos de enxofre, proteínas e demais impurezas. Observou-se que o maior grau purificação da glicerina foi obtido quando empregados o pH 4,0 e o tempo maior de decantação (48 h), enquanto no tratamento com redução de pH até 3,0, não houve melhora considerável. Na Figura 5.1 pode-se observar a formação de certa quantidade de sal que se deposita no fundo do funil, estando a fase superior constituída pelos ácidos graxos livres, e a fase intermediária composta principalmente por glicerina e álcool.

Figura 5.1 - Fase de decantação no tratamento da glicerina residual.

Na Tabela 5.1 encontra-se a concentração de glicerol antes e depois dos tratamentos realizados com variação de pH e decantação por diferentes tempos.

Tabela 5.1- Concentração de glicerol da glicerina residual, após os tratamentos com ácido fosfórico.

pH	pH 3,0		pH 4,0	
Tempo de decantação (h)	24	48	24	48
Glicerol (g/L)	925,12	940,26	950,0	1020

Concentração de Glicerina Bruta – 710,56 g/L

Verifica-se que os resultados foram bastante satisfatórios com relação à concentração de glicerol, obtendo-se concentrações de 950 g/L e 1.020 g/L com a diminuição do pH até 4,0 e tempo de decantação de 24 horas e 48 horas, respectivamente. Esses valores correspondem a um aumento de 33,7% e 43,5%, respectivamente, na concentração final, em relação à glicerina bruta. A densidade relativa também foi analisada, encontrando-se um valor de 1,29 g/cm³. Este valor de densidade relativa é maior que o da glicerina PA, de 1,26 g/cm³, o que pode ser explicado pelo fato de que alguns sais, no caso o fosfato de sódio dissolvido, possuem altas densidades, logo, a presença de uma determinada quantidade dos mesmos na glicerina causa aumento da sua densidade final.

Na Figura 5.2 observa-se claramente a diferença no aspecto da glicerina, indicando a remoção das impurezas pelo tratamento empregado. Vale ressaltar que houve uma perda de aproximadamente 40% da massa de glicerol inicial (glicerina bruta), o que sugere que formas alternativas para o tratamento devem estudadas no futuro. Outro ponto importante que deve ser considerado é a utilização de ácido fosfórico no tratamento. Comparado com outros ácidos inorgânicos, o ácido fosfórico pode tornar o tratamento restrito, devido ao alto custo. Por outro lado, o uso do ácido fosfórico pode ser vantajoso, como no trabalho de produção de bioinseticida relatados por Fernandes e Prata (2009). Os autores realizaram um tratamento similar utilizando ácido sulfúrico e os resultados mostraram pouca diferença na concentração final de glicerol quando comparado com resíduo tratado com ácido fosfórico. No entanto, ao final do processo fermentativo, utilizando *Bacillus thuringiensis*, a atividade larvicida do meio

fermentado empregando a glicerina tratada com ácido sulfúrico foi menor que aquele tratado com ácido fosfórico.

Figura 5.2 – Aspecto da glicerina antes e após o tratamento. Do lado esquerdo a glicerina bruta e do direito a glicerina tratada.

Portanto, apesar do tratamento da glicerina ter apresentado resultados satisfatórios, é necessário analisá-lo e estudá-lo sob o ponto de vista da sua utilidade como substrato em processos fermentativos específicos. Nesse contexto, pode-se mencionar o fato de o tratamento da glicerina bruta de biodiesel de óleo de soja, que proporcionou o melhor crescimento e consumo de substrato por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, não foi o mesmo que proporcionou a produção de toxina por esta bactéria (ROSSI, 2012).

Assim, na etapa posterior deste trabalho foi analisado o efeito da glicerina tratada no crescimento celular e na produção de 1,3-Propanodiol e 2,3-Butanodiol, em comparação com o glicerol puro.

5.2 Estudo do efeito da concentração de glicerol e do uso de glicose como co-substrato

Nesta primeira etapa do trabalho envolvendo processos fermentativos, foram estudados o efeito da concentração de glicerol e o efeito da adição de um co-substrato no meio, empregando-se glicose e glicerina residual tratada, bem como glicose e glicerina PA. Os resultados apresentados correspondem à média dos valores obtidos de experimentos realizados em duplicata. Ensaio controle

também foram realizados com meio contendo glicerina tratada e glicerina PA, porém, sem adição do açúcar, conforme apresentado na Tabela 4.4.

Na Figura 5.3 é apresentado o gráfico do consumo de glicerol ao final das fermentações, por *K. pneumoniae*, para as três concentrações iniciais de glicerina residual e glicerina PA. Os resultados também podem ser verificados pelos gráficos de concentração de substrato em função do tempo na Figura 5.4.

Figura 5.3 – Consumo de glicerol em meio contendo glicerina residual e glicerina PA ao final de 20 horas de fermentação por *Klebsiella pneumoniae*.

Figura 5.4 - Concentração de glicerol em função do tempo para os ensaios com 20,0 g/L, 50,0 g/L e 80,0 g/L de substrato durante a fermentação por *K. pneumoniae*.(Continua)

Figura 5.4 - Concentração de glicerol em função do tempo para os ensaios com 20,0 g/L, 50,0 g/L e 80,0 g/L de substrato durante a fermentação por *K. pneumoniae*.

Na Tabela 5.2 são apresentadas as variações das concentrações de glicose em função do tempo de todos os ensaios com glicerina residual e glicerina PA.

Pelas curvas de concentração de substrato (Figura 5.4) verifica-se que o consumo tem uma tendência a linear nos casos em que glicerol é proveniente de

glicerina PA, ao passo que para aquele proveniente da glicerina residual, ocorrem oscilações do perfil de concentração. Isto pode ser explicado pelo fato de resíduos de ácidos graxos que existam na glicerina residual, mesmo após o tratamento, estarem sendo convertidos a glicerol por hidrolases produzidas pela bactéria ou mesmo por alguma condição do meio que proporcione tal hidrólise.

Tabela 5.2-Concentrações de glicose durante as fermentações com *K. pneumoniae* em meio contendo glicerol e glicose, em diferentes concentrações.

Ensaio	Concentrações de glicose (g/L)					
	0 h	4 h	8h	12 h	16 h	20 h
20,0 g/L Glicerina Residual	2,0	1,115	0,485	*nd	nd	nd
20,0 g/L Glicerina PA	2,0	0,96	0,14	nd	nd	nd
50,0 g/L Glicerina Residual	5,0	4,02	3	0,66	nd	nd
50,0 g/L Glicerina PA	5,0	2,225	0,31	nd	nd	nd
80,0 g/L Glicerina Residual	8,0	7,03	3,67	1,28	nd	nd
80,0 g/L Glicerina PA	8,0	4,09	1,04	nd	nd	nd

*nd- não detectado

Pode-se observar na Figura 5.3 e nos gráficos da Figura 5.4 (20 g/L), que ao final de 20 horas de fermentação, praticamente todo o substrato foi consumido pela bactéria nos ensaios em que foram utilizados 20 g/L, independentemente de sua fonte. Com base na análise do mesmo gráfico da Figura 5.4, observa-se não haver inibição quanto ao consumo de glicerina PA e pouco efeito quanto ao consumo de glicerina residual por parte da bactéria. Nota-se um ligeiro efeito da glicose, no tocante ao favorecimento do consumo de glicerol (Figura 5.3, 20 g/L).

Verifica-se a assimilação total da glicose nas 16 primeiras horas (Tabela 5.2). Na realidade, tal fato ocorreu com 12 horas em 4 dos 6 ensaios, sendo um consumo praticamente total nos outros dois (50 g/L - Glicerina residual e 80 g/L - Glicerina residual). Resultados semelhantes foram obtidos por Jalasutram et al. (2011), durante a fermentação utilizando *Klebsiella pneumoniae* 141B na produção de 1,3-PD em glicerina residual. Contrariamente ao observado, Alvarez et al. (2004) citam que durante a fermentação em condições aeróbias, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* em meio glicerol/glicose, o início do consumo de glicerol ocorreu somente após completa exaustão da glicose do meio, sendo o tempo de fermentação aumentado de 8,0 para 9,5 horas. Quanto às

concentrações de 50 e 80 g/L de glicerol, verifica-se que o consumo do substrato foi de cerca de 27 g/L para a glicerina PA e 18,0 g/L para a glicerina residual. Constata-se, portanto uma inibição do consumo de glicerol quando se aumenta sua concentração para os valores mencionados, independentemente de ser a fonte de carbono pura ou proveniente do resíduo tratado. Cabe destacar que, sendo o glicerol proveniente do resíduo tratado, o consumo do substrato foi ainda menor. Isto indica que o tratamento não foi eficiente para remover todos os componentes potencialmente inibidores do micro-organismo empregado na fermentação. No entanto, para definição da concentração de substrato a ser empregada nos ensaios subsequentes, é necessário avaliar este grupo de ensaios em termos da formação dos produtos de interesse.

Na Figura 5.5 é apresentada a concentração celular final nos ensaios com 20,0 g/L, 50,0 g/L e 80 g/L de glicerol, com e sem co-substrato glicose e, na Tabela 5.3 são apresentados os resultados de produtividade em células e os fatores de conversão do substrato em células, nas três concentrações de glicerol estudadas. Na Figura 5.6 são apresentados os gráficos de concentração celular em função do tempo, também para os ensaios com 20,0 g/L, 50,0 g/L e 80 g/L de glicerol, tanto proveniente da glicerina PA quanto da glicerina residual tratada.

Figura 5.5-Concentração final de células dos ensaios com a bactéria *K. pneumoniae* em meio correspondentes às três concentrações de glicerina inicial.

Figura 5.6- Variação da concentração celular da bactéria *Klebsiella pneumoniae* em 20,0 g/L, 50,0 g/L e 80 g/L de glicerol, proveniente da glicerina PA e residual tratada, na presença de 10% de glicose. (Continua)

Figura 5.6 - Variação da concentração celular da bactéria *Klebsiella pneumoniae* em 20,0 g/L, 50,0 g/L e 80 g/L de glicerol, proveniente da glicerina PA e residual tratada, na presença de 10% de glicose.

Tabela 5.3 - Parâmetros fermentativos referentes as fermentações em meios contendo glicerina residual e glicerina PA.

Glicerina residual							
		20 g/L		50 g/L		80 g/L	
Glicose		presente	ausente	presente	ausente	presente	ausente
$Y_{X/S}$ g/g		0,084	0,072	0,094	0,110	0,099	0,095
Q_x (g/L.h)		0,092	0,065	0,117	0,107	0,129	0,084
Glicerina PA							
Glicose		presente	ausente	presente	ausente	presente	ausente
$Y_{X/S}$ g/g		0,130	0,161	0,112	0,135	0,114	0,156
Q_x (g/L.h)		0,147	0,156	0,176	0,172	0,200	0,203

Diferentemente do que foi avaliado anteriormente quanto ao consumo de glicerol, a glicerina residual parece causar um efeito de inibição do crescimento em todas as concentrações iniciais de substrato avaliadas. Na Figura 5.5 pode-se observar a diferença da concentração final de células quando utilizada glicerina residual e a glicerina PA. Nota-se que o crescimento celular foi superior quando utilizada glicerina PA para todas as concentrações avaliadas, sendo o meio suplementado ou não com glicose. Como de fato, todos os fatores de conversão

de substrato em células dos ensaios com glicerina residual foram menores que aqueles dos ensaios com glicerina PA (Tabela 5.3). Abbad-Andaloussi et al. (1998), estudando o efeito da glicose no metabolismo de glicerol pela bactéria *C. butyricum* DSM 5431, verificaram que, empregando apenas glicerol, 43% deste é oxidado a ácidos orgânicos para obter energia para o crescimento e 57% para produzir 1,3-Propanodiol. Com a mistura glicose-glicerol, a glicose é catabolizada pelas células para produzir energia enquanto o glicerol é usado principalmente para produção de 1,3-Propanodiol e 2,3 butanodiol. No presente trabalho, todos os ensaios onde foi utilizada glicose como co-substrato apresentaram concentrações finais de células superiores aos ensaios sem co-substrato. Embora o aumento da concentração de substrato (glicerina residual) de 20 para 50 g/L tenha levado a uma maior concentração de celular final, o seu aumento de 50 g/L para 80 g/L foi prejudicial ao crescimento (Figura 5.5). Como a glicerina residual é uma fonte de substrato complexa, pode haver inúmeros interferentes no meio. Os tipos e as quantidades dos compostos potencialmente tóxicos variam de acordo com a matéria-prima utilizada e com as condições de tratamento. Assim, como o meio com glicerina residual apresenta elevadas concentrações de fosfato, devido ao tratamento empregado, este pode ter prejudicado o crescimento celular e, conseqüentemente, a produtividade em células. Nos ensaios com glicerina residual a produtividade volumétrica de células aumentou com adição de glicose no meio. Xiu et al. (2011) observaram que houve um aumento significativo da biomassa quando utilizado glicerol-glicose na produção de 1,3-PD. Zheng et al. (2008) mostraram oscilações em todos os parâmetros fermentativos quando glicerol e glicose foram empregados simultaneamente na produção de 1,3-PD com a bactéria *Klebsiella pneumoniae*.

