

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL EM BIORRETORES COM CÉLULAS
IMOBILIZADAS DE *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 UTILIZANDO GLICEROL
RESIDUAL PROVENIENTE DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ELISANGELA AQUINO DE SOUZA

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
ABRIL - 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL EM BIORREATORES COM CÉLULAS
IMOBILIZADAS DE *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 UTILIZANDO GLICEROL
RESIDUAL PROVENIENTE DA PRODUÇÃO DE BODIESEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ELISANGELA AQUINO DE SOUZA

(Engenheira Agrônoma – Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
ABRIL– 2013

CIP - Catalogação na Publicação

de Souza, Elisangela Aquino

Produção de 1,3-propanodiol em biorreatores com células imobilizadas de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 utilizando glicerol residual proveniente da produção de biodiesel / Elisangela Aquino de Souza. -- 2013. 74 f.

Orientador: Marco Antônio Zachia Ayub.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. 1,3-propanodiol. 2. glicerol residual. 3. biodiesel . 4. *Klebsiella pneumoniae*. 5. imobilização celular. I. Ayub, Marco Antônio Zachia, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À Capes pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela disponibilização de infraestrutura.

Ao meu orientador, Prof. Marco Antônio Záchia Ayub, pela acolhida e pela orientação.

Aos bolsistas Paola Bandinelli e Marcelo Merten Cruz por toda ajuda.

A todos os colegas do Bioteclab, pela amizade e companhia. Em especial a Vanessa Zimmer por toda a ajuda.

Em especial:

As amigas: Lígia Abreu, Alessandra de Cesaro, Nicole Sehnenn, Lilian Hickert e Daniele Misturini Rossi, por toda ajuda durante o mestrado.

As pessoas muito especiais, meu filho Augusto, meu esposo Fabiano de Andrade, e meus Pais, pelo incentivo, compreensão, apoio, amor e paciência.

Produção de 1,3-Propanodiol em biorreatores com células imobilizadas de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 utilizando glicerol residual proveniente da produção de biodiesel .¹

Autor: Elisangela Aquino de Souza

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

RESUMO

O glicerol é gerado em grandes quantidades durante a produção de biodiesel e tem se tornado um substrato potencialmente atrativo para a produção microbiana de produtos de valor agregado como 1,3-propanodiol (1,3-PD). O presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de 1,3-PD por células imobilizadas de *K. pneumoniae* BLh-1, utilizando glicerol residual como fonte de carbono. Primeiramente, foi estudado o efeito da concentração celular e do diâmetro das esferas no sistema de imobilização. Os resultados mostraram que a melhor combinação foi 100 mg de biomassa por mL de suporte e o diâmetro de 3,40 mm, pois apresentaram a maior produtividade. Em experimentos realizados para comparar a produção de 1,3-PD com células imobilizadas e em suspensão, a produção de 1,3-PD foi similar nos dois experimentos. Mas o uso de células imobilizadas levou à obtenção de maior produtividade de 1,3-PD, devido à alta densidade celular utilizada, uma das vantagens da utilização desta técnica. Foram realizados experimentos de reutilização das células imobilizadas, para avaliar a estabilidade de produção de 1,3-PD durante cinco bateladas, nos experimentos com intervalo de tempo entre as bateladas à produção de 1,3-PD foi mais estáveis em relação ao uso das esferas sem intervalo entre as bateladas e no final da quinta batelada as esferas de alginato de cálcio estavam com sua estrutura danificadas. Para os experimentos em biorreatores melhorias na imobilização foram realizadas, para aumentar a durabilidade e a resitência das esferas. Nos experimentos em biorreatores a produção de 1,3-PD foi aproximadamente de 25 g L⁻¹ em batelada, os biorreatores contínuos atingiram o regime estacionário, após 40 h de cultivo. Este resultado foi influenciado pela queda do pH do meio de cultivo, que dificulta a produção de 1,3-PD. O controle de pH, é essencial na produção de 1,3-PD por *K. pneumoniae* BLh1, mas este desestabiliza a estrutura das esferas de alginato de cálcio. Para trabalhos futuros haverá a necessidade de buscar novas alternativas de suportes de imobilização, para que se possa controlar o pH dos experimentos, pois a imobilização celular mostrou ser uma alternativa biotecnológica viável na produção de 1,3-PD.

1. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (74 p.). Abril, 2013.

1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 in immobilized-cell bioreactors using residual glycerol from biodiesel synthesis as substrate

Author: Elisangela Aquino de Souza

Supervisor: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

ABSTRACT

Glycerol is generated in large amounts during the production of biodiesel and it is becoming a potentially attractive substrate for microbial production of value-added products such as 1,3-propanediol (1,3-PD). This research aimed at studying the production of 1,3-PD using immobilized cells of *K. pneumoniae* BLh-1 on residual glycerol as the carbon source. First, we studied the effect of cell concentration and the diameter of the beads in the immobilization system. The results showed that the best combination is 100 mg biomass by mL of support and diameter of 3.40 mm, as presented in increased productivity. In the experiments to compare the production of 1,3-PD with immobilized cells and suspension cells the production of 1,3-PD was similar in both experiments. But the use of immobilized cells led to obtaining greater productivity 1,3-PD, due to the high cell density used, one of the advantages of using this technique. Experiments were conducted reuse of immobilized cells, to assess the stability of production of 1,3-PD for five batches, in the experiments with interval between batches to the production of 1,3-PD was more stable in relation the use of beads without interval between batches and at the end of the fifth batch of the calcium alginate beads were with its damaged structure. In experiments in bioreactors the production of 1,3-PD was approximately of 25 g L⁻¹ in batch, continuous bioreactors reached steady state after 40 h of cultivation. The control of pH is essential in the production of 1,3-PD *K. pneumoniae* BLh-1, but this destabilizes the structure of the spheres of calcium alginate. Future studies will be necessary to seek new alternatives supports of the immobilization, for can control the pH of the experiments, because the immobilization cellular proved to be a viable alternative biotechnological production of 1,3-PD.

1. Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (74 p.). April, 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Biodiesel e Glicerol	5
2.2. Características, produção e aplicações de 1,3-Propanodiol	10
2.3. Produção microbiana de 1,3-propanodiol	12
2.4. Imobilização celular	17
2.5. Biorreatores com células imobilizadas	21
2.6. Limitação de transferência de massa em sistema de imobilização celular ...	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Glicerol residual	25
3.2. Microrganismo e meio de cultivo	25
3.3. Obtenção da biomassa celular para imobilização celular	26
3.4. Técnica de imobilização celular	26
3.5. Cultivos com células imobilizadas em agitador orbital	27
3.6. Cultivos com suspensão celular em agitador orbital	29
3.7. Cultivos em biorreatores tubulares com células imobilizadas	29
3.8. Testes com diferentes meios de cultivo	31
3.9. Métodos analíticos	31
3.9.1. Determinação de 1,3-propanodiol, glicerol e bioprodutos	32
3.9.2. Microscopia eletrônica das esferas com células imobilizadas	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Influência da concentração celular e do diâmetro das esferas na eficiência do sistema de imobilização	34
4.2. Comparação entre sistema com células imobilizadas e sistema com suspensão celular em agitador orbital	37
4.3. Avaliação de repetidos cultivos com células imobilizadas em agitador orbital	42

4.4.	Avaliação de diferentes meios de cultivos na produção de 1,3-PD e melhorias no sistema de imobilização	46
4.5.	Biorreatores com células imobilizados em leito fluidizado operados em batelada	49
4.6.	Biorreatores com células imobilizadas em leito fluidizado operados em batelada aliemntada	52
4.7.	Biorreatores com células imobilizadas em leito fluidizado contínuo	54
4.8.	Biorreatores com células imobilizadas em leito fixo contínuo	56
4.9.	Avaliação das imagens obtidas com microspia eletrônica (MEV)	59
5.	CONCLUSÕES	61
6.	PERSPECTIVAS	63
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	APÊNDICE 1	73
	APÊNDICE 2	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo vegetal.	6
Figura 2. Produção de biodiesel e projeções futuras de produção	7
Figura 3. Aplicações do 1,3-propanodiol.....	10
Figura 4. Metabolismo do glicerol mostrando os principais produtos formados em duas rotas diferentes.	13
Figura 5. Diferentes métodos de imobilização celular de microrganismos	19
Figura 6. Desenho do biorreator tubular utilizado nos experimentos.....	31
Figura 7. Resultados dos cultivos realizados com células imobilizadas em agitador orbital, após de 28 h de cultivo.	36
Figura 8. Resultados dos cultivos realizados em agitados orbital com células imobilizadas.....	38
Figura 9. Resultados dos cultivos realizados em agiatdor orbital com células em suspensão, após de 28 h de cultivo.	39
Figura 10. Resultados das cultivos realizadas com células imobilizadas utilizando reciclo com intervalo de tempo entre as bateladas (a) e reciclo realizado diretamente (b).....	43
Figura 11. Produção de 1,3-PD comparando diferentes meios de cultivo, com quantidades diferentes de K_2HPO_4 em agitador orbital	47
Figura 12. Aparência das esferas de alginato de cálcio imobilizadas em nova solução de $CaCl_2$ em biorreatores sem controle de pH.....	48
Figura 13. Produção de 1,3-PD em biorreatores com células imobilizadas operados em batelada.....	50
Figura 14. Produção de 1,3-PD em biorreatores com células imobilizadas operados em batelada alimentada.....	53

Figura 15. Produção de 1,3-PD em biorreatores com células imobilizadas em sistema contínuo fluidizado.	55
Figura 16. Produção de 1,3-PD em biorreatores com células imobilizadas em leito fixo contínuo.....	57
Figura 17. Imagem de Microscopia Eletrônica com esferas no início do experimento.	59
Figura 18. Imagem de Microscopia Eletrônica com esferas no final do experimento...	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes metabólitos obtidos pela conversão de glicerol por diferentes microrganismos.....	9
Tabela 2. Composição do meio de cultivo utilizado para crescimento e fermentação do microrganismo.....	26
Tabela 3. Composição dos meios de cultivo utilizados nos experimentos com quantidades diferentes de K_2HPO_4	32
Tabela 4. Resultados da concentração, produtividade e rendimento de 1,3-PD quando utilizadas células imobilizadas de <i>K. pneumoniae</i> BLh-1 sob diferentes condições de imobilização, após de 12 h de cultivo em agitador orbital.....	35
Tabela 5. Resultados de concentração, rendimento e produtividade de 1,3-PD com células imobilizadas de <i>K. pneumoniae</i> BLh-1 comparada com células em suspensão em agitador orbital.....	41
Tabela 6. Resultados de concentração, rendimento e produtividade de 1,3-PD em bateladas repetidas com intervalo de tempo entre as bateladas e uso direto das células imobilizadas, após cada batelada	44

LISTA DE ABREVIATURAS

1,3-PD	1,3-propanodiol
2,3-BD	2,3-butanodiol
DHA	Diidroxiacetona
3-HPA	3-hidroxi-propionaldeido
IC	Imobilização celular
<i>g</i>	Aceleração da gravidade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
LB	Meio Luria-Bertani

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de energia e processos sustentáveis, visando a redução da poluição ambiental, tem estimulado o mercado mundial de combustíveis tais como, bioetanol e biodiesel. Os biocombustíveis, como o biodiesel, representam uma alternativa viável e ambientalmente melhor em relação aos combustíveis fósseis. Sua produção encontra-se em crescimento, e como consequência, há um aumento na quantidade de subprodutos gerados.