Nas Figuras 5.7 e 5.8 estão apresentadas as concentrações finais de 1,3-PD e 2,3-BD, respectivamente, obtidas com 20 horas de fermentação referentes aos ensaios com glicerina PA e residual, nas três concentrações de glicerol em estudo. As concentrações dos produtos em função do tempo para o conjunto de ensaios estão apresentadas nas Figuras 5.9 e 5.10 e os perfis da fermentação no que se refere à produção de 1,3-PD e 2,3-BD por *Klebsiella pneumoniae* nas três concentrações de glicerol são apresentados na Figura 5.9 e 5.10. A primeira observação que se destaca é a menor produção de 1,3-PD nos meios contendo

glicerina residual, com 50 g/L e 80 g/L quando comparada com o meio contendo glicerina PA. Ou seja, o emprego da glicerina residual nestas concentrações prejudica a produção deste diol (Figura 5.7). Isto provavelmente está relacionado com a existência de substâncias que interferem no metabolismo da bactéria que leva a formação de 1,3-PD.

Por outro lado, a produção de 2,3-BD foi semelhante tanto no meio com glicerina PA, quanto naquele com glicerina residual, sendo esta ligeiramente superior na concentração de 50 g/L (Figura 5.8). O fato de a glicerina residual interferir acentuadamente na formação de 1,3-PD e praticamente não interferir na formação de 2,3-BD pode ser devido aos diferentes caminhos metabólicos que levam a estes produtos, de forma que substâncias prejudiciais para o primeiro, não são também prejudiciais para o segundo. Verifica-se que para as condições de fermentação empregadas, não é vantagem utilizar concentração maior que 50 g/L. Por outro lado, o aumento de 20 g/L para 50 g/L proporciona um nítido ganho na produção de 2,3-BD, com as duas fontes de glicerol.

Na Tabela 5.4 estão apresentados os parâmetros fermentativos de produção de 1,3-PD e 2,3-BD para cada ensaio e em cada concentração de glicerol, suplementado ou não com glicose.

Figura 5.7 - Concentrações finais de 1,3-PD em função da concentração de glicerol, com 20 horas de fermentação.

Figura 5.8 - Concentrações finais de 2,3-BD em função da concentração de glicerol, com 20 horas de fermentação.

Figura 5.9 – Concentrações de 1,3-PD em função do tempo, nas três concentrações de glicerol, durante a fermentação dos meios contendo glicerina PA e glicerina residual PA. (continua)

Figura 5.9- Concentrações de 1,3-PD em função do tempo, nas três concentrações de glicerol, durante a fermentação dos meios contendo glicerina PA e glicerina residual PA.

Figura 5.10- Concentrações de 2,3-BD em função do tempo, nas três concentrações de glicerol, durante a fermentação dos meios contendo glicerina PA e glicerina residual PA. (continua)

Figura 5.10- Concentrações de 2,3-BD em função do tempo, nas três concentrações de glicerol, durante a fermentação dos meios contendo glicerina PA e glicerina residual PA.

Tabela 5.4 - Parâmetros fermentativos quanto à produção de 1,3-PD e 2,3-BD em glicerina residual e glicerina PA.

	Glicerina residual					
	20 g/L		50 g/L		80 g/L	
	Glicose presente	Glicose ausente	Glicose presente	Glicose ausente	Glicose presente	Glicose ausente
$Y_{P/S}$ g/g 1,3-PD	0,140	0,175	0,138	0,169	0,187	0,215
$Y_{P/S}$ g/g 2,3-BD	0,065	0,060	0,280	0,337	0,245	0,328
Q_P (g/L.h) 1,3-PD	0,152	0,160	0,172	0,166	0,203	0,197
Q_P (g/L.h) 2,3-BD	0,07	0,055	0,349	0,331	0,318	0,292
	Glicerina PA					
	Glicose presente	Glicose ausente	Glicose presente	Glicose ausente	Glicose presente	Glicose ausente
	Glicose presente	Glicose ausente	Glicose presente	Glicose ausente	Glicose presente	Glicose ausente
$Y_{P/S}$ g/g 1,3-PD	0,141	0,143	0,237	0,262	0,230	0,258
$Y_{P/S}$ g/g 2,3-BD	0,150	0,125	0,237	0,274	0,188	0,264
Q_P (g/L.h) 1,3-PD	0,158	0,140	0,372	0,334	0,403	0,340
Q_P (g/L.h) 2,3-BD	0,169	0,123	0,371	0,351	0,331	0,347

Quando observados os parâmetros de conversão de glicerol em produto, os melhores resultados foram obtidos com 50 g/L, para ambos os dióis, com 0,337 g/g para 2,3-BD em glicerina residual na ausência de glicose e 0,262 g/g para 1,3-PD em glicerina PA e também na ausência de glicose. Quanto à produção de 1,3-PD, não houve aumento destacado a partir de 50 g/L de glicerol,

em nenhum caso. A adição de glicose não diminui nitidamente o valor de $Y_{P/S}$, tanto para 1,3-PD como para 2,3-BD, quando se utiliza glicerina residual. Ocorreu uma exceção durante a produção de 2,3-BD, na qual houve um pequeno efeito da glicose, apresentando um $Y_{P/S} = 0,065$, valor ligeiramente superior em relação ao teste sem glicose, em 20 g/L de glicerina residual.

Quando utilizada glicose em conjunto com glicerina PA os resultados foram semelhantes aos testes utilizados com glicerina residual e com variações pouco expressivas nos fatores de conversão de substrato em produto. Quanto à produtividade de 1,3-PD e 2,3-BD, observaram-se melhorias em praticamente todos os ensaios quando houve adição de glicose, tanto com glicerina residual quanto com glicerina PA (exceção à produtividade de 2,3-BD no teste com 80 g/L de glicerina PA, e à produtividade de 1,3-PD com 20 g/L de glicerina residual). A melhor produtividade encontrada com glicerina residual foi 0,349 g/L.h de 2,3-BD utilizando-se 50 g/L de glicerol suplementado com glicose, valor este de apenas 6% inferior ao encontrado para glicerina PA, na mesma concentração. Diferença similar (5,7%) foi verificada na ausência do co-substrato (0,351 para 0,331 g/L.h). Assim, verifica-se que a glicerina residual praticamente não apresenta efeito negativo sobre a produtividade de 2,3-BD, a 50 g/L de substrato. Porém, para a produção do 1,3-PD, o efeito foi considerável, uma vez que houve redução de 46,2% do valor com 50 g/L de glicerina residual suplementado com glicose e reduções similares também na ausência de glicose. Quanto à concentração de glicerol, ocorreram melhorias em todos os parâmetros quando o seu aumento foi de 20 g/L para 50 g/L, mas nenhuma melhora considerável quando utilizada a concentração de 80 g/L, tanto com glicerina residual quanto com glicerina PA. A utilização da glicerina residual na fermentação oferece uma notável vantagem em relação ao uso da glicerina comercial. A maior parte dos estudos para produção microbiana de 1,3-PD vem sendo realizada com glicerol comercial, com poucos trabalhos sobre o potencial uso da glicerina residual para produção de 1,3-PD e 2,3-BD. Portanto, os resultados mostram que a bactéria *Klebsiella pneumoniae* é capaz de transformar a glicerina residual em 2,3-BD de forma similar à transformação da glicerina pura.

Portanto, com base nos resultados obtidos foi estabelecido o uso de 50 g/L de glicerina residual tratado, suplementado com 10% de glicose, nos testes posteriores do presente trabalho.

5.3. Avaliação da agitação e da necessidade de adição de extrato de levedura e elementos traços

Nesta etapa do trabalho foi investigada a necessidade adição de extrato de levedura e elementos traços para a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, assim como o efeito da agitação no seu crescimento e na produção de 2,3-BD e 1,3-PD. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e conforme descrito no item 4.5.2.

Nas Figuras 5.11 a 5.13 são apresentadas as concentrações de células, substrato e produtos, obtidas em todos os ensaios fermentativos do planejamento estatístico (item 4.5.2). Uma análise global dos gráficos permite verificar uma tendência de aumento da produção de 2,3-BD em todos os ensaios realizados em agitações superiores a 160 rpm e um menor acúmulo de 1,3-PD. No caso de 2,3-BD, todos os ensaios realizados a 200 rpm (Figura 5.13) apresentaram concentrações deste produto superiores aquelas obtidas quando os ensaios foram realizados a 160 rpm (Figura 5.11). Também foi observado, durante os ensaios, que o extrato de levedura teve influência positiva na produção de 2,3-BD. Nos ensaios 11, 14, 16 e 19, onde foram empregados 2,0 g/L de extrato de levedura, foram encontrados 19,64 g/L, 18,78 g/L, 18,46 g/L e 19,35 g/L de 2,3-BD, respectivamente, em agitação de 200 rpm. Resultados estes, superiores aos ensaios onde não foram empregados extrato de levedura e na mesma agitação (Ensaio 3, 5, 6 e 13).

Figura 5.11 – Concentração celular, de glicerol e de produtos em função tempo, obtidas durante os ensaios em que se empregou a agitação de 160 rpm. (continua).

Figura 5.11 – Concentração celular, de glicerol e de produtos em função tempo, obtidas durante os ensaios em que se empregou a agitação de 160 rpm.

Por outro lado, analisando o primeiro grupo de ensaios com agitação de 160 rpm, pode-se observar um maior acúmulo de 1,3-PD em relação aos casos em que foram empregadas maiores agitações. A maior concentração obtida foi de 6,49 g/L, com $Y_{P/S}=0,157$ g/g (ensaio 8), utilizando o extrato de levedura com concentração de 2,0 g/L na ausência de metais. Pode-se observar também que, nos ensaios com agitação de 160 rpm, onde não foi empregado o extrato de levedura (ensaios 2, 9, 10 e 15), houve um menor acúmulo de 1,3-PD e praticamente pouco efeito na concentração final de células, quando comparados com os ensaios 8, 12, 17 e 18. Também nos ensaios com agitação de 200 rpm o efeito da adição extrato de levedura não melhorou consideravelmente a conversão do glicerol em células. Nas observações dos perfis de fermentação, a suplementação com metais parece não ter apresentando efeito esperado para a melhora do processo, tanto na produção de 2,3-BD quanto de 1,3 PD. Nos ensaios 11 e 19 onde foram adicionados 2 mL da solução mãe dos íons metálicos e foram obtidas concentrações de dióis muito próximas entre si, quando comparadas com os ensaios 14 e 16, nas mesmas condições e na ausência dos metais no meio. Na literatura, poucos trabalhos envolvem o estudo do uso de elementos traços para a melhoria da produção de 2,3-BD, embora estes possam ser fundamentais para a síntese de enzimas específicas durante o processo fermentativo. Como a glicerina residual é um meio complexo, proveniente de uma fonte natural (óleo de algodão)

e aliado ao fato do processo de produção do biodiesel passar por diversos processos químicos, o mesmo pode apresentar concentrações de íons metálicos suficientemente elevadas, de forma que os metais adicionados nas concentrações do presente trabalho, não promoveram uma nítida alteração da fermentação.

Qin et al. (2006) obtiveram bons resultados quando utilizaram metais como ferro, manganês e zinco, empregando glicose como substrato. O rendimento alcançado foi de 90% do seu valor teórico e a produtividade subiu de 1,0 para 1,5 g/L.h. Nas Figuras 5.12 e 5.13 são também apresentadas as concentração celulares, de glicerol e de produtos em função tempo, obtidas durante os ensaios em que se empregou a agitação de 180 rpm e 200 rpm, respectivamente.

Figura 5.12 Concentração celular, de glicerol e de produtos em função tempo, obtidas durante os ensaios em que se empregou a agitação de 180 rpm (ponto central).

Figura 5.13 - Concentração celular, de glicerol e de produtos em função tempo, obtidas durante os ensaios em que se empregou a agitação de 200 rpm. (continua)

Figura 5.13 - Concentração celular, de glicerol e de produtos em função tempo, obtidas durante os ensaios em que se empregou a agitação de 200 rpm.

Na Tabela 5.5 são apresentadas as concentrações de glicose durante as fermentações, onde observa-se que em todos os ensaios a glicose foi consumida em menos de 20 horas e, em muitos casos, com menos de 12 horas de fermentação, similar ao observado nos ensaios do estudo da concentração de glicerol (item 5.2).

Tabela 5.5 – Concentrações de glicose durante a fermentação dos ensaios referente à matriz do planejamento fatorial 2^3 completo.

Concentrações de glicose durante os ensaios						
Ensaio	0 h	4 h	12 h	20 h	28 h	36 h
1	5	2,01	nd	nd	nd	nd
2	5	2,62	nd	nd	nd	nd
3	5	1,52	0,65	nd	nd	nd
4	5	2,14	nd	nd	nd	nd
5	5	3,21	0,35	nd	nd	nd
6	5	1,02	nd	nd	nd	nd
7	5	1,85	nd	nd	nd	nd
8	5	1,24	0,21	nd	nd	nd
9	5	2,96	1,02	nd	nd	nd
10	5	2,45	nd	nd	nd	nd
11	5	1,60	nd	nd	nd	nd
12	5	2,04	1,03	nd	nd	nd
13	5	2,01	nd	nd	nd	nd
14	5	1,26	nd	nd	nd	nd
15	5	2,87	1,57	nd	nd	nd
16	5	1,11	0,57	nd	nd	nd
17	5	1,87	0,98	nd	nd	nd
18	5	1,02	1,68	nd	nd	nd
19	5	2,65	nd	nd	nd	nd

Nd – Não detectado pela análise cromatográfica.

Obs.: Em todos os ensaios empregou-se 10% de glicose em relação à concentração inicial de glicerol.

Tal fato sugere que as diferentes condições estudadas com o planejamento fatorial não afetam o consumo de glicose. Além disso, observando-se as curvas de concentração de substrato de todos os ensaios do planejamento, pode-se dizer que a glicose é consumida pela bactéria concomitantemente com o glicerol. Sun et al. (2010), investigaram o uso de diferentes substratos, incluindo glicerol PA, glicose e uma mistura destes, na produção de 1,3-PD por *K. pneumoniae*. Segundo os autores, quando adicionado glicose ao meio constituído de glicerol PA, durante a fermentação com uma quantidade suficiente de células, há a

formação do intermediário, 3-HPA que é muito tóxico para o crescimento de muitos microrganismos, incluindo *K. pneumoniae*. Assim, o acúmulo de 3-HPA pode até provocar a cessação do crescimento celular. Quando ocorre a exaustão da glicose e o 3-HPA é consumido pelas células, o crescimento celular é retomado. Assim, a adição de baixas concentrações de glicose pode favorecer o crescimento celular no início da fermentação e em concentrações mais elevadas pode prejudicar o crescimento devido ao desvio do metabolismo da glicose para formação de 3-HPA.

Na Tabela 5.6 é apresentada a matriz de planejamento utilizada, contendo os fatores elementos traço, extrato de levedura e agitação, assim como os resultados obtidos em termos de fatores de conversão de substrato em produto (2,3-BD e 1,3-PD) e fatores de crescimento celular.

Tabela 5.6- Parâmetros fermentativos, fator de conversão de substrato em produto e fator de conversão de substrato em células em glicerina residual tratada com 10% de glicose, para todos os ensaios do planejamento fatorial 2^3 completo.

Ensaio	Variáveis			Fatores de conversão		
	Metais (mL)	Extrato de Levedura (g)	Agitação (RPM)	$Y_{P/S}$ 1,3-PD	$Y_{P/S}$ 2,3-BD	$Y_{X/S}$
1	1,0	1,0	180	0,078	0,346	0,083
2	2,0	ausente	160	0,091	0,309	0,071
3	ausente	ausente	200	0,071	0,347	0,091
4	1,0	1,0	180	0,092	0,353	0,094
5	ausente	ausente	200	0,077	0,355	0,097
6	2,0	ausente	200	0,081	0,364	0,105
7	1,0	1,0	180	0,076	0,383	0,095
8	ausente	2,0	160	0,157	0,335	0,083
9	2,0	ausente	160	0,103	0,317	0,072
10	ausente	ausente	160	0,099	0,310	0,089
11	2,0	2,0	200	0,052	0,436	0,109
12	ausente	2,0	160	0,135	0,293	0,081
13	2,0	ausente	200	0,069	0,332	0,091
14	ausente	2,0	200	0,078	0,442	0,101
15	ausente	ausente	160	0,097	0,300	0,086
16	ausente	2,0	200	0,065	0,395	0,092
17	2,0	2,0	160	0,081	0,393	0,095
18	2,0	2,0	160	0,094	0,295	0,087
19	2,0	2,0	200	0,067	0,430	0,106

Unidades: $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ (g/g)

Na Tabela 5.7 também é apresentada a matriz de planejamento utilizada, contendo os fatores elementos traço, extrato de levedura e agitação, assim como os resultados obtidos em velocidade específicas máximas de formação de produtos, consumo de substrato e formação de células.

Tabela 5.7. Parâmetros fermentativos, velocidades específicas máximas de produtos, substrato e célula em glicerina residual tratada com 10% de glicose, para todos os ensaios do planejamento fatorial 2^3 completo.

Ensaio	Variáveis			Velocidades			
	Metais (mL)	Extrato de Levedura (g)	Agitação (RPM)	μ_s	μ_x	μ_p (1,3-PD)	μ_p (2,3-BD)
1	1,0	1,0	180	1,98	0,25	0,18	0,50
2	2,0	ausente	160	0,99	0,30	0,20	0,19
3	ausente	ausente	200	2,24	0,39	0,06	0,16
4	1,0	1,0	180	3,10	0,32	0,25	0,15
5	ausente	ausente	200	3,65	0,16	0,14	0,25
6	2,0	ausente	200	2,62	0,37	0,09	0,16
7	1,0	1,0	180	3,24	0,34	0,11	0,19
8	ausente	2,0	160	3,38	0,27	0,29	0,17
9	2,0	ausente	160	2,03	0,39	0,15	0,16
10	ausente	ausente	160	2,61	0,30	0,16	0,14
11	2,0	2,0	200	4,40	0,38	0,08	0,36
12	ausente	2,0	160	2,59	0,32	0,16	0,19
13	2,0	ausente	200	3,12	0,44	0,11	0,48
14	ausente	2,0	200	2,33	0,18	0,05	0,20
15	ausente	ausente	160	2,09	0,13	0,10	0,19
16	ausente	2,0	200	2,04	0,29	0,12	0,20
17	2,0	2,0	160	2,59	0,40	0,35	0,58
18	2,0	2,0	160	2,71	0,31	0,34	0,37
19	2,0	2,0	200	2,19	0,27	0,18	0,58

μ_s , μ_x e μ_p (h^{-1})

Com base nos resultados apresentados nas Tabelas 5.6 e 5.7, verifica-se que a condição de maior aeração do meio não parece favorecer o acúmulo de 1,3-PD. Nos ensaios 11 e 13 fica evidente que com agitações em níveis superiores foram encontradas maiores velocidades específicas de formação de 2,3-BD. Já para o 1,3-PD ocorre o inverso, com baixas velocidades específicas de formação do produto.

De fato, comumente na literatura, a biossíntese de 1,3-PD é feita sob condição anaeróbia. Em condições aeróbias, o glicerol pode ser convertido a 3-HPA (3-hidroxipropanoaldeído), que é tóxico para as células (SLININGER e BOTHAST, 1985). Em condições micro-aeróbias, no entanto, verificou-se que 1,3-PD pode ser obtido por *Klebsiella pneumoniae* (WANG et al, 2001; HUANG et al., 2002; CHEN et al., 2003; CHENG et al., 2007; MA et al., 2009). Chen et al. (2003) relataram uma melhora na produtividade em 1,3-PD de 0,8 para 1,57 g/L.h alterando a fermentação de anaeróbia para micro-aeróbia. Cheng et al. (2004) aumentaram a concentração de 1,3-PD de 58,8 g/L para 70 g/L, usando uma estratégia anaeróbio-aeróbio. Estes estudos indicaram que mesmo sob aerobiose, baixas concentrações oxigênio dissolvido podem melhorar o processo de produção de 1,3-PD.

Nos ensaios referentes à agitação de 180 rpm (Figura 5.12) foram encontrados resultados inferiores aos obtidos no nível inferior quanto à produção de 1,3-PD. A agitação intermediária também não favorece a produção deste diol, favorecendo apenas a produção de 2,3-BD. Fica mais evidente na Tabela 5.6, pelos ensaios 11, 14 e 19, que a produção do 2,3-BD é favorecida quando aumenta-se a agitação e o meio é suplementado com extrato de levedura, havendo a conversão de substrato em produto com fatores de 0,436, 0,442 e 0,430, respectivamente. Silveira et al. (1993) verificaram que o suprimento de oxigênio é um dos fatores críticos que afetam o rendimento do produto e a produtividade de 2,3-BD por *Klebsiella pneumoniae*.

Jansen et al. (1984), empregando *Klebsiella oxytoca* para produção de 2,3-BD em D-xilose, verificaram que o alto suprimento de oxigênio favoreceu a formação de massa celular à custa da produção de 2,3-BD, enquanto que a diminuição do suprimento de oxigênio aumentaria o rendimento de 2,3-BD. Os autores demonstraram que o oxigênio é importante, mas seu excesso pode ser

prejudicial à produção de 2,3-BD. Portanto, é necessário estabelecer uma estratégia adequada para o controle do fornecimento de oxigênio para garantir uma produção de 2,3-BD eficiente. Sun et al. (2009) desenvolveram um processo fermentativo para produção de 2,3-BD por *K. oxytoca* em condições variáveis de fornecimento de oxigênio, o que foi realizado com mudanças na agitação durante a fermentação. Os autores utilizaram dois estágios de agitação com controle de velocidade, visando alcançar alto rendimento e alta produtividade de 2,3-BD. Nas primeiras 15 horas a velocidade de agitação foi controlada em 300 rpm para obter elevadas velocidades específicas e consequente um maior crescimento celular, em seguida a velocidade de agitação foi controlada para 200 rpm para manter a produtividade de 2,3-BD elevada. Finalmente, a concentração máxima de 2,3-BD alcançou 95,5 g/L, com o rendimento de 0,478 g/g e a produtividade de 1,71 g/L. h, obtendo uma melhoria de 22,14% quando controlado em agitação constante.

As velocidades específicas de crescimento são sensivelmente afetadas por variações de agitação. Nos ensaios 17, 13, 11 e 3 percebe-se que maiores agitações permitem altas velocidades específicas de crescimento, assim como a suplementação com extrato de levedura no nível superior. Quando empregada a agitação máxima, e a maior adição de extrato de levedura, foi obtida uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,38 \text{ h}^{-1}$, com μ_s $4,40 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_p(2,3\text{-BD})$ $0,36 \text{ h}^{-1}$. Por outro lado, apesar do extrato de levedura favorecer a velocidade de crescimento, este não apresentou uma alteração considerável de $Y_{X/S}$. Nos ensaios 11, 14, 16 e 19, onde foram utilizados 2,0 g/L de extrato de levedura e em agitação de 200 rpm, o fatores de conversão de substrato em células foram de 0,109, 0,101, 0,092 e 0,106 g/g, respectivamente. Ou seja, praticamente inalterados em comparação com os outros ensaios em que não se empregou extrato de levedura (ensaios 3, 5, 6 e 13) os quais apresentaram fatores conversão de substrato em células de 0,091, 0,097, 0,105 e 0,091 g/g, respectivamente.

O extrato de levedura é uma fonte de nitrogênio frequentemente utilizada como componente de meio para a produção de 2,3-BD. A síntese de proteínas é uma função constante do metabolismo celular, tanto para a geração de novas células, quanto para substituição de enzimas sujeitas a grande rotatividade. Como um dos principais componentes da proteína, o nitrogênio deve ser fornecido em grandes quantidades (QIN et al., 2006).