O glicerol é o principal subproduto gerado na síntese de biodiesel, sendo que aproximadamente 10 % do volume total de biodiesel produzido correspondem a esse subproduto (DASARI *et al.*, 2005). O grande aumento na produção de biodiesel já surtiu efeito no preço do glicerol, o qual caiu drasticamente nos últimos anos (YAZDANI & GONZALEZ, 2007).

Com o objetivo de reduzir futuros problemas ambientais pela acumulação do glicerol e tornar a produção de biodiesel mais rentável, a implementação de estratégias biotecnológicas, que utilizem o glicerol como única fonte de carbono para obtenção de produtos de maior valor agregado, vem sendo estudada como uma promissora alternativa (RIVALDI *et al.*, 2007). Este subproduto, na forma pura, possui inúmeras aplicações industriais, como

aditivos para a indústria de alimentos, química e farmacêutica (ARRUDA *et al.*, 2007).

Várias estratégias, baseadas nas transformações químicas e biológicas, estão sendo propostas para converter o glicerol residual em produtos com maior valor agregado. A conversão biológica tem gerado bastante interesse nos últimos anos, principalmente na produção de biomassa e biomoléculas (ITO *et al.*, 2005), assim como para a produção de uma grande faixa de produtos químicos, que poderiam ser usados como produtos finais ou como precursores para a produção de outras substâncias (KOUTINAS *et al.*, 2007).

Alguns dos bioprodutos resultantes da conversão microbiana do glicerol são 1,3-propanodiol, monômero básico na indústria de polímeros, PHAs (polihidroxi-alcanoatos), ácido cítrico, bioplásticos, etanol e enzimas como as lipases.

O 1,3-propanodiol (1,3-PD) é um monômero que pode ser usado para a síntese industrial de uma variedade de compostos, incluindo poliésteres, polieters e poliuretanos. Polímeros gerados por 1,3-PD têm várias características vantajosas, tais como boa estabilidade, biodegradabilidade e elasticidade (HORNG *et al.*, 2010).

A tecnologia de imobilização celular em bioprocessos tem sido amplamente estudada e difundida nas últimas décadas, favorecendo numerosos processos biotecnológicos devido às vantagens que estes sistemas

proporcionam, como, por exemplo, o aumento da produtividade, diminuição do tempo de fermentação e redução dos riscos de contaminação.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo principal a investigação da produção de 1,3-propanodiol (1,3-PD) utilizando glicerol residual como fonte de carbono em biorreatores com células imobilizadas de *K. pneumoniae* BLh-1. Visto que, em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, houve a produção de 1,3-PD utilizando células livres em bioreatores submersos, operados em regime batelada e batelada alimentada.

Os objetivos específicos foram:

1. Determinar as condições ideais de imobilização, em relação à concentração de células e o diâmetro das esferas a ser utilizados na imobilização celular utilizando alginato de sódio como suporte;
2. Avaliar a produção de 1,3-PD por *K. pneumoniae* BLh-1 em experimentos realizados em agitador orbital, utilizando células imobilizadas e em suspensão, além de avaliar a reutilização das células imobilizadas;
3. Avaliar a produção de 1,3-PD em biorreatores com células imobilizadas de *K. pneumoniae* BLh-1 em leito fluidizado operados em regime batelada e batelada alimentada;
4. Avaliar a produção de 1,3-PD em biorreatores com células imobilizadas de *K. pneumoniae* BLh-1 em leito fixo e fluidizado operados continuamente em diferentes taxas de diluição;

5. Avaliar microscopicamente a distribuição da biomassa na superfície das esferas de alginato de cálcio através de microscopia eletrônica de varredura.

Assim, pretende-se agregar valor ao processo de síntese de biodiesel, pela recuperação do glicerol, além de contribuir para processos ambientalmente mais limpos. Adicionalmente contribuir com mais informações sobre a produção deste composto neste sistema de bioreatores com células imobilizadas. Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia (BiotecLab), do Instituto de Ciências de Tecnologia de Alimentos (ICTA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biodiesel e glicerol

O biodiesel é definido pela ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) e pela ASTM (American Society for Testing and Materials) como um combustível composto de mono-ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleos vegetais ou gorduras animais (ANP & ASTM, 2013).

O biodiesel normalmente é produzido a partir da reação de um óleo vegetal ou gordura animal, com metanol ou etanol, na presença de um catalisador, que resulta na formação de glicerina e biodiesel. Esse processo é conhecido como transesterificação (Figura 1). Além da transesterificação, existem outros processos nos quais também é possível a obtenção de biodiesel, porém, são menos utilizados como, por exemplo, o craqueamento, a esterificação e a hidroesterificação.

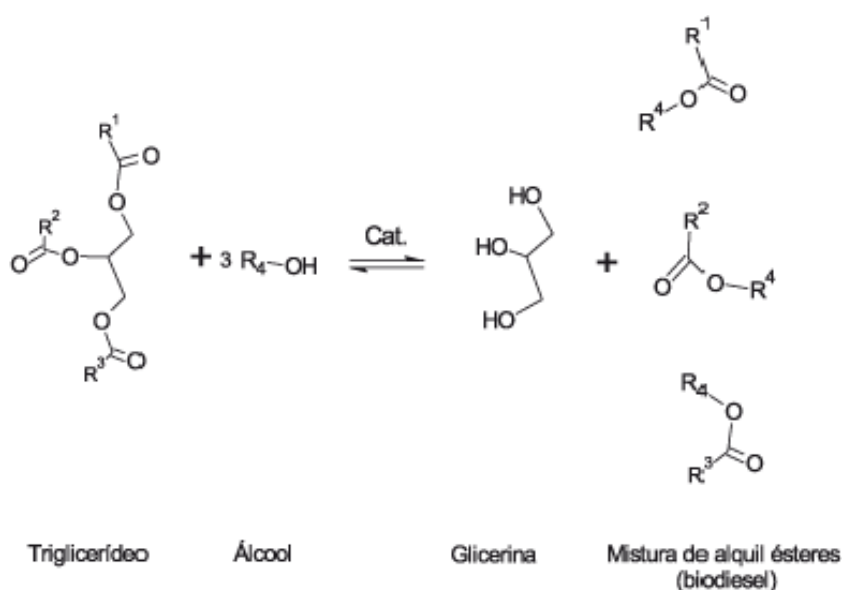


Figura 1. Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo vegetal (LÔBO & FERREIRA, 2009).

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

Com o avanço do programa nacional do biodiesel no ano de 2011 foram fabricados 2,6 bilhões de litros do biocombustível e a produção estimada para 2020 é de 14,3 bilhões de litros (Figura 2), sendo que o volume gerado de glicerol é muito acima da demanda. Em 2011 atingiu cerca de 260 mil toneladas apenas como subproduto do biodiesel, volume quase oito vezes superior à demanda, estimada em cerca de 40 mil toneladas (REVISTA FAPESP, 2012). Os mercados tradicionais do glicerol, popularmente conhecido como glicerina, termo usado para referir-se ao produto na forma comercial com

pureza acima de 95 %, são as indústrias de cosméticos, de medicamentos, de alimentos e química.

Até 1949, todo o glicerol produzido no mundo era proveniente da indústria do sabão, também como um subproduto. Depois surgiu a glicerina sintética obtida do petróleo. A partir de meados do ano 2000, quando o biodiesel começou a ser produzido em grandes volumes por vários países, houve uma explosão na produção e oferta de glicerol. Hoje, estima-se que 1,5 milhão de toneladas de glicerol são provenientes apenas das usinas de biodiesel instaladas. A Argentina, com 3,3 bilhões de litros, tornou-se, em 2011, o maior produtor mundial de biodiesel, superando os Estados Unidos (3,1 bilhões de litros), assim como o Brasil e a Alemanha (2,4 bilhões de litros cada), segundo informações da Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil (Aprobio), entidade que detém entre 60 % e 70 % da capacidade instalada de biodiesel no país (REVISTA FAPESP, 2012).

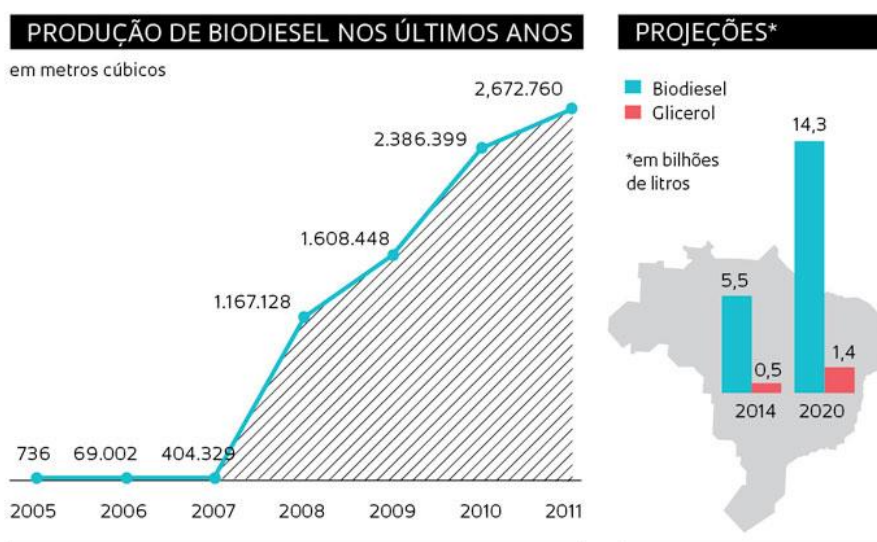


Figura 2. Produção de Biodiesel e projeções futuras de produção. (REVISTA FAPESP, 2012).

A utilização ou eliminação deste glicerol é complexa, cara e torna-se um fator de impacto na situação econômica da indústria. Um eficiente uso do glicerol gerado neste processo ainda não existe. Existem várias abordagens para converter glicerol em produtos de maior valor agregado por meio da biotecnologia ou processos químicos (WILLKE & VORLOP, 2008).