No entanto, o alto custo do extrato de levedura inviabiliza sua utilização em grandes quantidades para os processos comerciais. A fonte de nitrogênio orgânico, por outro lado, minimiza as dificuldades encontradas no processo de separação dos dióis, devido à não precipitação de sais. Assim, tentativas anteriores foram feitas para substituir o extrato de levedura do meio. Em todos os ensaios realizados, o sulfato de amônio sempre esteve presente. Sivakumar et al. (1995) testaram sulfato de amônio, vitamina B12 e elementos traços, e sugeriram que os mesmos são potenciais candidatos para substituir o extrato de levedura. Qin et al. (2006) formularam um meio com glicose e fosfato de amônio para a produção de 2,3-BD por *Klebsiella pneumoniae* e obtiveram um rendimento de 90% do valor teórico e uma produtividade de 1,5 g/L.h. Em fermentação descontínua alimentada, o rendimento e a produtividade foram melhorados com a manutenção do pH em 6,0. Foram obtidos até 92,4 g/L de 2,3-Butanodiol a partir 215,0 g/L de glicose, com rendimento de 98% do valor teórico e produtividade de 2,1 g/L.h.

Observa-se que com o aumento da agitação de 160 para 200 rpm obtem-se nitidamente maiores produtividades com 2,3-BD, independentemente dos outros dois fatores. O extrato de levedura também quando aumentado juntamente com a agitação teve influência significativa nos valores de produtividade, como pode ser visto nos ensaios 19, 17, 14 e 11.

A suplementação com elementos traço não apresenta melhoria para a produção dos dióis. Nos ensaios 2, 6 e 9 pode-se verificar baixas velocidades específicas de formação tanto de 1,3-PD como de 2,3-BD. Nos ensaios 2 e 9 onde, empregou-se a agitação de 160 rpm e adição de 2,0 mL de elementos traços apresentaram produtividade em 2,3-BD de 0,387 e 0,359 g/L.h, respectivamente. Já para 1,3-PD apresentaram produtividade de 0,114 e 0,117 g/L.h, respectivamente. Nos ensaios 10 e 15, na mesma agitação e agora sem a adição de metais, os resultados obtidos foram de 0,346 e 0,32 g/L.h de 2,3-BD e, para 1,3-PD, 0,111 e 0,066 g/L.h, respectivamente. Em 200 rpm o comportamento se repetiu.

Na Tabela 5.8 é apresentada a matriz de planejamento utilizada, contendo os fatores elementos traço, extrato de levedura e agitação, assim como os resultados obtidos em produtividade em 2,3-BD e 1,3-PD. Com base nesses resultados de

produtividade foram realizadas as análises estatística para determinar a influência dos fatores em estudo.

Tabela 5.8- Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 completo e suas variáveis e respostas.

Ensaio	Variáveis			Respostas	
	Metais (mL)	Extrato de Levedura (g)	Agitação (RPM)	Q _P 2,3-BD (g/L.h)	Q _P 1,3-PD (g/L.h)
1	1,0	1,0	180	0,424	0,096
2	2,0	ausente	160	0,387	0,114
3	ausente	ausente	200	0,433	0,089
4	1,0	1,0	180	0,394	0,103
5	ausente	ausente	200	0,421	0,091
6	2,0	ausente	200	0,436	0,097
7	1,0	1,0	180	0,462	0,091
8	ausente	2,0	160	0,385	0,180
9	2,0	ausente	160	0,359	0,117
10	ausente	ausente	160	0,346	0,111
11	2,0	2,0	200	0,545	0,066
12	ausente	2,0	160	0,353	0,163
13	2,0	ausente	200	0,424	0,089
14	ausente	2,0	200	0,522	0,092
15	ausente	ausente	160	0,32	0,104
16	ausente	2,0	200	0,513	0,084
17	2,0	2,0	160	0,448	0,092
18	2,0	2,0	160	0,322	0,102
19	2,0	2,0	200	0,537	0,084

Metais- (1,0 mL) corresponde a 25 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 4 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 50 mL de meio. (item-4.1.1)

As estimativas dos efeitos, a soma dos quadrados e a porcentagem de contribuição que cada fator tem sobre o modelo que representa a produtividade em 2,3-BD em função dos fatores nos ensaios fermentativos, são mostradas na Tabela 5.8, onde A, B e C correspondem às variáveis codificadas: elementos traço (mL), extrato de levedura (g/L) e agitação (rpm), respectivamente.

Tabela 5.9- Estimativas dos efeitos e suas contribuições no modelo proposto para 2,3-BD.

Fonte	Termos	Estimativa dos Efeitos	Soma dos quadrados	% Contribuição
Ignorado	A			
Modelo	B	0,031	0,016	17,78
Modelo	C	0,057	0,052	59,27
Ignorado	A.B			
Ignorado	A.C			
Modelo	B.C	0,019	0,0059	6,73
Ignorado	A.B.C			
Modelo	Falta de ajuste		0,0024	2,76
Erro	Erro puro		0,012	13,39

Os efeitos A, A.B, A.C e A.B.C foram ignorados devido a insignificância dos termos analisados e uma nova análise de variância foi realizada, estando os resultados apresentados na Tabela 5.9. Nesta análise observa-se que os fatores codificados para extrato de levedura e agitação tiveram sua significância comprovada pelo valor de F Fischer calculado comparado com F teórico de 0,05.. A partir desta análise verificou-se que os efeitos B, C e a interação B.C foram significativos ao nível de 91% de confiança. Esses resultados corroboram as análises realizadas anteriormente, que sinalizaram suas influências na produção de 2,3-BD.

Tabela 5.10 – Análise de variância dos fatores tempo, temperatura, concentração de sal e interações do modelo proposto na produção de 2,3-BD.

Fonte	Graus Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Prob > F
Modelo	3	0,024	21,85	0,0011
A	1	0,0017	1,45	0,2560
B	1	0,016	13,91	0,0012
C	1	0,052	46,36	< 0,0001
B.C	1	0,0059	5,27	0,0322
Curvatura	1	$5,65 \times 10^{-3}$	0,048	0,8306

$R^2=0,91$

O valor de F Fischer calculado do modelo foi de 21,85, que implica um modelo significativo. Existe uma chance de apenas 0,01% de que o F-valor ocorra devido ao ruído. Valores de "Prob> F" menores que 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos. Neste caso, B, C e B.C são termos significativos do modelo. Valores maiores do que 0,10 indicam termos não significativos. A falta de ajuste com valor de $F=0,91$ implica que a falta de ajuste não é significativa em relação ao erro puro. A falta de ajuste não significativa é desejada, pois se deseja que o modelo esteja ajustado no intervalo estudado.

O modelo linear representativo da influência da concentração do extrato de levedura (B) e da velocidade de agitação (C) sobre a resposta produtividade volumétrica de 2,3-BD corresponde a Equação 5. Com este modelo foi constituída uma superfície de resposta que mostra a influência das duas variáveis mencionadas sobre a produtividade volumétrica máxima de formação de 2,3-BD (Y) (Figura 5.14).

$$Y = 0,42 + 0,031.B + 0,057.C + 0,019.B.C \quad \text{(Equação 5)}$$

Figura 5.14 – Superfície de resposta para produtividade volumétrica máxima de 2,3-BD em função das variáveis codificadas extrato de levedura e agitação.

Na Tabela 5.10 são apresentadas as estimativas dos efeitos, a soma dos quadrados e a porcentagem de contribuição que cada fator tem sobre o modelo que representa a produtividade em 1,3-PD em função dos fatores avaliados. Os fatores A, B e C também correspondem às variáveis codificadas: elementos traço (mL), extrato de levedura (g/L) e agitação (rpm), respectivamente.

A partir desta análise verificou-se que os efeitos A, C e a interação A.C foram significativas ao nível de 88% de confiança.

Tabela 5.11-Estimativas dos efeitos e suas contribuições no modelo proposto para a produtividade em 1,3-PD.

Fonte	Termos	Estimativa dos Efeitos	Soma dos quadrados	% Contribuição
Modelo	A	-0,0095	0,00146	11,25
Ignorado	B	-	-	-
Modelo	C	-0,018	0,00529	40,69
Ignorado	A.B	-	-	-
Modelo	A.C	0,0071	0,00079	6,14
Ignorado	B.C	-	-	-
Ignorado	A.B.C	-	-	-
Modelo	Falta de ajuste	-	0,0046	35,39
Erro	Erro puro	-	0,00052	4,03

Os efeitos B, A.B, B.C e A.B.C foram eliminados por não apresentarem significância e uma nova análise de variância realizada, estando os resultados apresentados na Tabela 5.11. Nesta análise observa-se que os fatores codificados para elementos traço e agitação tiveram sua significância comprovada pelo valor de F com um coeficiente de determinação de 88%. Esses resultados estão de acordo com as análises realizadas anteriormente que sinalizam suas influências na produção de 1,3-PD.

Tabela 5.12 – Análise de variância dos fatores tempo, temperatura, concentração de sal e interações para o modelo proposto na produção de 1,3-PD.

Fonte	Graus Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Prob > F
Modelo	3	0,0025	48,04	< 0,0001
A	1	0,00146	27,91	< 0,0001
B	1	0,00016	3,10	0,0935
C	1	0,0053	100,97	< 0,0001
A.C	1	0,0008	15,23	0,0009
Curvatura	1	1,62x10 ⁻⁴	3,10	0,0935

R²=0,88

O valor de F de Fischer do modelo 48,04 implica que o modelo é significativo. Existe a chance de apenas 0,01% de que o valor de F do modelo ocorra devido ao ruído. Valores de "Prob> F" menores que 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos. Neste caso, A, C, A.C são termos significativos do modelo. Valores maiores do que 0,10 indicam os termos do modelo não significativos.

O valor de F da curvatura de 3,10 indica que há curvatura (medida pela diferença entre a média dos pontos centrais e a média dos pontos fatoriais) no intervalo do projeto. Há uma chance de apenas 9,35% de que a curvatura ocorra devido ao ruído.

O valor de F de 1,00 para a falta de ajuste indica que esta não é significativa em relação ao erro puro. Também neste caso, a falta de ajuste não significativa é desejada, pois se deseja um modelo ajustado no intervalo de valores estudado.

Assim, com base nos dados obtidos, o modelo proposto para descrever a produtividade de 1,3-PD na região em estudo é o representado pela equação 6, sendo esta um modelo linear representativo da influência dos elementos traço (A) e da velocidade de agitação (C) sobre a resposta produtividade volumétrica máxima de formação de 1,3-PD (Y). Com este modelo foi também constituído uma outra superfície de resposta mostrando a influência das duas variáveis mencionadas sobre a produtividade final de 1,3-PD (Figura 5.15).

$$Y = +0.10 - 0,0095.A - 0,018.C + 0,0071.A.C \quad \text{(Equação 6)}$$

Figura 5.15 – Superfície de resposta para produtividade volumétrica máxima de 1,3-BD em função das variáveis codificadas elementos traços (metais) e agitação.

Com os resultados da análise estatística e análise dos parâmetros fermentativos obtidos, ficou evidente a contribuição do extrato de levedura e da agitação para a produção de 2,3-BD. Já para a produção de 1,3-PD a utilização do extrato de levedura não foi significativa de acordo com o modelo proposto, mas este nutriente é indispensável para o crescimento bacteriano no processo fermentativo em estudo. Os metais não apresentaram resultados significativos, apesar do modelo proposto para 1,3-PD apresentar significância estatística. O termo (A) negativo na equação 6 indica a contribuição negativa dos elementos traço para a produtividade. Assim, foi estabelecido para os ensaios em reator de bancada que o meio continha 2,0 g/L de extrato de levedura e não se adicionariam os elementos traço. Nos ensaios em biorreator foram avaliados os efeitos do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La} inicial) e da concentração inicial de glicerina residual.

5.4. Avaliação da transferência de oxigênio e da concentração inicial de substrato

Este estudo foi realizado de acordo com um planejamento fatorial completo 2^2 , com triplicata do ponto central. Com o objetivo de se determinar as condições de transferência de oxigênio para os ensaios em biorreator de bancada, foi necessário realizar testes de agitação e aeração para cada valor de k_La inicial a ser estudado.

Na Tabela 5.13 estão apresentadas as condições de agitação e aeração empregadas para cada valor de k_La inicial em estudo. Destaca-se que as condições de agitação e aeração foram determinadas para cada concentração de substrato a ser estudada.

Tabela 5.13 – Condições iniciais de agitação e aeração correspondentes aos níveis de k_La inicial.