Uma alternativa promissora para valorizar este subproduto seria a sua utilização como substrato na conversão em bioprodutos como 1,3-PD (monômero básico na indústria de polímeros), PHAs (polihidroxialcanoatos), ácido cítrico, bioplásticos, enzimas tais como lipases e etanol. Quanto a este último, se for possível reintroduzir no processo do biodiesel a utilização do glicerol excedente como substrato para a produção de etanol, utilizado durante a esterificação dos óleos vegetais, seria modificada de forma importante a matriz de custos, reduzindo-a significativamente, além das reduções de resíduos gerados (WILLKE & VORLOP, 2008).

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) ou do tipo de semente utilizados, do processo e do tipo de catálise empregada na produção do biodiesel. Entretanto, o seu uso é condicionado ao seu grau de pureza, que deve estar usualmente acima de 85 % (SBRT, 2007).

A utilização de glicerol em processos microbianos é uma alternativa de grande importância. O glicerol é um composto considerado fundamental dentro do sistema metabólico de microrganismos, onde atua como precursor de numerosos compostos e como regulador de vários mecanismos bioquímicos

intracelulares. Entretanto, o principal problema para a sua utilização em processos fermentativos é a grande quantidade de sais de cloreto presente, oriundos da produção do biodiesel via catálise básica, o qual pode inibir o crescimento microbiano e diminuir a formação de produtos (ITO *et al.*, 2005). Por outro lado, o glicerol bruto contém elementos nutricionais como fósforo, magnésio, cálcio, enxofre, nitrogênio e sódio que são passíveis de serem utilizados pelos microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos (ITO *et al.*, 2005).

A fermentação do glicerol tem sido estudada principalmente em microrganismos procariontes, principalmente do gênero *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Clostridium*. A assimilação do glicerol por vários microrganismos procariontes tem primeiramente sido ligada a produção de 1,3-PD, entretanto há uma variedade de metabólitos que também podem ser sintetizados, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Diferentes metabólitos obtidos pela conversão de glicerol por diferentes microrganismos.

Microrganismo	Produto	Referência
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Xu <i>et al.</i> , 2009
<i>K. pneumoniae</i> BLh-1		Rossi <i>et al.</i> , 2012; 2013
<i>K. pneumoniae</i> DSM 4799		Jun <i>et al.</i> , 2010
<i>K. oxytoca</i> LDH3		Yang <i>et al.</i> , 2007
<i>K. oxytoca</i> ZG36	1,3-Propanodiol	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>K. oxytoca</i> Lin		Homann <i>et al.</i> , 1990
<i>Clostridium butyricum</i> AKR 102a		Wilkens <i>et al.</i> , 2012
<i>Citrobacter freundii</i> Zu		Homann <i>et al.</i> , 2012
<i>Enterobacter agglomerans</i>		Barbirato <i>et al.</i> , 1997
<i>K. pneumoniae</i> G31	2,3-Butanodiol	Petrov & Petrova, 2010
<i>Kluyvera cryocrescens</i>		Choi <i>et al.</i> , 2011
<i>K. pneumoniae</i> GEM 167	Etanol	Oh <i>et al.</i> , 2011
<i>E. coli</i> AC-521	Ácido láctico	Hong <i>et al.</i> , 2009
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	Ácido succínico	Silva <i>et al.</i> , 2009
<i>Propionibacterium acidipropionic</i>	Ácido propiônico	Silva <i>et al.</i> , 2009

2.2. Características, Produção e aplicações de 1,3-Propanodiol

O 1,3-Propanodiol (1,3-PD) é um composto viscoso, incolor, não é inflamável e apresenta baixa toxicidade. É um composto miscível em água, álcoois e éteres, sua fórmula química é $C_3H_8O_2$ (KAUR *et al.*, 2012). O 1,3-PD é um valioso intermediário químico, potencialmente usado na fabricação de polímeros (entre outros, poliésteres, polieteres, poliuretanos), cosméticos, lubrificantes, medicamentos e como um intermediário na síntese de componentes heterocíclicos (MENZEL *et al.*, 1997; BIEBL *et al.*, 1999), além de outras aplicações (Figura 3).

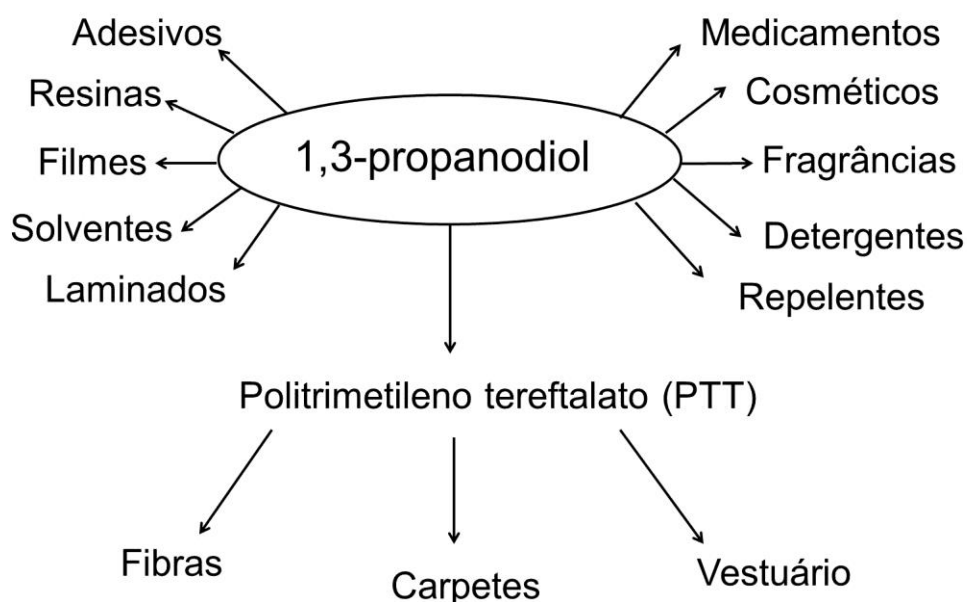


Figura 3. Aplicações do 1,3-propanodiol (adaptado de KAUR *et al.*, 2012).

Recentemente, 1,3-PD começou a ser usado como um monômero para síntese de um novo tipo de poliéster, o polítrimetileno tereftalato (PTT) (BIEBL *et al.*, 1999; ZENG & BIEBL, 2002; LIU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Polímeros gerados por 1,3-PD têm várias características vantajosas, tais

como boa estabilidade, biodegradabilidade e elasticidade (HORNG *et al.*, 2010).

O 1,3-PD foi identificado em 1881 por August Freund, como um produto da fermentação do glicerol por *Clostridium pasterianum*. Em 1914, o *Bacillus* sp. que produzia esta substância foi descrita por Voisent. Em 1928, a Escola de Microbiologia de Delft começou a analisar o processo fermentativo de diferentes *Enterobactérias* produtoras de 1,3-PD. Entretanto o primeiro *Clostridium* sp. produtor de 1,3-PD foi descrito somente em 1983 (NAKAS *et al.*, 1983; BIEBL *et al.*, 1999).

No passado, 1,3-PD era produzido somente quimicamente por dois métodos: a hidratação da acroelina ou a hidroformilação do etileno. A síntese química, entretanto, tem muitas desvantagens: requer altas pressões, altas temperaturas e presença de catalisadores. Conseqüentemente, o custo de produção do 1,3-PD é muito alto (IGARI *et al.*, 2000). Uma atraente alternativa à síntese química é a conversão microbiana, este método é particularmente atrativo, pois pode utilizar diferentes matérias-primas para a produção de 1,3-PD e não gera subprodutos tóxicos.

Porém, a maior limitação para a produção microbiana industrial de 1,3-PD é o relativo alto custo de alguns substratos tais como a glicose. Uma solução economicamente atrativa para este problema pode ser o uso de glicerol residual como substrato de fermentação (NAKAMURA *et al.*, 2000; MU *et al.*, 2006).

2.3. Produção microbiana de 1,3-propanodiol

As pesquisas mais importantes na utilização biotecnológica do glicerol bruto apontam principalmente à produção do 1,3-PD. Atualmente, este composto é produzido a partir de derivados do petróleo, óxido de propileno, mediante processos químicos convencionais (RIVALDI *et al.*, 2007).

A biotransformação de glicerol residual é principalmente baseada na transformação do glicerol por microrganismos incluindo os gêneros *Clostridium*, *Citrobacter* e *Klebsiella* em produtos de valor agregado. Comparada à síntese química, a biotransformação tem como vantagem a utilização de recursos renováveis mais baratos como o glicerol e não gera bioprodutos tóxicos (HORNG *et al.*, 2010).

Nas rotas envolvendo o metabolismo anaeróbico do glicerol (Figura 4), é demonstrado que este é fermentado por um processo de dismutação que envolve duas rotas paralelas. Numa rota o glicerol é convertido em diidroxiacetona (DHA) pela enzima glicerol dehidrogenase, a qual então seguindo via glicolítica até o piruvato. A partir do piruvato, finalmente, vários coprodutos podem ser formados, tais como ácidos e álcoois. O glicerol é transformado na segunda rota pela coenzima B12 – dependente da enzima glicerol desidratase para 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA), o qual então é reduzido pelo NADH_2 para 1,3-PD, pela 1,3-PD:oxidoreductase. A segunda rota metabólica, a qual mantém o balanço redox da célula, é necessária para converter glicerol em 1,3-PD, e a glicerol desidratase é a enzima chave e limitante para este processo biológico (ZHANG *et al.*, 2007) .

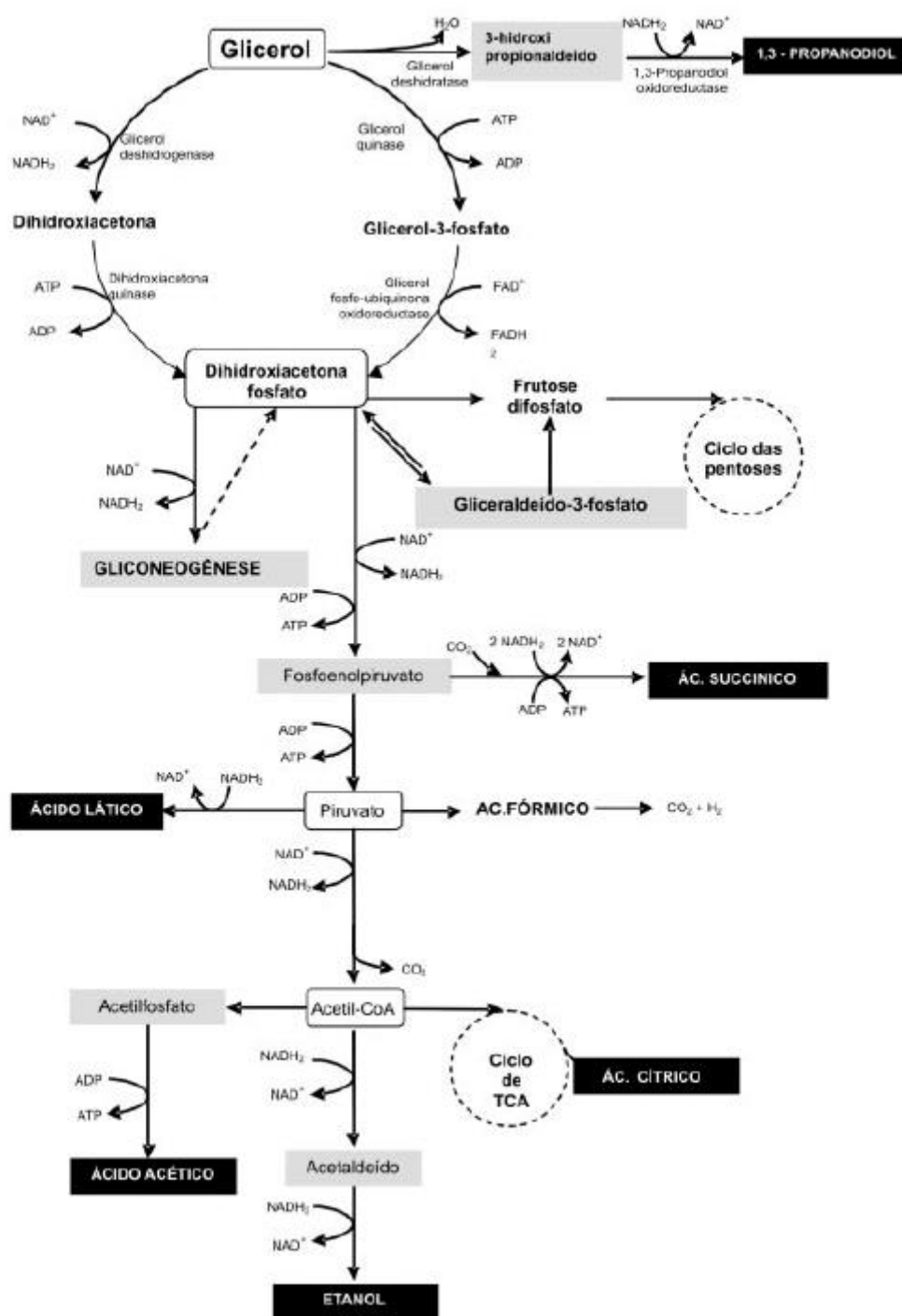


Figura 4. Metabolismo do glicerol mostrando os principais produtos formados em duas rotas diferentes (RIVALDI et al., 2007).

Um processo utilizado para a produção de 1,3-PD é a batelada alimentada, em que a adição do substrato é controlada para atingir a maior densidade de células e a maior produção de 1,3-PD (JUN et al., 2010). Embora existam inúmeros trabalhos demonstrando a maior produção de 1,3-PD usando batelada alimentada, poucos trabalhos avaliam a viabilidade do glicerol residual como substrato para produção de 1,3-PD com espécies *Klebsiella*. MU et al. (2008) utilizaram *K. pneumoniae*, para a produção de 1,3-PD com glicerol comercial e glicerol residual subproduto da produção de biodiesel em fermentação em batelada alimentada. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que houve produção de 53 g L⁻¹ de 1,3-PD utilizando glicerol residual e 62 g L⁻¹ de 1,3-PD com glicerol comercial. Demonstrando assim a possibilidade de se utilizar o glicerol residual como substrato para produção microbiana de 1,3-PD.

No estudo realizado por HOMANN et al. (1990), foram caracterizados microrganismos anaeróbios fermentadores de glicerol, como *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca* e *K. pneumoniae*. As Citrobactérias formaram 1,3-PD e acetato, enquanto *Klebsiellas* produziram etanol em quantidades elevadas e uma baixa produção de 1,3-PD. Os estudos foram conduzidos em biorreatores de 1 L, com concentrações de glicerol de 2 e 5 % (fração volumétrica) e com pH controlado a 7,0. Outros autores também citam a produção de elevados valores de etanol, por *Klebsiella*, em baixas concentrações de glicerol (CHENG et al., 2004; CHENG et al., 2005; YING MU et al., 2006).

Diferentes estratégias de aeração também são encontradas na literatura para a produção de 1,3-PD. CHENG et al. (2004), estudaram a produção de 1,3-PD em sistemas com fluxo de N₂ e a diferentes fluxos de ar em biorreatores a 37 °C, 150 rpm e 50 g L⁻¹ de glicerol usando *K. pneumoniae* M5a1. Os autores relataram a formação de diferentes bioprodutos sob diferentes condições de aeração. O resultado obtido com cultivo em batelada alimentada, onde houve a combinação de fase aerada e ausência de oxigênio, houve produção de 70 g L⁻¹ de 1,3-PD, resultado superior aos cultivos aeróbicos (53,6 g L⁻¹) e anaeróbicos (58,8 g L⁻¹). Com o aumento do fluxo de ar, mais glicerol foi utilizado e mais biomassa formada, porém o rendimento em 1,3-PD decresceu gradualmente. Já as maiores concentrações de etanol e ácido acético foram encontradas em cultivos com batelada em anaerobiose.

CHEN et al. (2003), estudaram a produção microbiana de 1,3-PD em batelada e batelada alimentada sob condições microaeróbicas, usando *K. pneumoniae* DSM 2026. Foi verificado que as condições microaeróbicas são mais favoráveis para o crescimento celular quando comparados com condições anaeróbicas. A concentração final e rendimento de 1,3-PD sob condições anaeróbicas e microaeróbicas foram similares, entretanto, a produtividade de 1,3-PD aumentou marcadamente em condições microaeróbicas (1,57 g L⁻¹ h⁻¹) em contraste com o cultivo anaeróbico (0,8 g L⁻¹ h⁻¹). Isto se deve ao fato de que, a fermentação microaeróbica requer menos tempo do que a cultura anaeróbica para utilizar a mesma quantidade de glicerol.

Outro aspecto importante que vem sendo considerado é a imobilização de células em diferentes polímeros. O encapsulamento de células

de *K. pneumoniae* em celulose-sulfato de sódio e policloreto de metil dialil amônia, desenvolvido por ZHAO et al. (2006), permitiu realizar cultivos em batelada repetidas, batelada alimentada e processo contínuo, realizadas em agitador orbital e biorreatores de leito fixo. Os resultados mostraram que, as microcápsulas possuem desejáveis propriedades tais como, aumento da biomassa na microcápsula e maior tolerância a quantidades excessivas do substrato. Os autores relataram que a produção de 1,3-PD foi de 63 g L⁻¹ em biorreator de leito fixo em batelada e 52 g L⁻¹ em batelada alimentada com células imobilizadas, mostrando a viabilidade de produção de 1,3-PD com células imobilizadas.

Em estudo realizado por JUN et al. (2010), foram utilizadas células imobilizadas de *K. pneumoniae* por mais de 40 ciclos em biorreatores leito fixo operados em batelada alimentada, os autores observaram o aumento da produtividade de 1,06 g L⁻¹ h⁻¹ para 1,61 g L⁻¹ h⁻¹ já a partir da quarta corrida utilizando glicerol residual como substrato. Isso demonstrou que o glicerol residual pode ser utilizado para produzir 1,3-PD, sem efeitos inibitórios na produção.

É particularmente importante prestar atenção em todos os aspectos envolvendo a produção biotecnológica de 1,3-PD. Existem muitas barreiras técnicas e desafios econômicos que necessitam ser levados em conta para a realização deste processo. Atualmente, o maior problema é o baixo rendimento e produtividade, primeiramente porque os processos são realizados a temperatura fisiológica, pressão atmosférica e em modo batelada. Este problema pode ser superado pela otimização de processos, utilizando modo

contínuo e batelada alimentada de operação. Cultivos contínuos com reciclo de células imobilizadas poderiam aumentar a produtividade do processo. A utilização de engenharia genética, também pode ser usada para aumentar a produtividade por superexpressão das enzimas chaves ou limitantes para a formação do produto (SAXENA et al., 2009).

2.4. Imobilização celular

A imobilização celular (IC) consiste no confinamento físico das células em uma região definida no espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua e descontínua, possibilitando, ainda, a reutilização das mesmas.

A maioria dos processos fermentativos industriais convencionais utiliza células livres em suspensão, porém o uso de microrganismos imobilizados permite um aumento da produtividade, devido à elevada concentração de células. A maior concentração de células microbianas no suporte garante a síntese dos metabólitos e aumenta a eficiência da fermentação. Além disso, facilita a recuperação dos produtos do metabolismo de interesse na fase de “downstream” e ajuda a manutenção dos fermentadores (COVIZZI et al., 2007).

A reutilização das células imobilizadas é considerada uma das grandes vantagens da IC, principalmente quando são escolhidos suportes inertes e apresentam alta resistência mecânica (DEVI & SRIDHAR, 2000).

O aprimoramento e o desenvolvimento de novas técnicas de IC, associadas ao uso de novos materiais como suporte, têm permitido que os

processos fermentativos com células imobilizadas, fossem realizados em condições adversas de pH, de esterilidade e agitação. O que seria difícil se utilizadas células livres (COVIZZI et al., 2007).

Entre as diferentes técnicas de imobilização, encontram-se quatro categorias principais com base no mecanismo físico empregado: ligação a superfícies sólidas, aprisionamento em matrizes porosas, floculação (natural ou artificial) e contenção por membranas (Figura 5) (PILKINGTON *et al.*, 1998; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; ZHANG & FRANCO, 2002).

Sucintamente, o método de imobilização por superfícies sólidas consiste na interação entre a superfície celular e a superfície do suporte, através de ligações iônicas ou ligações covalentes. A técnica de aprisionamento em matrizes porosas caracteriza-se pela inclusão das células em uma matriz porosa que contenha poros menores do que as células, viabilizando, dessa forma, a permanência das células na matriz e a troca de fluídos no compartimento. A floculação é baseada na capacidade de adesão e agregação que alguns tipos de células apresentam quando em suspensão, podendo ser de forma natural ou artificial. Outra forma de imobilizar células consiste na contenção por barreiras, que pode ser realizada pelo uso de uma membrana microporosa, pela compartimentalização das células em uma microcápsula, ou ainda, através de uma superfície originada da interação entre dois líquidos imiscíveis (PILKINGTON *et al.*, 1998; PRADELLA, 2001; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; VERBELEN *et al.*, 2006).