Glicerina residual	k_La			
	20 h^{-1}		60 h^{-1}	100 h^{-1}
	Agitação/aeração			
20 g/L	190 rpm	0,5 vvm		510 rpm 1,0 vvm
50 g/L			415 rpm 1,0 vvm	
80 g/L	280 rpm	0,5 vvm		600 rpm 1,2 vvm

Assim, nesta etapa do trabalho envolvendo fermentação em reator de bancada, foram estudados os efeitos do k_La inicial e a concentração da glicerina residual na formação de 1,3-PD e 2,3-BD. Os ensaios foram realizados de acordo com o descrito no item 4.5.3. As amostras foram recolhidas periodicamente a cada 2 horas para posterior análise de crescimento microbiano, consumo de substrato utilizado e produtos formados. Os perfis das fermentações em sistema descontínuo realizadas com glicerina residual são apresentados na Figura 5.16.

Figura 5.16 – Concentrações de células, substrato e produtos em função do tempo, durante os ensaios de fermentação em sistema descontínuo.(continua)

Figura 5.16 – Concentrações de células, substrato e produtos em função do tempo, durante os ensaios de fermentação em sistema descontínuo.(continua)

Figura 5.16 – Concentrações de células, substrato e produtos em função do tempo, durante os ensaios de fermentação em sistema descontínuo.(continua)

Figura 5.16 – Concentrações de células, substrato e produtos em função do tempo, durante os ensaios de fermentação em sistema descontínuo.

Uma análise dos perfis das concentrações de substrato mostra que o glicerina residual é assimilada pela bactéria em todas as condições estudadas. É importante mencionar que as fermentações ocorreram sem controle de pH e que devido ao acúmulo de ácidos orgânicos no meio, o pH caiu consideravelmente em todos os ensaios, com o seu valor final em cada ensaio variando entre 5,2 e 5,5.

Os valores de concentração de 2,3-BD encontrados ao final de todos os ensaios estão de acordo com os valores encontrados por Metsoviti et al. (2012) utilizando glicerina residual. Os autores obtiveram 4,8 g/L de 2,3-BD em condições de micro aeração, usando a bactéria *Klebsiella oxytoca* FMCC-197.

Em relação à produção de 1,3-PD, os resultados foram bem inferiores, exatamente devido às condições mais ricas de oxigênio empregadas no presente estudo. Nos ensaios onde foram utilizados níveis superiores de agitação e aeração ($k_L a$ 100 h⁻¹) ficou evidente a predominância do metabólito 2,3-BD. Nos ensaios 3 e 4 em que empregou-se os valores inferiores de $k_L a$ inicial as concentrações finais de 2,3-BD foram nitidamente inferiores. Inversamente à

concentração de 2,3-BD, foram encontrados 9,57 g/L e 5,29 g/L de 1,3-PD nos ensaios 3 e 4, respectivamente. Apesar do baixo valor de k_{La} inicial de 20 h^{-1} , os resultados foram inferiores quando comparados com os resultados de Metsoviti et al. (2012), que obtiveram concentrações 28,5 g/L de 1,3-PD a partir de 80 g/L de glicerina residual.

Além disso, é interessante mencionar que o crescimento celular não foi afetado com a variação da concentração de glicerina residual. No ensaio 1, onde foi empregada a concentração máxima de glicerol, foram obtidos 10,49 g/L de células. Na literatura há uma discussão muito relevante sobre essa característica por parte de algumas bactérias em relação ao consumo de glicerol. Biebl et al. (1991), em seus estudos sobre a produção de 1,3-PD utilizando a bactéria *Clostridium butyricum*, identificaram que o aumento da quantidade de substrato em concentrações superiores a 9-11% não permitiram um crescimento celular satisfatório, levando a uma diminuição da produtividade de 1,3-PD. No presente trabalho, e nos estudos de Metsoviti et al. (2012), os ensaios realizados com *K. pneumoniae* em elevadas concentrações de substrato (por exemplo, 100 g/L), apresentaram um elevado crescimento celular e nesse caso a concentração celular não foi afetada pela concentração de substrato.

Na Tabela 5.14 é apresentada a matriz de planejamento utilizada, contendo os fatores k_{La} inicial e glicerina residual, assim como os resultados obtidos em termos de fatores de conversão e produtividade volumétrica de 2,3-BD e 1,3-PD.

Fica claro na Tabela 5.14 que os fatores de conversão de substrato em produto são visivelmente afetados com a variação na concentração de substrato inicial. Nos ensaios 1 e 2 que utilizaram k_{La} inicial $100,0\text{ h}^{-1}$ apresentaram diferenças consideráveis nos fatores de conversão $Y_{P/S}$ tanto para 2,3-BD quanto para 1,3-PD quando utilizado uma menor concentração de glicerina residual, sendo o $Y_{P/S}$ de 2,3-BD aumentando de 0,165 para 0,192 g/g e $Y_{P/S}$ de 1,3-PD diminuindo de 0,152 para 0,131 g/g. Já nos ensaios 3 e 4 onde foram utilizados k_{La} inicial $20,0\text{ h}^{-1}$, quando diminui-se a concentração de glicerol inicial de 80 g/L para 20 g/L apenas o fator de conversão de $Y_{P/S}$ de 1,3-PD apresenta variação significativa, aumentando de 0,164 para 0,216 g/g.

Tabela 5.14- Matriz do planejamento fatorial 2^2 completo com os parâmetros fermentativos, fator de conversão de substrato em produto, fator de conversão de substrato em células, e produtividade em células, de 2,3-BD e 1,3-BD em glicerina residual tratado.

Ensaio	Parâmetros							
	Fatores		$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$ 1,3-PD	$Y_{P/S}$ 2,3-BD	Q_X	Respostas	
	k_{La}	Glicerol					Q_P 1,3-PD	Q_P 2,3-BD
1	100	80	0,162	0,152	0,165	0,145	0,128	0,14
2	100	20	0,169	0,131	0,192	0,115	0,076	0,112
3	20	80	0,100	0,257	0,164	0,072	0,159	0,102
4	20	20	0,178	0,265	0,216	0,088	0,265	0,072
5	60	50	0,177	0,2	0,208	0,12	0,123	0,128
6	60	50	0,208	0,211	0,213	0,138	0,126	0,13
7	60	50	0,168	0,23	0,25	0,092	0,111	0,121

Unidades: $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ (g/g) e Q_P (g/L.h)

Observa-se, com a diminuição do k_{La} inicial (ensaio 1 e 3, 80 g/L), que a produtividade de 2,3-BD decresce 27% e a produtividade volumétrica de 1,3-PD aumenta consideravelmente (24%). Esse efeito foi ainda maior quando se empregou 20 g/L de glicerol (ensaio 2 e 4), cuja diminuição de Q_P do 2,3-BD foi de 37% e o aumento de Q_P do 1,3-PD foi de 254%. Baseando-se nesses resultados e nas análises dos perfis de fermentação, pode-se destacar a importância do fornecimento de oxigênio para a produção de 2,3-BD. O mesmo acontece com a produtividade volumétrica de células, que decresce com menor disponibilidade inicial de oxigênio. Chen et al. (2003) relatam que o oxigênio dissolvido é responsável pela ativação do sistema de expressão de genes para as enzimas do Ciclo Krebs nas bactérias do gênero *Klebsiella*. Com mais energia disponível devido à produção de ATP tem-se um aumento no crescimento celular. Os autores também citam que os rendimentos e produtividades de 1,3-PD diminuem consideravelmente com a aeração, quando comparados com cultivos em sistemas anaeróbios. No presente trabalho, a maior produtividade obtida foi de 0,265 g/L.h de 1,3-PD em agitação de 190 rpm e 0,5 vvm de ar (k_{La} 20 h⁻¹). Já os autores citados tiveram uma produtividade de 0,62 g/L.h, obtida em anaerobiose.

No APÊNDICE B estão apresentados os gráficos dos valores calculados de velocidade específica de formação dos dióis, de consumo de substrato e formação

de células em função do tempo, para todos os ensaios do planejamento em estudo. As respectivas velocidades específicas máximas estão apresentadas na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 – Velocidades específicas máximas encontradas durante os ensaios fermentativos referentes a matriz do planejamento 2² completo.

Ensaios	k_La (h ⁻¹)	Glicerol (g/L)	μ_x (h ⁻¹)	μ_p (1,3-PD)(h ⁻¹)	μ_p (2,3-BD)(h ⁻¹)	μ_s (h ⁻¹)
1	100	80	0,06	0,03	0,41	0,31
2	100	20	0,68	0,11	0,11	0,94
3	20	80	0,14	0,35	0,22	0,23
4	20	20	0,061	0,086	0,073	0,60
5	60	50	0,19	0,25	0,62	0,88
6	60	50	0,059	0,15	0,16	1,04
7	60	50	0,22	0,082	0,29	0,22

Como pode ser observado no APÊNDICE B e na Tabela 5.15, as velocidades específicas de crescimento foram consideradas baixas em relação a valores encontrados na literatura. Silveira et al. (2001) determinaram uma velocidade específica máxima de crescimento de cerca de 0,8 h⁻¹, durante fermentação com *K. pneumoniae* em sacarose. Velocidades específicas de formação de 2,3-BD e consumo de substrato também tendem a ser menores com um menor fornecimento de oxigênio, tanto em 20 g/L quanto em 80 g/L de glicerina residual. Em relação ao 1,3-PD observa-se o inverso, com maiores valores de velocidade específica máxima de formação deste diol em condições de menor fornecimento de oxigênio para o meio. O que fica evidente é o fato de que quando há muita disponibilidade de oxigênio no meio de fermentação, o crescimento celular é exponencial e o 1,3-PD quase não é formado, dependendo fortemente do coeficiente de transferência de oxigênio. Um valor de k_La alto pode impedir a formação de 1,3-PD quase que completamente.

Com o objetivo de comprovar os resultados obtidos nos estudos de aeração e agitação do meio em concentrações diferentes de glicerol, foi realizada a análise estatística dos resultados do planejamento fatorial 2² completo. A matriz do planejamento com suas variáveis estudadas e os resultados de produtividade volumétrica para 1,3-PD e 2,3-BD foram apresentadas na Tabela 5.14. Na Tabela 5.16, são mostradas as estimativas dos efeitos, soma dos quadrados, erro puro e

a porcentagem de contribuição de cada variável do modelo que representa a produtividade volumétrica de 1,3-PD. Os termos K e G correspondem às variáveis codificadas: k_La (h^{-1}) e concentração de glicerina residual (g/L), respectivamente.

Tabela 5.16 - Estimativas dos efeitos e suas contribuições no modelo proposto para 1,3-PD.

Fonte	Termos	Estimativa dos Efeitos	Soma dos quadrados	% Contribuição
Modelo	K	-0,055	0,012	56,17
Modelo	G	-0,014	0,000729	3,38
Modelo	K.G	0,040	0,006241	28,97
Erro Puro		-	0,000126	0,58

A análise de variância também foi realizada, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.17. Nesta análise observa-se que todos os fatores foram significativos e com um coeficiente de determinação de 99,34%.

Tabela 5.17 – Análise de variância dos fatores k_La (K) e concentração de glicerina residual (G) e interações para o modelo proposto na produção de 1,3-PD.

Fonte	Graus Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Prob > F
Modelo	3	0,00635	100,90	0,0098
K	1	0,012	192,06	0,0052
G	1	0,000729	11,57	0,0766
K.G	1	0,00624	99,06	0,0099
Curvatura	1	0,0234	37,25	0,0258
Erro puro	2	0,00006	-	-

$R^2=0,9934$

O valor de F do modelo de 100,90 mostra que o modelo é significativo. Existe uma chance de apenas 0,98% de que este valor de F ocorra devido ao ruído. Valores de "Prob> F", neste caso, K e KG são termos significativos para o modelo em estudo. O fator G isoladamente (concentração de glicerol) não apresentou significância dentro do intervalo estudado.

O valor de F de 37,25 para a curvatura indica que esta é significativa dentro do intervalo do modelo estudado (medida pela diferença entre a média dos pontos centrais e a média dos pontos fatoriais). Existe a chance de 2,58% de que o valor de F da curvatura ocorra devido ao ruído.

Pode-se considerar que o modelo é adequado para descrever os dados observados com 95% de confiança.

Com base nos dados obtidos, o modelo proposto para descrever a produtividade volumétrica de 1,3-PD, em sistema descontínuo, utilizando glicerina residual, na região do estudo, é aquele representado pela Equação 7.

Na Figura 5.17 é apresentada uma superfície de resposta representando o modelo linear mostrando a influência das variáveis codificadas: k_{La} (K) e concentração de glicerina residual (G) sobre a resposta produtividade volumétrica de 1,3-PD, correspondente a Equação 7.

$$Q\text{-Prop} = 0,16 - 0,055.K + 0,040.K.G \quad \text{(Equação 7)}$$

Figura 5.17 – Superfície de resposta para produtividade volumétrica máxima de 1,3-PD em função das variáveis codificadas k_{La} inicial (K) e da concentração de glicerina residual (G).

Em relação à produtividade volumétrica de 2,3-BD, na Tabela 5.18 são apresentadas as estimativas dos efeitos, soma dos quadrados, erro puro e a porcentagem de contribuição de cada variável do modelo que representa a produtividade volumétrica de 2,3-BD. Os termos M e N correspondem às variáveis codificadas: $k_L a$ (h^{-1}) e Concentração de glicerina residual (g/L), respectivamente.

Tabela 5.18- Estimativas dos efeitos e suas contribuições no modelo proposto para 2,3-BD.

Fonte	Termos	Estimativa dos Efeitos	Soma dos quadrados	% Contribuição
Modelo	M	0,019	0,	49,35
Modelo	N	0,014	0,000729	27,29
Modelo	M.N	0,0005	0,006241	0,032
Erro Puro		-	0,000046	1,45

A análise de variância foi realizada e os resultados são apresentados na Tabela 5.19. Nesta análise observa-se que todos os fatores foram significativos e com um coeficiente de determinação de 0,9814%.

Tabela 5.19 – Análise de variância dos fatores tempo, temperatura, concentração de sal e interações para o modelo proposto na produção de 2,3-BD.

Fonte	Graus Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Prob > F
Modelo	3	0,000787	35,27	0,0277
A	1	0,00152	68,10	0,0144
B	1	0,000729	11,57	0,0255
A.B	1	0,000001	0,045	0,8520
Curvatura	1	0,000674	30,19	0,0316
Erro puro	2	0,000023	-	-

$R^2=0,9814\%$

O valor de F do modelo de 35,27 determina que este modelo é significativo. Existe uma chance de 2,77% de que este valor de F ocorra devido ao ruído. Os valores de "Prob> F" menores que 0,05, como as variáveis M, N e M.N implicam que estes termos são significativos no modelo. Neste. O valor do F da curvatura deste modelo em 30,19 implica que há curvatura significativa no intervalo do modelo proposto. Há uma chance 3,16% que valor de F da curvatura ocorra devido ao ruído.

Assim, pode-se considerar que o modelo é adequado para descrever os dados observados com 95% de confiança. Com base nos dados obtidos o modelo proposto para produtividade volumétrica de 2,3-BD, na região do estudo, é aquele representado pela Equação 8.

Na Figura 5.18 é apresentada a superfície de resposta representando o modelo linear mostrando a influência das variáveis codificadas: k_La (N) e concentração de glicerina residual (M) sobre a resposta produtividade volumétrica em 2,3-BD, correspondente a Equação 8.

$$Q\text{-But} = 0.11 + 0.019.M + 0.014 N - 0,0005M.N \quad (\text{Equação 8})$$

Figura 5.18 – Superfície de resposta para produtividade volumétrica máxima de 2,3-BD em função das variáveis codificadas k_La inicial (M) e da concentração de glicerina residual (N).

5.5 - Recuperação dos dióis

Para os estudos de recuperação de 1,3-Propanodiol e 2,3-Butanodiol pela técnica de *salting-out*, o meio fermentado foi inicialmente submetido à centrifugação para remoção das células. Com o objetivo de determinar a temperatura, a concentração de sal e o tempo que proporcione uma maior recuperação dos dióis do meio fermentado, foi realizado um planejamento experimental para cada sal estudado conforme descrito o item 4.5.5. Na Tabela 5.20 é apresentada a matriz de planejamento utilizada para o sal carbonato de potássio, contendo os fatores temperatura, concentração de sal e tempo de repouso, assim como os resultados obtidos em termos de recuperação dos dióis.

Tabela 5.20 - Matriz de planejamento fatorial utilizada com o sal carbonato de potássio.

Ensaio	Fatores			Resposta
	K ₂ CO ₃ (%)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Recuperação dos dióis
1	70	60	18	43%
2	70	60	6	30%
3	70	20	18	79%
4	70	20	6	82%
5	30	60	18	9%
6	30	60	6	8%
7	30	20	18	5%
8	30	20	6	5%
9	50	40	12	19%
10	50	40	12	16%
11	50	40	12	15%

Observa-se que com o aumento da temperatura de 20 °C para 60 °C (com 70% de K₂CO₃) a recuperação dos dióis diminui (ensaio 1-3 e ensaios 2-4). Em temperaturas menores o aumento da concentração de sal foi mais favorável ao processo de recuperação do que em temperaturas maiores. O melhor resultado foi obtido na temperatura de 20 °C, com 70% de sal e tempo de repouso de 6 horas. Uma característica muito importante dos dióis em estudo é que, diferente

do etanol, por terem uma cadeia carbônica maior, estes têm uma afinidade menor com compostos polares. Assim, adicionando-se sal como carbonato de potássio ou sódio, aumenta-se a polaridade da parte aquosa fazendo com que esses dióis saiam dessa fase e formando duas fases no meio, que possibilitam suas separações em funil de decantação.

Para determinação das condições ótimas de recuperação empregando-se o sal carbonato de potássio, foi realizada a análise estatística dos resultados dos ensaios do planejamento, apresentados na Tabela 5.20. As estimativas dos efeitos, erro puro e as contribuições dos termos para o modelo que representa a recuperação dos dióis em função do tempo, da temperatura e da concentração do sal, são mostrados na Tabela 5.21, onde A, B e C correspondem às variáveis codificadas: Tempo (h), Temperatura (°C) e Sal (%), respectivamente.

Tabela 5.21 - Estimativas dos efeitos e suas contribuições no modelo proposto.

Fonte	Termos	Estimativa dos Efeitos	Soma dos quadrados	% Contribuição
Modelo	A	2,63	55,125	0,72850088
Modelo	B	-9,63	741,125	9,79428973
Modelo	C	25,38	5151,125	68,0743608
Ignorado	A.B			
Ignorado	A.C			
Model	B.C	-11,38	1035,125	13,6796278
Média		32,13		
Erro	Erro Puro		8,666666	0,11453377

A análise de variância foi realizada, estando os resultados apresentados na Tabela 5.22. Nesta análise observa-se que todos os fatores foram significativos, com um coeficiente de determinação de 0,999.

Tabela 5.22 – Análise de variância dos fatores tempo, temperatura, concentração de sal de K_2CO_3 e interações.

Fonte	Graus Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Prob > F
Modelo	4	1745,625	402,8365385	< 0.0001
A-Tempo	1	55,125	12,72115385	0.0234
B-Temperatura	1	741,125	171,0288462	0.0002
C-Sal	1	5151,125	1188,721154	< 0.0001
BC	1	1035,125	238,875	0.0001
Curvatura	1	521,3674242	120,3155594	0.0004

$R^2 = 0,999$

O valor de $F=402,84$ implica que o modelo é significativo. Existe uma chance de apenas 0,01% que este valor de F ocorra devido ao ruído. Os valores de "Prob> F" para A, B, C e BC indicam que estes são termos significativos do modelo. Percebeu-se que algumas interações do modelo eram insignificantes e a retirada dessas interações foi necessária para melhorar o modelo. O valor de $F=120,32$ da curvatura implica que esta é significativa (medida pela diferença entre a média dos pontos centrais e a média dos pontos fatoriais). Há uma chance de apenas 0,04% de que o valor da curvatura ocorra devido ao ruído. Pode-se considerar que o modelo é linear e é adequado para descrever os dados observados com 99,9% de confiança dentro do espaço estudado. Com base nos dados obtidos, o modelo linear proposto para descrever a recuperação dos dióis do meio fermentado, na região em estudo, é aquele representado pela Equação 9.

Na Figura 5.19 é apresentada uma superfície de resposta representando o modelo linear mostrando a influência das variáveis temperatura (B) e percentual de carbonato de potássio (C) sobre a resposta recuperação, correspondente a Equação 9.

(Equação 9)

$$R = 32,13 + 2,63.A - 9,63.B + 25,38.C - 11,38.B.C$$

Onde:

R - Recuperação dos dióis estimada pelo modelo.

A – Tempo (h)

B – Temperatura (°C)

C - % do sal de carbonato de potássio

Figura 5.19 – Superfície de resposta para recuperação dos dióis utilizando carbonato de potássio em função das variáveis codificadas Temperatura (B) e concentração do sal (C).

Na Tabela 5.23 é apresentada a matriz de planejamento utilizada para o sal de carbonato de sódio, contendo os fatores temperatura, concentração de sal e tempo de repouso assim como os resultados obtidos em termos de recuperação dos dióis.

Tabela 5.23 - Matriz de planejamento fatorial utilizada com o sal carbonato de sódio

Ensaio	Fatores			Resposta
	Na ₂ CO ₃ (%)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Recuperação dos dióis
1	70	60	18	32%
2	70	60	6	27%
3	70	20	18	55%
4	70	20	6	50%
5	30	60	18	2%
6	30	60	6	0%
7	30	20	18	7%
8	30	20	6	9%
9	50	40	12	11%
10	50	40	12	8%
11	50	40	12	13%

Observa-se pelos resultados apresentados uma menor recuperação de dióis quando comparado com os resultados obtidos com carbonato de potássio. O melhor resultado obtido com Na₂CO₃ foi uma recuperação de 55% dos dióis na temperatura de 20 °C, com 70% de sal e tempo de repouso de 18 horas.

Garcia, (2006) apresentaram resultados de recuperação de 2,3-PD a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto usando a mesma técnica salting-out conseguindo uma recuperação de 91% do diol do meio fermentado, mostrando a eficácia no uso do carbonato de potássio. Xiu et al. (2011), utilizando a técnica de *salting-out* de extração (SOE) que emprega um sistema K₂HPO₄/etanol, etanol 21% e 17% de K₂HPO₄ (fração em massa), conseguiram uma recuperação de 99% de 2,3-BD do caldo fermentado de alcachofra.

As estimativas dos efeitos, erro puro e as contribuições dos termos para o modelo que representam a recuperação dos dióis em função do tempo, da

temperatura e da concentração do sal, são mostrados na Tabela 5.24, onde A, B e C correspondem às variáveis codificadas: Tempo (h), Temperatura (°C) e Sal (%), respectivamente.

Tabela 5.24 - Estimativa dos efeitos, erro puro e as contribuições de cada termo para o modelo.

Fonte	Termos	Estimativa dos Efeitos	Soma dos quadrados	% Contribuição
Modelo	A-Tempo	2,0	32	0,902703
Modelo	B-Temperatura	-8,25	544,5	15,36006
Modelo	C-%Sal	17,50	2450	69,1132
Ignorado	AB			
Ignorado	AC			
Modelo	BC	-4,75	180,5	5,091809
Ignorado	ABC			
Média		22,0		
Erro	Erro puro		12,66666667	0,35732

Analogamente ao planejamento com carbonato de potássio, a análise de variância foi realizada, estando os resultados apresentados na Tabela 5.25. Nesta análise observa-se que o fator tempo não foi significativo e os outros fatores apresentaram significância com um coeficiente de determinação de 99,9%.

Tabela 5.25- Análise de variância dos fatores tempo, temperatura, concentração de sal de Na_2CO_3 e interações.

Fonte	Graus Liberdade	Quadrado Médio	F Value	Prob > F
Modelo	4	801,75	126,59	0,0002
A-Tempo	1	32	5,0526	0,0879
B-Temperatura	1	544,5	85,974	0,0008
C-%Sal	1	2450	386,84	<0,0001
BC	1	180,5	28,5	0,0059
Curvatura	1	280,24	44,249	0,0027

$R^2=0,999$

O valor de $F=126,59$ do modelo implica que este é significativo. Existe uma chance de apenas 0,02% de que este valor de F ocorra devido ao ruído. Os valores de "Prob> F " para B , C e $B.C$ são termos significativos do modelo, pois são menores que 0,05, neste caso.