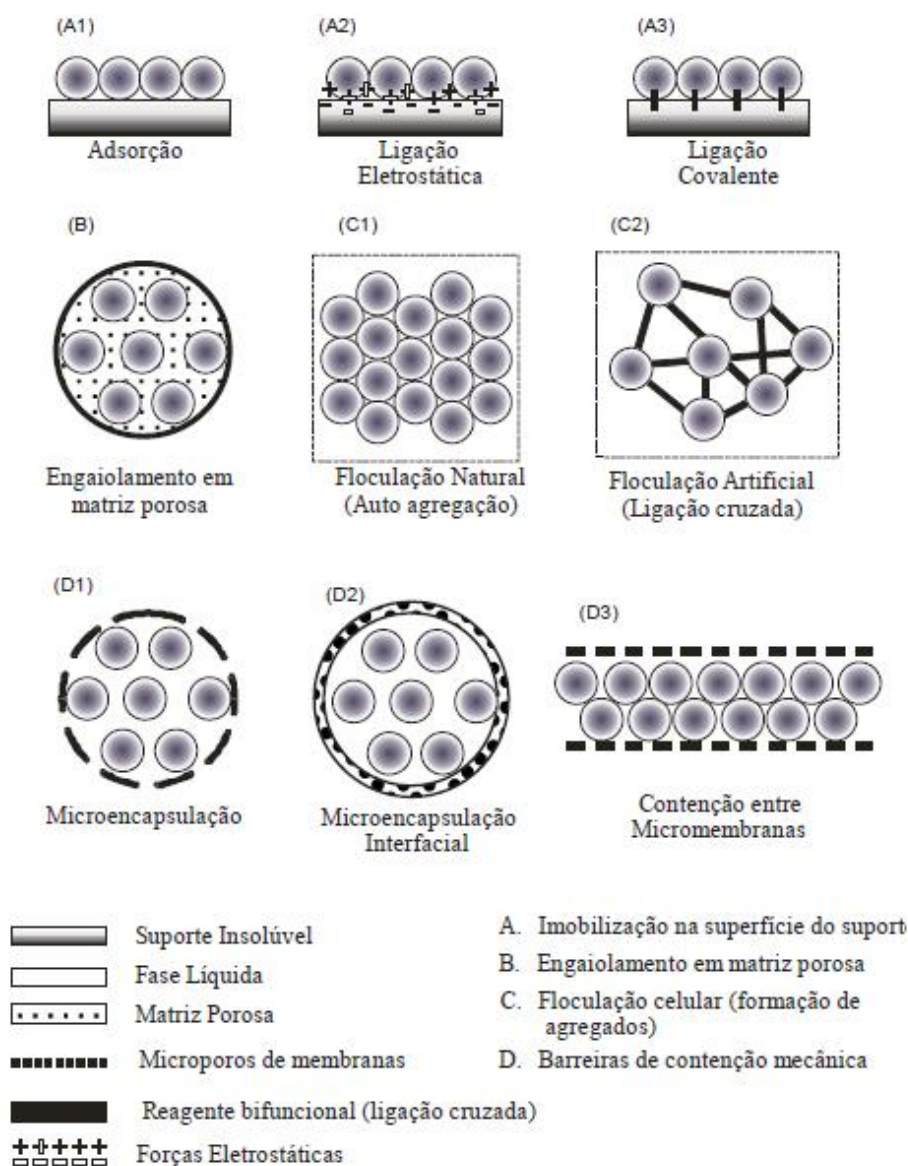


Figura 5. Diferentes métodos de imobilização celular de microrganismos, adaptado de (PILKINGTON *et al.*, 1998).

Os sistemas de imobilização apresentam vantagens como: possibilidade de utilizar alta densidade celular por unidade de volume do biorreator, o que leva ao aumento da produtividade, diminui o tempo de fermentação, proporciona a proteção contra o estresse ambiental (pH, temperatura), há maior tolerância por altas concentrações de substrato, há

diminuição da inibição pelo produto final, permite o reaproveitamento das células imobilizadas, além de possibilitar projetos de biorreator com menor escala, reduzindo, portanto, os custos de processo (PRADELLA, 2001; ZHANG & FRANCO, 2002; JUNTER & JOUENNE, 2004; VERBELEN *et al.*, 2006; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; COVIZZI *et al.*, 2007).

O aprisionamento em matrizes porosas é um dos métodos mais amplamente estudados, sendo a técnica de imobilização em alginato de cálcio uma das mais empregadas devido às inúmeras vantagens que apresenta como matriz-suporte.

Os géis de alginato de cálcio são bastante interessantes pela facilidade da técnica, alta capacidade de retenção e preservação da viabilidade celular, além de serem baratos e não tóxicos. O alginato é um polissacarídeo natural, extraído de algas marrons (*Phaeophyceae*), que apresenta cargas negativas devido à presença dos ácidos D-manurônico e L-gulurônico, os quais contêm grupos carboxílicos em sua estrutura (GROBOILLOT *et al.*, 1994).

O procedimento de imobilização consiste, basicamente, na mistura da suspensão celular com o alginato, seguido do contato dessa mistura, através do gotejamento, com uma solução contendo íons divalentes, como por exemplo, o cálcio (Ca^{2+}), que leva a formação de um gel (geleificação) devido à ligação dos polieletrólitos dos grupos carboxílicos com os íons cálcio presentes em solução, formando uma rede tridimensional (GROBOILLOT *et al.*, 1994; VELINGS & MESTDAGH, 1995; AMSDEM & TURNER, 1999; SERP *et al.*, 2001).

2.5. Biorreatores com células imobilizadas

A escolha do biorreator depende do suporte utilizado, do método de imobilização, dos requerimentos de operação e viabilidade celular, da natureza do substrato, da cinética de reação envolvida, da facilidade de regeneração do biocatalisador e dos requerimentos de transferência de massa (KOSSEVA *et al.*, 2009).

Os biorreatores de células imobilizadas possuem configuração diferente do tradicional tanque agitado contínuo (CSTR). De acordo com o padrão de escoamento, os reatores utilizados para o cultivo de células imobilizadas podem ser divididos em três grandes categorias: reatores de tanque agitado (STR), reatores de leito empacotado e reatores de leito fluidizado (FUKUDA, 1994; BARON *et al.*, 1996).

O reator de tanque agitado (STR) ideal, também chamado de reator de mistura, se caracteriza por não apresentar gradientes de concentração no meio de cultivo. A temperatura e o pH são facilmente controlados, além de oferecer ótimas características de mistura. A principal desvantagem deste tipo de biorreator consiste na elevada tensão de cisalhamento exercida sobre as matrizes de imobilização (GROBOILLOT *et al.*, 1994; KOSSEVA *et al.*, 2009).

Em reatores de leito fixo (empacotado) a coluna é preenchida com o suporte por meio da qual a alimentação passa de forma ascendente. Esse tipo de biorreator se caracteriza pela pequena ou praticamente inexistente movimentação das partículas na coluna (compactação) e pela variação da concentração do meio ao longo do comprimento do biorreator, além de

apresentar simplicidade de operação, baixo custo e altas produtividades volumétricas. Pode ocorrer acúmulo de gases e de biomassa suspensa que podem levar à formação de caminhos preferenciais, prejudicando a transferência de massa e, conseqüentemente, levando à redução das taxas de produção.

O reator de leito empacotado é o tipo de reator mais frequentemente utilizado em sistemas de imobilização, especialmente com cultivos em batelada. RIVALDI *et al.* (2008) estudaram a produção de bioetanol por dois sistemas de biorreatores diferentes (CSTR e reator de leito empacotado), utilizando como suporte PVA e verificaram melhor eficiência de conversão e produtividade em biorreator do tipo CSTR em virtude da agitação do meio, o qual permitiu uma melhor transferência de massa.

Os reatores de leito fluidizado se caracterizam pela movimentação das partículas ao longo da coluna devido a agitação do meio. Esta agitação pode ser obtida pela injeção de ar ou de um gás inerte, ou pode ser obtida através recirculação de meio no biorreator (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001). Essa movimentação contribui para a diminuição das limitações de transferência de massa do sistema. Pode-se dizer que os biorreatores de leito fluidizado representam uma fusão entre reatores de mistura completa e reatores de leito fixo, com boas condições de mistura e baixas tensões de cisalhamento. A transferência de massa é facilitada devido à homogeneização do meio e à movimentação das partículas, removendo, dessa forma, gases mais facilmente e evitando a decantação de células no fundo do biorreator. Reatores de leito fluidizado com células imobilizadas tem sido utilizados em trabalhos para a

produção de gás hidrogênio (AMORIN *et al.*, 2009) e etanol (KRISHNAN *et al.*, 1999).

2.6. Limitações de transferência de massa em sistemas de imobilização celular

A utilização de biocatalisadores imobilizados vem sendo bastante estudada, especialmente com o emprego de alginato de cálcio como suporte em virtude das vantagens que a técnica confere, contudo, esses sistemas também apresentam limitações, como resistência à difusão de substratos e produtos na partícula (ESTAPÉ *et al.*, 1992; AMSDEM & TURNER, 1999; BARRANCO-FLORIDO *et al.*, 2001).

Os sistemas de biorreatores com células imobilizadas podem ser caracterizados por dois compartimentos diferentes, ou seja, uma fase líquida que compõe o meio de cultivo e uma fase sólida, na qual se encontram os biocatalisadores imobilizados. Ambos os compartimentos são locais de reações metabólicas e de crescimento celular que se comunicam através de fenômenos difusivos.

As limitações de transferência de massa que causam efeitos negativos nas transformações bioquímicas das células são resistências que podem ser decorrentes da difusão externa, ou seja, pela resistência à transferência de substratos e produtos em direção à partícula, devido ao filme de fluido que se forma ao redor da mesma. Podem também ocorrer pela difusão interna, devido à resistência a transferência de massa no interior da própria partícula (QUIRÓS *et al.*, 1995; PILKINGTON *et al.*, 1998).

De forma geral, a difusão externa depende das condições hidrodinâmicas do fluido e de suas propriedades físicas; e a difusão interna depende de fatores como concentração celular, estrutura e tamanho da matriz-suporte e do tamanho das moléculas que se difundem através da partícula (QUIRÓS *et al.*, 1995; PILKINGTON *et al.*, 1998; PRADELLA, 2001; ZHANG & FRANCO, 2002).

Dessa forma, os efeitos da transferência de massa em biorreatores de células imobilizadas são caracterizados como fatores críticos do sistema. Os nutrientes que se encontram no meio de cultivo devem atravessar a fase líquida até alcançar a superfície da partícula, onde então, estes devem atravessar o interior da mesma, chegando finalmente às células. Contraditoriamente a isso, o produto celular deve realizar o caminho oposto, ou seja, sendo liberado das células e partindo em direção a fase líquida externa (PILKINGTON *et al.*, 1998; ZHANG & FRANCO, 2002).

Particularmente em sistemas de aprisionamento em matrizes porosas, como esferas de alginato de cálcio, as limitações à transferência de massa interna são de especial importância.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Glicerol Residual

O glicerol residual foi fornecido por uma indústria de biodiesel localizada em Passo Fundo, RS e continha (baseado na massa): 81,78 % de glicerol, 5,82 % de cinzas, 6,0 % de NaCl, umidade de 11,72 %, 0,68 % de monoacilgliceróis, pH 5,37. O apêndice 1 mostra um laudo recebido da empresa com as especificações do produto.

A produção do biodiesel foi obtida através da transesterificação de óleo degomado de soja com metanol ou metilato de sódio.

3.2. Microrganismo e meio de cultivo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *K. pneumoniae* BLh-1, isolada e caracterizada a partir de efluente industrial de soja como produtora de 1,3-PD (ROSSI et al., 2012). Isolados desta bactéria são mantidos na Coleção de Culturas Microbiológicas do BiotecLab (ICTA, UFRGS). A cultura foi mantida em ágar Luria-Bertani (LB) inclinado a 4 °C.

O meio utilizado para o crescimento e para o cultivo do microrganismo (ROSSI et al., 2013) está apresentado na Tabela 2. A solução de elementos traço era composta por (g L⁻¹): 70 mg ZnCl₂; 0,1 g MnCl₂. 4 H₂O;

60 mg H_3BO_3 ; 0,2 g $\text{CoCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 20 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 25 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 35 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,9 mL HCl (12 M).

Tabela 2. Composição do meio de cultivo utilizado para crescimento e cultivo do microrganismo.

Componentes	Composição (g L ⁻¹)
Glicerol	65
Extrato de Levedura	5
Peptona	5
KH_2PO_4	7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7
Elemento traço	1 mL
pH	7,0

3.3. Obtenção da biomassa celular para imobilização celular

A biomassa usada na etapa de imobilização, foi obtida assepticamente através da transferência de colônias isoladas do microrganismo da cultura estoque para frascos Erlenmeyers de 1 L, contendo 500 mL de meio de cultivo. O cultivo foi realizado a 37 °C, pH inicial 7,0 e com rotação de 150 rpm, em agitador orbital, por 18 h. As células cultivadas foram recuperadas por centrifugação a 3500 g por 20 min a 4 °C. Após este período, o sobrenadante era descartado e a biomassa úmida dentro do frasco da centrifuga eram pesados para obter uma quantidade pré determinada de biomassa que foi misturada ao alginato de sódio para realizar a imobilização. Foi utilizada neste trabalho a massa úmida para estabelecer a quantidade de biomassa.

3.4. Técnica de imobilização celular

A imobilização das células foi realizada sob condições assépticas, utilizando alginato de sódio a 4 % (massa em volume) e 0,1 M de solução de CaCl_2 , que foram previamente autoclavados a 121 °C por 15 min. Em seguida, uma quantidade pré determinada de biomassa foi misturada imediatamente a solução de alginato de sódio para a imobilização.

A mistura (suspensão celular/alginato) foi adicionada por gotejamento, através de uma bomba peristáltica, em frasco contendo uma solução estéril de CaCl_2 0,1 M a 35 °C. As gotas geleificadas, pelo contato com os ions Ca^{2+} , formaram as partículas esféricas contendo as células da bactéria no seu interior. Após o gotejamento as esferas foram estabilizadas agitando-se suavemente por 30 min. Posteriormente as esferas obtidas foram recolhidas e lavadas com água destilada para serem utilizadas nos cultivos. O diâmetro das esferas foi determinado pelo uso de agulhas descartáveis de tamanho diferentes, com o auxílio de um paquímetro foi medido o diâmetro de 200 esferas para fazer a média do diâmetro das esferas.

Nos primeiros experimentos foi utilizada a solução 1 % de CaCl_2 para imobilização das células. Nos experimentos posteriores, a imobilização foi conduzida com uma solução de CaCl_2 a 4 %, com o intuito de aumentar a durabilidade das esferas.

3.5. Cultivos com células imobilizadas em agitador orbital

Primeiramente foram realizados experimentos para estabelecer o diâmetro das esferas de alginato de cálcio e a concentração de biomassa a ser

utilizadas no processo de imobilização. Foram testados dois diâmetros para as esferas ($D1 = 2,69$ mm e $D2 = 3,40$ mm) e duas concentrações de biomassa imobilizada (50 mg e 100 mg de biomassa úmida por mL^{-1} da solução de alginato). Em seguida, 30 mL de esferas medidas em proveta foram adicionadas a 100 mL de meio de fermentação estéril, em frasco Erlenmeyer de 250 mL e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação orbital, a 150 rpm, durante 28 h. Neste experimento foi utilizado um erlenmeyer para cada ponto, e o experimento foi realizado em duplicata.

Foram testadas duas formas de reutilização das células imobilizadas, para isso foram realizados cinco bateladas de forma repetida (reciclo) em Erlenmeyer. Primeiramente, após 12 h de cultivo as esferas eram recuperadas do meio de cultivo, com auxílio de uma peneira estéril, lavadas com água destilada estéril, eram colocadas em água peptonada e mantidas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 h, após este período as esferas eram novamente lavadas com água destilada estéril e outro ciclo de cultivo iniciava.

No segundo experimento, ao final de cada ciclo, após 12 h de cultivo, as esferas com células imobilizadas eram diretamente transferidas para meio fresco e estéril, assim outro ciclo começava imediatamente. Estes dois experimentos de reciclo foram realizados para investigar a estabilidade operacional do sistema quando utilizados estas duas formas de reciclo e a capacidade de reutilização das mesmas esferas na produção de 1,3-PD. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando 75 mL de esferas, medida em proveta, em 250 mL de meio de cultivo, as amostras foram retiradas a cada 4 h de cultivo por 32 horas.

Nos experimentos em agitador orbital foram avaliados os seguintes parâmetros: o diâmetro das esferas, a concentração celular a ser utilizados por mL de solução de alginato no processo de imobilização, assim como a reutilização das esferas em bateladas repetidas.

3.6. Cultivo com suspensão celular em agitador orbital

Para poder comparar os resultados obtidos com células imobilizadas e com células em suspensão, foi realizados experimentos onde frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 500 mL de meio estéril foram inoculados com 10 % (fração volumétrica) de inóculo, crescidos overnight a 37 °C e 150 rpm. O inóculo foi padronizado a DO 1,0 (Densidade ótica) a 600 nm antes de ser inoculado, o que corresponde a 0,78 g L⁻¹ de peso seco. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e as amostras foram retiradas a cada 4 h de cultivo por um tempo de 32 h. As amostras foram filtradas e guardadas em freezer para posterior análise.

3.7. Cultivos em biorreatores tubulares com células imobilizadas

Estes experimentos foram realizados em biorreatores de coluna de vidro projetado para experimentos com células imobilizadas (Figura 6). O biorreator possui volume total de 370 mL, este foi preenchido com 300 mL de meio de cultivo e 60 mL de esferas, em todos os experimentos.

A temperatura da camisa que reveste o reator foi mantida constante, por um banho-maria com temperatura controlada que era conectado ao biorreator e recirculava água aquecida. O pH inicial do meio de cultivo e do

meio de alimentação dos experimentos contínuos foi de 7,0. Durante os experimentos o pH não foi controlado.

Os cultivos em batelada em leito fluidizado foram realizados durante 32 h, a 37 °C, com recirculação de meio através da coluna por uma bomba peristáltica, promovendo a fluidização do sistema (fluxo ascendente).

No experimento em batelada alimentada fluidizado, foi observada a cinética do cultivo para avaliar o comportamento do microrganismo frente ao aumento da quantidade de glicerol no meio de cultivo, foram realizadas duas alimentações com glicerol residual estéril numa quantidade de 40 g L⁻¹ em cada tempo, a alimentação ocorreu com 12 e 24 h de cultivo.

Os cultivos em leito fluidizado contínuo e de leito fixo foram realizados utilizando taxas de diluições de 0,05 h⁻¹, 0,1 h⁻¹ e 0,2 h⁻¹, a 37 °C, por 100 h de cultivo. A fluidização foi realizada por meio de recirculação através do biorreator, utilizando uma bomba peristáltica, com uma taxa de fluidização de 160 mL min⁻¹. Os biorreatores começaram como uma batelada, e a alimentação com meio estéril começou em 10 h de cultivo, para o biorreator de leito fluidizado, e em 24 h de cultivo para o biorreator de leito fixo. Todos os experimentos foram realizados em duplicada.

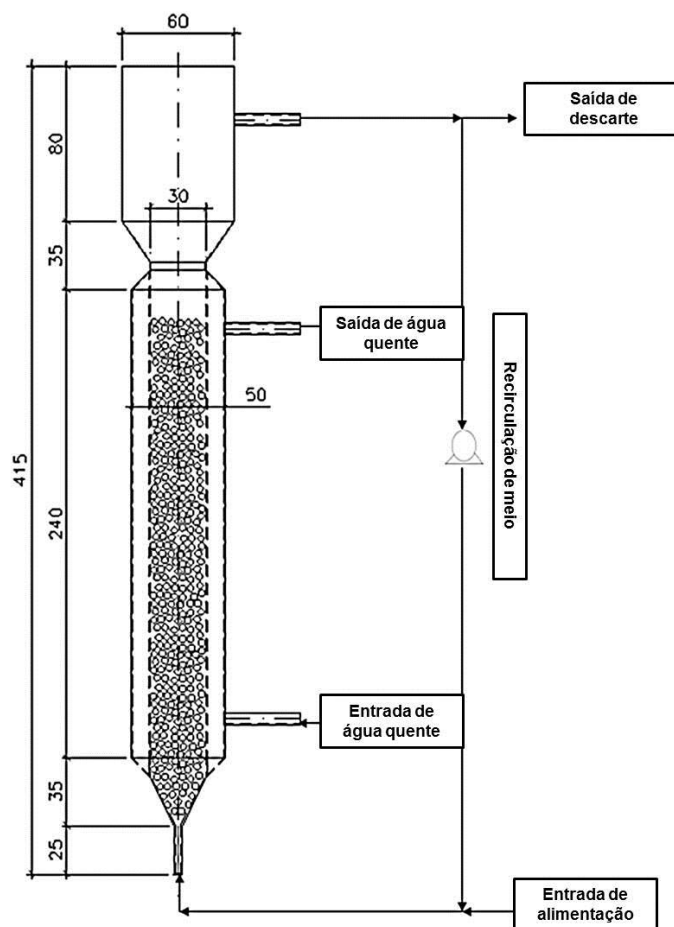


Figura 6. Desenho do biorreator tubular utilizado nos experimentos de produção de 1,3-PD por *K. pneumoniae* BLH-1.