O valor de F da curvatura de 44,25 implica que a curvatura é significativa (medida da diferença entre a média dos pontos centrais e a média dos pontos fatoriais) na faixa de valores estudada. Há uma chance de apenas 0,27% que este valor de F do modelo ocorra devido ao ruído. O valor de $F=1,00$ para a falta de ajuste implica que esta não é significativa em relação ao erro puro. Também neste caso, pode-se considerar que o modelo é linear e é adequado para descrever os dados observados com 99,9% de confiança. Com base nos dados obtidos, o modelo proposto para descrever a recuperação dos dióis do meio fermentado empregando carbonato de sódio, na região em estudo, é aquele representado pela Equação 10.

Na Figura 5.12 é apresentada uma superfície de resposta representando o modelo linear mostrando a influência da temperatura (B) e percentual de carbonato de sódio (C) sobre a resposta recuperação, correspondente a Equação 10.

(Equação 10)

$$R = 22,0 - 8,25.B + 17,5.C - 4,75.B.C$$

Onde:

R – Recuperação dos dióis estimada pelo modelo

A – Tempo

B – Temperatura

C – % do sal de carbonato de sódio

Figura 5.20 - Superfície de resposta para recuperação dos dióis utilizando carbonato de sódio em função das variáveis codificadas Temperatura (B) e concentração do sal (C).

6. CONCLUSÕES

- O tratamento realizado na glicerina bruta foi adequado para se obter uma glicerina com elevada concentração de glicerol, e que se apresenta com aspecto límpido depois do tratamento.
- Os resultados obtidos com glicerina residual, no presente trabalho, foram comparáveis aos trabalhos da literatura com glicerol puro em relação ao 2,3-Butanodiol.
- A glicose apresentou papel importante no crescimento da bactéria favorecendo também a produção de 2,3-BD. Também foi observado que o extrato de levedura teve papel importante para melhor crescimento da bactéria no meio empregado.
- A suplementação com metais não apresentou efeito esperado para melhora do processo de produção de 2,3-BD e 1,3-PD, ou seja, não é necessário adicioná-los quando se emprega a glicerina residual tratada, proveniente da fabricação de biodiesel.
- Quando empregados valores de $k_L a$ de níveis superiores, nos estudos da fermentação em biorreator, a produção de 1,3-PD é maior e o inverso ocorre com 2,3-BD.
- O carbonato de potássio foi capaz de remover 82% dos dióis do meio fermentado enquanto o carbonato de sódio promoveu uma recuperação de apenas 55%.
- A temperatura de 20 °C foi mais adequada para recuperação dos dióis utilizando carbonato de potássio em um tempo de repouso de 6 horas.

REFERÊNCIAS

AFSCHAR, A.S.; BELLGARDT, K.H.; VAZ ROSSELL, C.E.; CZOK, A.; SCHALLER, K. The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.582-585, 1991.

AFSCHAR, A.S.; ROSSEL, C.E.; JONAS, R.; CHANTO, A.Q. Microbial Production and Downstream Processing of 2,3-Butanediol. **Journal of Biotechnology**, v.27, p.317-329, 1993.

ALAM, S.; CAPIT, F.; WEIGAND, W.A.; HONG, J. Kinetics of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: effect of initial substrate concentration and aeration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.47, p.71-84, 1990.

ARAÚJO, A.L.C.; FONSÊCA, A. L.; FERNANDES, D. B.; VALE, M. B. Avaliação dos sistemas de dessalinização de águas no semi-árido do Rio grande do norte. In: **Anais do XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**, 23, 2005, Campo Grande, p.25

BARBIRATO, F.; HIMMI, E.H.; CONTE, T.; BORIES, A. 1,3-Propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Ind Crop Prod**, v.7, p.281-289, 1998.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.18-26, 2001.

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, p.701–705, 1991.

BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.289-297, 1999.

BILGEN, S.; KELEŞ, S.; KAYGUSUZB, A.; SARIC, A.; KAYGUSUZ, K. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: a case study in Turkey. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.12, n.2, p.372-396, 2008.

BIODIESELBR. **Brasil não tem destino certo para glicerina gerada por biodiesel**, 2007a. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/brasil-destino-certo-glicerina-gerada-biodiesel-05-06-07.htm>> Acessado em: 02 Fev. 2010.

BIODIESELBR. **Glicerina de biodiesel inunda mercado do país e derruba preços**, 2007b. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/glicerina-biodiesel-inunda-mercado-pais-derruba-precos-02-05-07.htm>>. Acessado em: 09 Fev. 2011.

BIONERGIA. Canal Jornal da Bioenergia - maior aproveitamento da glicerina resultante da produção de biodiesel ainda é desafio: parte do subproduto é exportada. Editora MAC, n.42, ano 6, p.10, Nov. 2011.

BLOMQVIST, K.; NIKKOLA, M.; LEHTOVAARA, P.; SUIHKO, M.L.; AIRAKSINEN, U.; STRABY, K.B. Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. **Journal Bacteriology**, v.175, p.1392–404, 1993.

BROEKHUIS, R.R.; LYNN, S.; KING, C.J. Recovery of propylene glycol from dilute aqueous solutions by complexation with organoboronates in ion-pair extractants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry Res**, v.35, p.1206–1214, 1996.

CAO, N.; XIA, Y.; GONG, C.S.; TSAO, G.T. Production of 2,3-butanediol from pretreated corncob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of fungal cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.129–39, 1997.

CASALI, S.; GUNGORMUSLER, M.; BERTIN, L.; FAVA, F.; AZBAR, N. Development of a biofilm technology for the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) from crude glycerol, **Biochemical Engineering Journal**, v.12, n.11, p.10, 2011.

CELIŃSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2, 3-butanediol-current state and prospects. **Biotechnology Advanced**, v.27, p.715-25., 2009.

CHANDEL, A.K.; SINGH, O.V.; VENKATESWAR, L. Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: state-of-the-art. In: SINGH O.V., HARVEY S.P., 2010, editors. **Sustainable biotechnology**. Amsterdam: Springer Netherlands, v.2, p.63-81.

CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. **Advances in environmental research**, v.7, p.695-699, 2003.

CHENG, K.K.; LIU, Q.; ZHANG, J.A.; LI, J.P.; XU, J.M.; WANG, G.H. Improved 2,3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. **Process Biochemistry**, v.45, p.613–616, 2010.

CHENG, K.K.; LIU, D.H.; SUN, Y.; LIU, W.B. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. **Biotechnology Letters**, v. 26, n.11, p.911-915, 2004.

CHENG, K.K.; YANG, M.D.; ZHANG J.A.; LIU, D.H.; SUN, Y.; Jing-Ming Xu, J.M. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* from glycerol broth. **Biotechnology letters**, v.28, p.1817-1821, 2007.

COELHO, M.A.Z.; AMARAL, P.F.F.; FERREIRA, T.F.; FONTES, G.C. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v.87, p.179-186, 2009.

CUNHA, M.V.; FOSTER, M.A. Sugar-glycerol cofermentations in *Lactobacillus*: the fate of lactate. **Journal Bacteriology**, v.174, p.1013-1019, 1992.

DILLIS, S. S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, A.M.R.; SAIER, M.H. Carbohydrate transport in bacteria, **Microbiology**, v.44, p.385-418, 1980.

EITEMAN, M. A.; MILLER, J. H. Effect of succinic acid on 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. **Biotechnology Letters**, v.17, n.10, p.1057-1062, 1995.

ESENER, A.A.; ROELS, J.A.; KOSSEN, N.W.F. The influence of temperature on the maximum specific growth rate of *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p.1401-1405, 1981.

FERNANDES, A.M.; PRATA, A.M.R.; Tratamento do resíduo da produção de biodiesel a partir de óleo de algodão para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* visando a produção de inseticida biológico. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2009. Disponível em: <http://www.cobeq2009.feq.ufu.br/uploads/media/102017451.pdf> Acessado em: 02 Jul. 2010.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia, **Química Nova**, v.28 p.19-23, 2005.

FORAGE, R.; LIN, E.C.C. Dha system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB418. **Journal Bacteriology**, v.15, p.591-599, 1982.

FORSBERG, C.W. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species, **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.639-643, 1987.

FRAZER, F.R.; McCASKEY, T.A. Effect of components of acid – hydrolysed hardwood on conversion of D-xylose to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.13, p.110-115, 1991.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. The yeast III - Energy-yielding metabolism. Academic Press, New York, v.3, p.205-259, 1989.

GARCIA, A.D. **Definição das Condições Iniciais para Produção de 2,3-Butanodiol em Sistema Descontínuo Alimentado**. Dissertação (Mestrado), FAENQUIL. 74f., Lorena, 1999.

GARCIA, A.D. **Produção Fermentativa de 2,3-Butanodiol a Partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), 94f., FAENQUIL, Lorena, 2006

GARCIA, A.D.; PRATA, A.M.R. Comments on Substrate Exhaustion During *Klebsiella pneumoniae* Growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.1, p.35-40, 2000.

GARG, S.; JAIN, A. Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. **Bioresourch Technology**, v5, p.103–109, 1995.

GERVAJIO, G.C. Fatty acids and derivatives from coconut oil. In: **BAILEY'S Industrial Oil and Fat Products**, 6th ed. John Wiley & Sons, Inc. 2005. Disponível em: <http://media.wiley.com/product_data/excerpt/68/04713854/0471385468.pdf> Acesso em: 13 de Nov. 2009.

GHOSH, S.; SWAMINATHAN, T. Optimization of process variables for the extractive fermentation of 2,3-butanediol by *Klebsiella oxytoca* in aqueous two-phase system using response surface methodology. **Chem Biochem**, v.17, p.319–25, 2003.

GLOBORURAL. **Nova lei do biodiesel deve ficar pronta no início de 2012**. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/revista/common/0,,emi28396518_077_00nova+lei+do+biodiesel+deve+ficar+pronta+no+inicio+de.html> Acessado em 12 Dez. 2012.

GONÇALVES, V.L.C.; PINTO, B.P.; MUSGUEIRA, L. ; DA SILVA, J.F.C. ; MOTA, C. J. A. Biogasolina: Produção de Éteres e Ésteres da Glicerina. In: **CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL**, 2006.

GONZALEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; SOUCAILLE, P.; VASCONCELOS, I. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DGI(pSPD5). **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.96-101, 2006.

GOTTSHALK, G. **Bacterial metabolism**: 2ed, New York, Springer-Verlag, 1986, p.380.

GRAUSLUND, M.; RONNOW, B. Carbon source-dependent transcriptional regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, GUT2, from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Microbiology**, v.46, p.1096-1100, 2000.

GREENFIELD, S.; CLAUS, G.W. Isocitrate Dehydrogenase and Glutamate Synthesis in *Acetobacter suboxydans*. **Journal of bacteriology**, v.100, p. 1264-1270, 1969.

GROVER, B. P.; GARG, S. K.; VERMA, J. Production of 2,3-butanediol from wood hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.6, p.328-332, 1990.

HAO, J.; LIN, R.; ZHENG, Z.; LIU, H. and LIU, D. (2008). Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.9, p.1731-1740, 2008.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, 2001, v.2, p.114-120. (Engenharia Bioquímica).

HOLST, B.; LUNDE, C.; LAGES, F.; OLIVEIRA, R.; LUCAS, C.; KIELLAND-BRANDT, GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multi-membrane spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, **Molecular Microbiology**, v.37, p.108-124, 2000.

HONDA, S.; TORAYA, T.; FUKUI, S. In situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B12-dependent enzymes, glycerol dehydratase, and diol dehydratase. **Journal Bacteriology**, v.143, p.1458-65, 1980.

HOUDT, R.V.; AERTSEN, A.; MICHIELS, C.W. Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila* AH-1N. **Res Microbiol**, v.158, p.379-85, 2007.

HUANG, H.; JUN, X.J.; OUYANG, P.K. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review, **Biotechnology advances**, v.29, p.351-364, 2011.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MAT-SUI, T.; NISHIO, M. Hydrogen and ethanol production from glycerol containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal Bioscience Bioengineering**, v.100, p.260-265, 2005.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. A guide to iupac nomenclature of organic compounds – recommendations by Blackwell scientific publications, 1993.

JALASUTRAM, V.; JETTY, A.; ANUPOJU, G.R., Fermentative conversion of raw glycerol into 1,3-propanediol by isolated *Klebsiella pneumoniae* 141B stain: Optimization of culture variables. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 18493-18502, 2011.

JANSEN, N.B.; FLICKINGER, M.C.; TSAO, G.T. Production of 2,3-butanediol from D-Xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p.362-369, 1984.

JANSEN, N.B.; TSAO, G.T. Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology**, v.27, p.85-99, 1983.