3.8. Testes com diferentes meios de cultivo

Foi realizado um experimento comparando quatro meios de cultura diferentes (Tabela 3), variando principalmente, a quantidade de K_2HPO_4 (fosfato de potássio), para avaliar o seu efeito na produção de 1,3-PD e na durabilidade das esferas de células imobilizadas, pois este reagente pode afetar a durabilidade das esferas. Foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio e 30 mL de esferas em agitador orbital à 37 °C e agitação de 150 rpm.

Tabela 3. Composição dos meios de cultivo utilizados nos experimentos com quantidades diferentes de K_2HPO_4 .

Componentes	Composição (g L ⁻¹)			
	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4
Extrato de Levedura	5	1,5	5	5
Peptona	5	1	5	5
K_2HPO_4	0	0,52	1,4	7
$(NH_4)_2SO_4$	7	4	7	7
KH_2PO_4	0	0,25	0	0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0	0,2	0	0
Glicerol	65	65	65	65
Elemento Traço	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

3.9. Métodos analíticos

3.9.1. Determinação de 1,3-PD, glicerol e bioprodutos

As análises do consumo de glicerol e dos produtos formados foram determinadas por cromatografia de alto desempenho (HPLC), equipamento SHIMADZU (Shimadzu Corp), equipado com uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, EUA) e detector de índice de refração RID-10A. As condições de trabalho foram: 0,005 M de H_2SO_4 como fase móvel, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna controlada a 65 °C.

As amostras dos cultivos foram preparadas por centrifugação a 3000 g por 15 min, seguida de filtração utilizando filtros de membrana de acetato de celulose (diâmetro dos poros 0,22 µm, Sartorius, Alemanha). As amostras foram mantidas em freezer para conservação.

3.9.2. Microscopia eletrônica das esferas com células imobilizadas

A distribuição da biomassa e a colonização das esferas contendo células imobilizadas de *K. pneumoniae* BLh-1, foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se um microscópio eletrônico (JSM-6060, Tokyo, Japan).

As amostras foram coletadas no tempo zero e no ponto final com 100 h de cultivo. As esferas foram preparadas seguindo as instruções do técnico responsável pelo centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, as esferas foram congeladas em ultrafreezer e liofilizadas por 24 h. As amostras foram fixadas em bases de alumínio e revestidas com ouro antes de serem analisadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência da concentração celular e do diâmetro das esferas na eficiência do sistema de imobilização

Para determinar as condições ótimas de operação do sistema de imobilização com alginato de cálcio, o efeito da concentração celular e do diâmetro das esferas foram estudados.

A Tabela 4 apresenta o efeito de diferentes concentrações celulares e do diâmetro das esferas na produção de 1,3-PD. Diferença na produção de 1,3-PD foi observada entre os dois diâmetros para cada concentração de células imobilizadas. As esferas com concentração celular de 100 mg mL^{-1} de alginato e diâmetro de 3,40 mm, apresentaram a maior produção de 1,3-PD, $15,52 \text{ g L}^{-1}$, com rendimento de $0,35 \text{ mol mol}^{-1}$ e produtividade de $1,30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. As esferas com concentração celular de 50 mg mL^{-1} apresentaram a menor produção para os dois diâmetros estudados: o diâmetro $D_2 = 3,40 \text{ mm}$ teve a produção máxima de $10,98 \text{ g L}^{-1}$ de 1,3-PD, $0,22 \text{ mol mol}^{-1}$ de rendimento e uma produtividade de $0,69 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. O diâmetro $D_1 = 2,69 \text{ mm}$ apresentou a menor produção para duas concentrações celulares (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados da concentração, produtividade e rendimento de 1,3-PD quando utilizadas células imobilizadas de *K. pneumoniae* BLh-1 sob diferentes condições de imobilização, após de 12 h de cultivo em agitador orbital.

Condições	Concentração (g L ⁻¹)	Rendimento (mol mol ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)
$D_1_X_1$	9,71 ± 0,03	0,21	0,81
$D_1_X_2$	10,98 ± 0,06	0,22	0,69
$D_2_X_1$	11,40 ± 0,54	0,25	0,95
$D_2_X_2$	15,52 ± 0,18	0,35	1,30

D_1 = 2,69 mm, D_2 = 3,40 mm, X_1 = 50 mg de biomassa úmida por mL de solução de alginato, X_2 = 100 mg de biomassa úmida por mL de solução de alginato, D e X representam diâmetro e biomassa, respectivamente. Os resultados representam a média de duplicatas.

Comparado com culturas de células em suspensão, as culturas com células imobilizadas levaram à obtenção de 1,3-PD em menor tempo, consequentemente uma produtividade mais elevada em comparação com as células em suspensão. Em 4 h de cultivo com células imobilizadas ($D_2_X_2$), houve produção de 9,45 g L⁻¹ de 1,3-DP, com produtividade de 2,36 g L⁻¹ h⁻¹ (Figura 7). Por outro lado, com 4 h de cultivo com células em suspensão (Figura 9) a produção foi de 1,26 g L⁻¹ de 1,3-PD e produtividade de 0,32 g L⁻¹ h⁻¹. Isto ocorre, pois nos processos onde há imobilização de células, a fermentação é acelerada por causa da alta densidade de célula fixada no suporte, que permite um aumento na produtividade do processo.

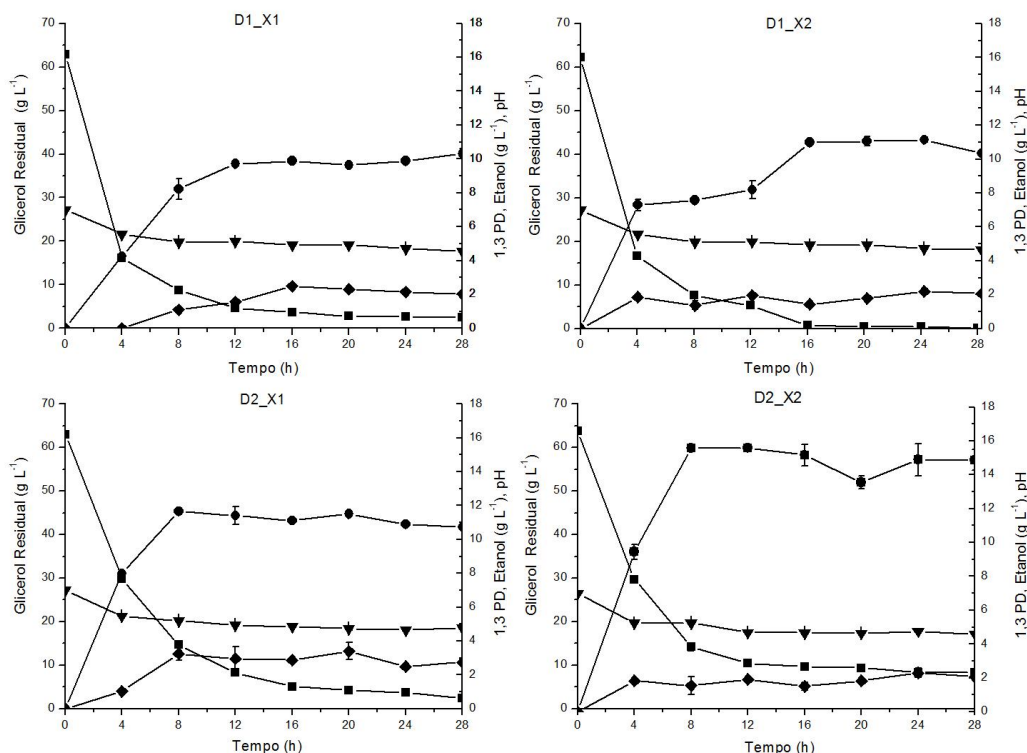


Figura 7. Resultados dos cultivos realizados com células imobilizadas em agitador orbital, após de 28 h de cultivo: (■) glicerol Residual (●) 1,3-PD, (▼) pH (◆) etanol. D1= 2,69 mm, D2= 3,40 mm, X1= 50 mg de biomassa úmida por mL de solução de alginato, X2= 100 mg de biomassa úmida por mL de solução de alginato, D e X representam diâmetro e biomassa, respectivamente. Resultados representam a média de duplicatas.

Na Figura 7 é demonstrado que a maior influência na produção de 1,3-PD foi devido à quantidade células imobilizada, ou seja, quanto maior quantidade de biomassa utilizada maior a produção de 1,3-PD. Com relação ao diâmetro, apresentou maior produção o diâmetro de 3,40 mm junto com a maior concentração celular. Em estudos que leveram em consideração o diâmetro da esfera na produção de um determinado produto, ABDEL_NABY *et al.* (2000) demonstraram em seu estudo que diâmetros entre 3-4 mm foram os que apresentaram maior rendimento na produção de CGTase por *Bacillus*

Amyloliqefaciens quando utilizaram como suporte o alginato de cálcio. Nas condições que foram realizados os experimentos apresentados na Figura 7, foi o maior diâmetro que apresentou o melhor resultado.

A utilização do sistema com células imobilizadas tem sido considerada uma alternativa viável para o aumento da produtividade devido as elevadas densidades celulares utilizadas nos suportes de imobilização, que assegura a síntese de metabólitos, aumenta a eficiência da fermentação e proporciona o decréscimo do tempo de fermentação (RAMAKRISMA *et al.*, 1999, COVIZZI *et al.*, 2007).

Segundo HAMDY *et al.* (1990) a imobilização celular aumenta a estabilidade do biocatalisador em relação à variação do pH, temperatura, concentração de nutrientes ou do meio de fermentação aumentando a eficiência da fermentação. Além disso, as células imobilizadas são mais resistentes a condições adversas, uma vez que o suporte de imobilização geralmente aumenta proteção das células (LEE *et al.*, 1983).

Sendo assim, para selecionar o melhor sistema de imobilização, foi utilizada a condição que apresentou a maior produtividade. A combinação mais eficiente foi concentração celular de 100 mg de biomassa úmida por mL de solução de alginato e diâmetro de 3,40 mm (D_2-X_2).