JI, X.J.;HUANG, J.; JUN D.; JIAN-GUO Z.; LU-JING R.; NAN H.; SHUANG, L. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. **Bioresource Technology**. v.100, n.13, p.3410-3414, 2009.

JIANG, B.; LI, Z.G.; DAI, J.Y.; ZHANG, D.J.; XIU, Z.L. Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/phosphate system. **Process Biochemistry**, v.44,p.112–117, 2009

KIRKOTHEMER, E. T. Glycerol. In:**ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY**. ed.5, New York: John Wiley, 2007.

KRAUS, G.A. Synthetic Methods for the Preparation of 1,3-Propanediol. **Clean – soil, air, water**, v.36, p.648–651, 2008.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C.; Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, v.45, p.2577, 1999.

LAGES, F.; LUCAS, C. Hysiological characterization of mediated glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.8, p.1322, 1997.

LI, D.; DAI, J.Y.; XIU, Z.L. A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Bioresource Technology**, v.101, p.8342–7, 2010.

LUERCE, R. F. **Produção de Acetoína por *Bacillus polymyxa***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis,SC, 2002.

LUYTEN, K.; ALBERTYN, J.; SKIBBE, W.F.; PRIOR, B.A; RAMOS, J.; THEVELEIN, J.M.; HOHMANN, S. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. **EMBO Journal**, v.14, p.1360–1371, 1995.

MA C.Q.; WANG A.; QIN, J.; LI, L.; AI, X.; JIANG, T. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. **Applied Microbiology and Biotechnology** , v.82, p.49–57, 2009.

MADDOX, I.S. Microbial production of 2,3-butanediol: Products of primary metabolism. **Biotechnology**, v.6, p.269-291, 1996.

MAGEE R.J.; KOSARIC N. The microbial production of 2,3-butanediol **Applied and Environmental Microbiology**, v.3, p.32:89-161, 1987.

MALAOUI, H.; MARCZAK, R. Influence of glucose metabolism by wild-type and mutant strains of *Clostridium butyricum* E5 grown in chemostatic culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.55, p.226–233, 2001.

MALINOWSKI, J.J. Reactive extraction for downstream separation of 1,3-propanediol. **Biotechnology Progress**, v.16, p.76–9, 2000.

MANCIONILA, O.F. **Purificação da glicerina bruta obtida a partir da transesterificação do óleo de algodão**. Dissertação (Mestrado) UFRGN, 106f, 2009.

METSOVITIA, M.; PARASKEVAIDIA, K.; KOUTINASA, A.; ZENGB, A.; PAPANIKOLAOU S. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. **Process Biochemistry**, v.47, p.1872–1882, 2012.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. **Microbial physiology**. Local: Wiley-Liss, 2002, p.363

MOES, J.; GRIOT, M.; KELLER, J.; HEINZLE, E.; DUNN, I.J.; BOURNE, J.R. A microbial culture with oxygen-sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, p.482–489, 1985.

MOTA, C.J. et al. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel.32 vol. São Paulo: **Química Nova**, 2009. Disponível em: <<http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2009/vol32n3/07-QN09048.pdf>> Acesso em: 24 de mar. de 2010.

NEMETH, A.; KUPESULIK, B.; SEVELLA, B. 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.659–663, 2003.

OOI, T.L.; YONG, K.C.; HAZIMAH, A.H.;DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z. Glycerol residue- A rich source of glycerol and medium chain triglycerides, **Journal of Oleo Science**, v.53, p.29-33, 2004.

OPPE, E. E. G.; SALVAGNINI, W. M.; TAQUEDA, M. E. S.: Redução da demanda energética na desidratação da glicerina obtida. CONGRESSO IBERO AMERICANO DE ENGENHARIA MECÂNICA, 8., 2007.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v.74, p.25-33, 2000.

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

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.737-744, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHEZ, P.; PARISET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. High production of 1, 3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. **Jornal of Biotechnology**, v.77, p.191–208, 2000.

PASTORI, A.D. Glicerina: resíduo da produção de biodiesel, na terminação de novilhas da raça nelore. 88f, Dissertação (Mestrado), 88f, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, 2010.

PEREGO, P.; CONVERTI A.D.E.L.; BORGHI, M. Effects of temperature, inoculum size and starchhydrolysate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresource Technology**, v.89,p.125–131, 2003.

PIRT, S.J. The oxygen requirement of growing cultures of an *Aerobacter* species determined by means of the continuous culture technique. **Journal of General Microbiology**, v.16, p.59-75, 1957.

PIRT, S.J., 1975. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Oxford, Scientific Publications, , ed.1, 1975.

PRATA, A.M.R. Obtenção de 2,3-Butanodiol a Partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto em Regime Descontínuo Alimentado. 215f. Tese (Doutorado). FCF-USP. São Paulo. 1997

QIN, J.Y.; XIAO, Z.J.; MA, C.Q.; XIE, N.Z.; LIU, P.H.; XU, P. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. **Journal of Chemical Engineering**, v.14, p.132–136, 2006.

QURESHI, I.N.; MEAGHER, M.M.; HUTKINS, R.W. Recovery of 2,3-Butanediol by Vacuum Membrane Distillation. **Separation Science and Technology**, v.29, n.13, p1733-1748, 1994.

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

RBB - Rede baiana de biocombustíveis. **Purificação de glicerina bruta derivada da produção de biodiesel**, 2011. Disponível em <<http://www.rbb.ba.gov.br/index.php/links/parceiros-mainmenu-38>> Acesso em: 02 fev. 2011.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B. F.; FIORILLO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de Biodiesel. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 37, p.44-51, 2007.

ROMANO, P.; BRANDOLINI, C.; ANSALONI, C.; MENZIANI, E. The production of 2,3-Butanediol as a differentiating character in wine yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 649-653, 1998.

ROSSI, A.A.; GARCIA, A.D.; PRATA, A.M.R. Influência da concentração de ácido acético sobre a produção de butanodiol por *klebsiella pneumoniae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6.,2006, Campinas. Anais do VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Campinas : Unicamp, v. 1. p.1-6.

ROSSI, A.A. **Obtenção de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* a partir de resíduo da fabricação de biodiesel**. 2012. 163p. Tese (Doutorado em Ciências)-Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.

ROSSO, L.; LOBRY, J.R.; BAJARD, S.; FLANDROIS, JP. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.610-616, 1995.

SABLAYROLLES, J.M., GOMA, G. Production discontinue de 2,3-butanediol por *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: Effects de L'Agitation-Aeration. **Colloque Société Française de Microbiologie, IFP. Ruel-Malmaison**, p.317-333, 1982.

SADDLER, J.N.; MES-HARTREE, M.; YU, E.K.C.; BROWNELL, H.H. Enzymatic hydrolysis of various pretreated lignocellulosic substrates and the fermentation of the liberated sugars to ethanol and butanediol. **Biotechnology an Bioengineering Symposium**, v.13, p.225-238, 1983.

SAXENA, R.K.; ANAND, P.; SARAN, S.; ISAR, J. Microbial production of 1,3 propanediol: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v.27, p.895-913, 2009.

SCAPINI, L. **Avaliação do Desempenho da Osmose Reversa e da Troca Iônica para Tratamento de Efluente de Curtume Visando a Reutilização da Água**. Dissertação (Mestrado), Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, 103f, 2007.

SHELDON, R.A.; ARENDS, I.; HANEFELD, U. Chemicals from renewable raw materials. **Green chemistry and catalysis**. Local:Wiley-VCH, 2007, p. 329–88

SIGMA ALDRICH. Cotação de glicerina > 99,5% pureza. Disponível em:<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=G7893|SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC>. Acesso em: set. 2012

SILVEIRA, M. M.; MOLINA, Marília A Berbert de; PRATA, A. M. R.; SCHMIDELL, W. . Production of 2,3-butanediol from sucrose by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199 in batch and fed-batch reactors. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 41, n.3, p. 329-334, 1998.

SILVEIRA, M.M.; BERBERT, A.M.; SCHMIDELL, S.B. Effect of the air supply on the production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199, **Journal of Biotechnology**, v.31, p.93-10, 1993.

SILVEIRA, M.M. **Estudo cinético da fermentação butileno-glicólica de sacarose por *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199**. Tese (Doutorado). EPUSP. São Paulo, p. 201f, 1991.

SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J. Optimizing aerobic conversion of glycerol to 3-hydroxypro-pionaldehyde. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p.1444–1450, 1985.

SUN, L.H.; JIANG, B.; XIU, Z.L. Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths by isopropanol/ammonium sulfate system. **Biotechnology Letters**, v.31, p.371-376, 2009.

TAQUEDA, M. E. S.; OPPE, E. E. G. ; SALVAGNINI, W. M. Desidratação da Glicerina Obtida a partir do Biodiesel por Destilação Azeotópica com Tolueno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, 4., Varginha. CD do Congresso, 2007.

TEIXEIRA, R. M. **Otimização das Condições de Cultura para a Produção de Acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii***. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 1999.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v.22, p.261-26, 2006.

TURCHIELLO, A. Biodiesel: alternativa energética, mercado, obtenção, propriedades físico-químicas e consumo/desempenho. **Química Nova**, v.28, n.1, p.19-23, 2005.

UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON. **Chemistry Department**. Disponível em: <http://www.chem.wisc.edu/deptfiles/genchem/demonstrations/Gen_Chem_Pages/11solutionspage/salting_out__making_liquid.htm>. Acesso em: dez. 2012

VOLOCH, M.; JANSEN, N.B.; LADISCH, M.R.; TSAO, G.T.; NARAYAN, R.; RODWELL, V.W. 2,3-Butanediol. In: Moo-Young M, Cooney CL, Humphrey AE, editors. **Comprehensive biotechnology**, Oxford: Pergamon/Elsevier; 1985, p.933-947.

VOLOCH, M.; JANSEN, NB, LADISH, MR, TSAO, GT, NARAYAN, R, RODWELL, VW. 2,3-Butanediol in: Comprehensive biotechnology; the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. Oxford: **Pergamon/ Elsevier**, 1985, p. 933–44.

WANG, AL.; WANG, Y.; JIANG, TY.; LI L.X.; MA, C.Q.; XU, P. Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production. **Applied Microbiology and Biotechnology** . v.87, p. 965–70, 2010.

WANG, M.; CHEN, Y.P.; CHEN, W.J. Study on the Removal of the Residual Sugar from Butanediol by Salting-out Method. **Journal of Xuzhou Institute of Technology (Natural Science Edition)**, v.3, p.22-29, 2008

WANG, Z.X.; JIAN Z.; FANG, H.; BERNARD A.P. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v.19, p.201 – 223, 2001.

WARD, G.F.; PETTIJOHN, O.G.; COGHILL, R.D. Production of 2,3-butanediol from acid-hydrolyzed starch. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.37, p.1189–94, 1945.

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

XIU, Z.L.; ZENG, A.P. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2, 3-butanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology** , v.78, p.917–926, 2008.

XIU, Z.L.; DAI, J.; ZHANG, Y. Salting-out Extraction of 2,3-Butanediol from Jerusalem artichoke-based Fermentation Broth. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. v19, n.4, p.682–686, 2011.

YANG, G; TIAN, J; LI, J. Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology** , v.73, p.1017–1024, 2007.

YANG, X.J.; KOW, L.M.; FUNABASHI, T.; MOBBS,C.V.;Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. **Diabetes**, v.48, p.1763-1772, 1999.

YONG, K.C.; OOI, T.L.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z.; HAZIMAH, A.H. Refining of crude glycerol recovered from glycerol residue by simple vacuum distillation. **Journal of oil palm research.**, v.13: p.39-44, 2001.

YU, E.K.C.; DESCHATELETS, L.; SADDLER, J.N. The Bioconversion of wood hydrolisates to butanol and butanediol. **Biotechnology Letters**, v.6, p.327-332, 1984.

ZHENG, Z.; XU, Y.; LIU, H.; GUO NN, CAI, Z.; LIU, D. Physiological mechanism of sequential products synthesis in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.100, p.923–932, 2008.

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

ZHIGANG, LI.; TENG, H.; ZHILONG, X. Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/ammonium sulfate system. **Process Biochemistry**, v.45, p.731-737, 2010.

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, p.694-699, 2002.

APÊNDICE A - Velocidades instantâneas e velocidades específicas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto em função do tempo para todos os ensaios realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio.

APÊNDICE B - Velocidade específica de formação dos dióis, de consumo de substrato e formação de células em função do tempo para todos os ensaios realizados em biorreator em sistema descontínuo.