4.2. Comparação entre sistema com células imobilizadas e com suspensão celular em agitador orbital

Biologicamente, a produção de 1,3-PD utilizando glicerol como substrato foi principalmente produzida em culturas utilizando células em

suspensão (células livres) (BARBIRATO *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 2006; DECKWER, 1995; OH *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2007). Neste trabalho, comparou-se a produção de 1,3-PD utilizando células imobilizadas e células em suspensão.

Quantidades similares de 1,3-PD foram produzidas nos dois experimentos, com células imobilizadas e células em suspensão, com resultados apresentados na Figura 8 e Figura 9. Na figura 8 apresentados os resultados dos experimentos realizados com células imobilizadas, utilizando os parâmetros (diâmetro= 3,40 mm e biomassa= 100 mg de biomassa úmida por mL de alginato) estabelecidos em experimentos anteriores em agitador orbital.

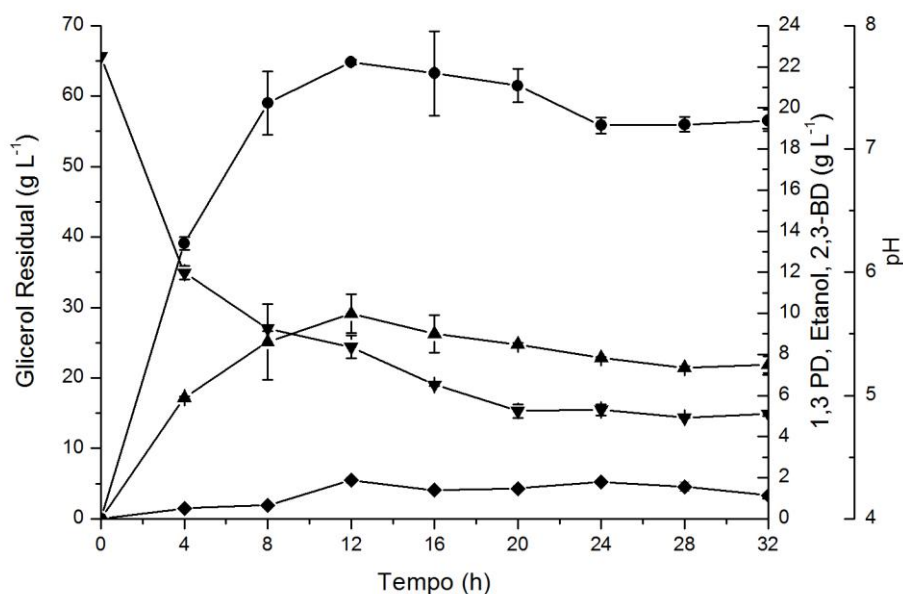


Figura 8. Resultados dos cultivos realizados em agitador orbital com células imobilizadas: (■) Glicerol Residual (●) 1,3-PD, (▼) pH (▲) 2,3-BD e (◆) etanol. Resultados representam a média de duplicatas.

A máxima produção de 1,3-PD foi 22,22 g L⁻¹ em 12 h de cultivo.

Não foi observado o total consumo do glicerol residual depois de 28 h de

cultivo, permanecendo mais de 14 g L^{-1} no meio de cultivo. O pH apresentou um declínio de 7,0 para 4,75 ao fim do cultivo. Os principais bioprodutos foram 2,3-butanodiol (2,3-BD), etanol, ácido lático e ácido acético em menores concentrações. O resultado foi um pouco maior quando comparado com os experimentos realizados com células em suspensão (Figura 9) onde a máxima produção de 1,3-PD foi $19,51 \text{ g L}^{-1}$ em 16 h de cultivo e com glicerol permanecendo no meio, sem ser consumido, depois de 28 h de cultivo, o pH também apresentou queda ficando em 4,99.

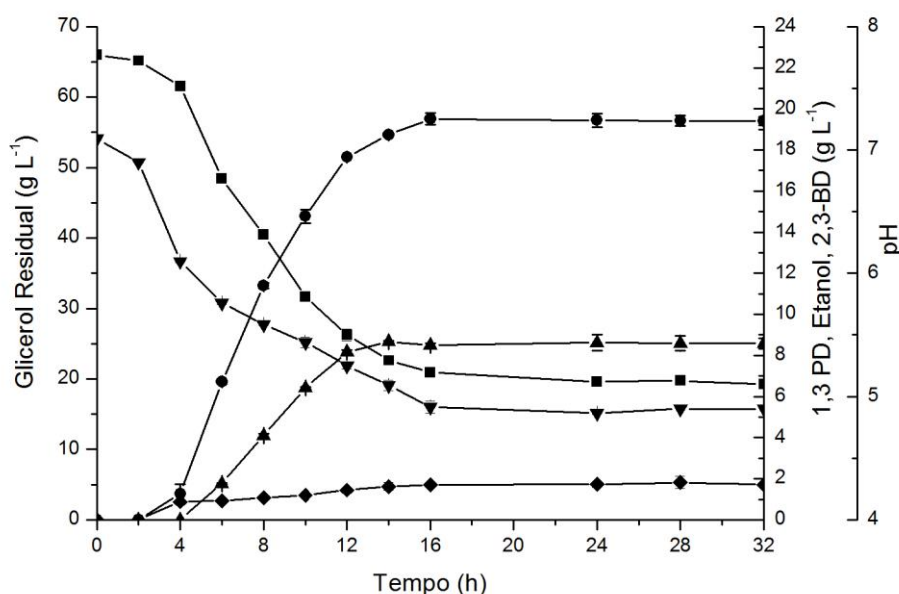


Figura 9. Resultados dos cultivos em agitador orbital com células em suspensão, após 28 h de cultivo: (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (▲) 2,3-BD, (▼) pH e (◆) etanol. Resultados representam a média de duplicatas.

Microrganismos são sensíveis a mudanças que ocorrem no microambiente onde eles se encontram assim as variações que ocorrem nos principais parâmetros de cultivo (por exemplo, pH) podem afetar seu crescimento e produtividade (FORAGE *et al.*, 2003).

O pH foi o principal parâmetro que influenciou no cultivo com células em suspensão, porque o decréscimo do pH do meio de fermentação influencia a fisiologia do microrganismo, dificultando a formação dos produtos principalmente de 1,3-PD (BIEBL *et al.*, 1998).

Por outro lado, a influência do pH nas células imobilizadas são menores, pois elas são mais resistentes às adversidades no meio de cultivo, pois o suporte de imobilização protege o microrganismo (LEE *et al.*, 1983). Além disso, a imobilização celular aumenta a atividade fermentativa e promove a adaptação das células ao meio de fermentação (DURAN & BAILEY, 1986).

A presença de glicerol residual que não é consumida no meio de fermentação pode inibir a formação de 1,3-PD, porque outros metabólitos podem ser formados (DROZDZYNSKA *et al.*, 2011), reduzindo o rendimento de 1,3-PD. A acumulação do glicerol pode favorecer também o aparecimento de substâncias tóxicas tais como 3- hidroxipropionaldeído (3-HPA) que inibe o crescimento do microrganismo (ZENG & BIEBL, 2002).

Na Tabela 5 são mostrados os resultados de concentração, rendimento e produtividade de 1,3-PD. A máxima produtividade com células imobilizadas foi $3,35 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, maior que a encontrada com as células em suspensão atingindo $1,48 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. BORENSTEIN, (2003) relatou que, em experimentos com células imobilizadas, a um elevado desempenho, pois grandes quantidades de células são fixadas ao suporte de imobilização, o que aumenta a eficiência da fermentação resultando em produtividades elevadas.

Tabela 5. Resultados de concentração, rendimento e produtividade de 1,3-PD com células imobilizadas de *K. pneumoniae* BLh-1 comparada com células em suspensão em agitador orbital.

Células	Concentração (g L ⁻¹)	Rendimento (mol mol ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Imobilizada	22,22 ± 0,13	0,65	3,35
Suspensão	19,51 ± 0,28	0,54	1,48

Resultados representam as médias de duplicatas.

Na literatura, utilizando fermentação em batelada com células em suspensão foi obtida produtividade de 1,68 g L⁻¹ h⁻¹ (HOMANN *et al.*, 1990). Em cultivos contínuos geralmente se obtém produtividades mais elevadas, mas a concentração final de 1,3-PD geralmente é mais baixa (PAPANIKOLAU *et al.*, 2000). ZHANG *et al.* (2006) demonstraram em seus estudos que quando utilizaram batelada alimentada à concentração final e o rendimento de 1,3-PD foram superiores aos resultados encontrados em bateladas simples. No entanto, como os resultados são muito diferentes em vários estudos com células em suspensão, e buscando melhorar os resultados em termos de produtividade em biorreatores compactos, surge o conceito de imobilização celular.

GUNGORMUSLER *et al.* (2011) relataram em seu estudo, quando foi utilizado anéis de cerâmica e bolas de cerâmica (Meadow Pet) como suporte de imobilização, a produtividade de 1,3-PD foi maior em experimentos com células imobilizadas do que em experimentos com células em suspensão. ZHAO *et al.* (2006) obtiveram uma produtividade de 4,49 g L⁻¹ h⁻¹ em seu estudo utilizando células imobilizadas em microcápsulas constituídas por sulfato de sódio de celulose/cloreto poli-dimetil-dialil-amônio. Estes resultados

indicam que a utilização de células imobilizadas, possuem vantagens em relação à cultura em suspensão, principalmente em relação à produtividade.

4.3. Avaliação de repetidos cultivos com células imobilizadas em agitador orbital

Em função dos resultados apresentados e discutidos anteriormente, foi também avaliada a produção de 1,3-PD durante cinco bateladas repetidas. Dois experimentos diferentes foram realizados, a fim de investigar a influência do emprego de células imobilizadas diretamente, após cada batelada ou após o intervalo de tempo (12 h) entre as bateladas, ficando por 12 h em água peptonada em refrigeração.

Na Figura 10a, são demonstrados os resultados obtidos das cinco bateladas utilizando as mesmas esferas, com intervalo de 12 h entre as corridas. A produção de 1,3-PD e dos bioprodutos (2,3-BD e atanol) foram similares em todas as bateladas, demonstrando uma estabilidade do sistema de imobilizado. A taxa de consumo do glicerol residual aumentou a partir da segunda batelada (Figura 10a). A maior produtividade ocorreu durante terceira batelada com valor de $3,80 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabela 5), que foi superior a obtida em experimentos com células em suspensão em agitador orbital, $1,48 \text{ g L}^{-1} \text{ H}^{-1}$.

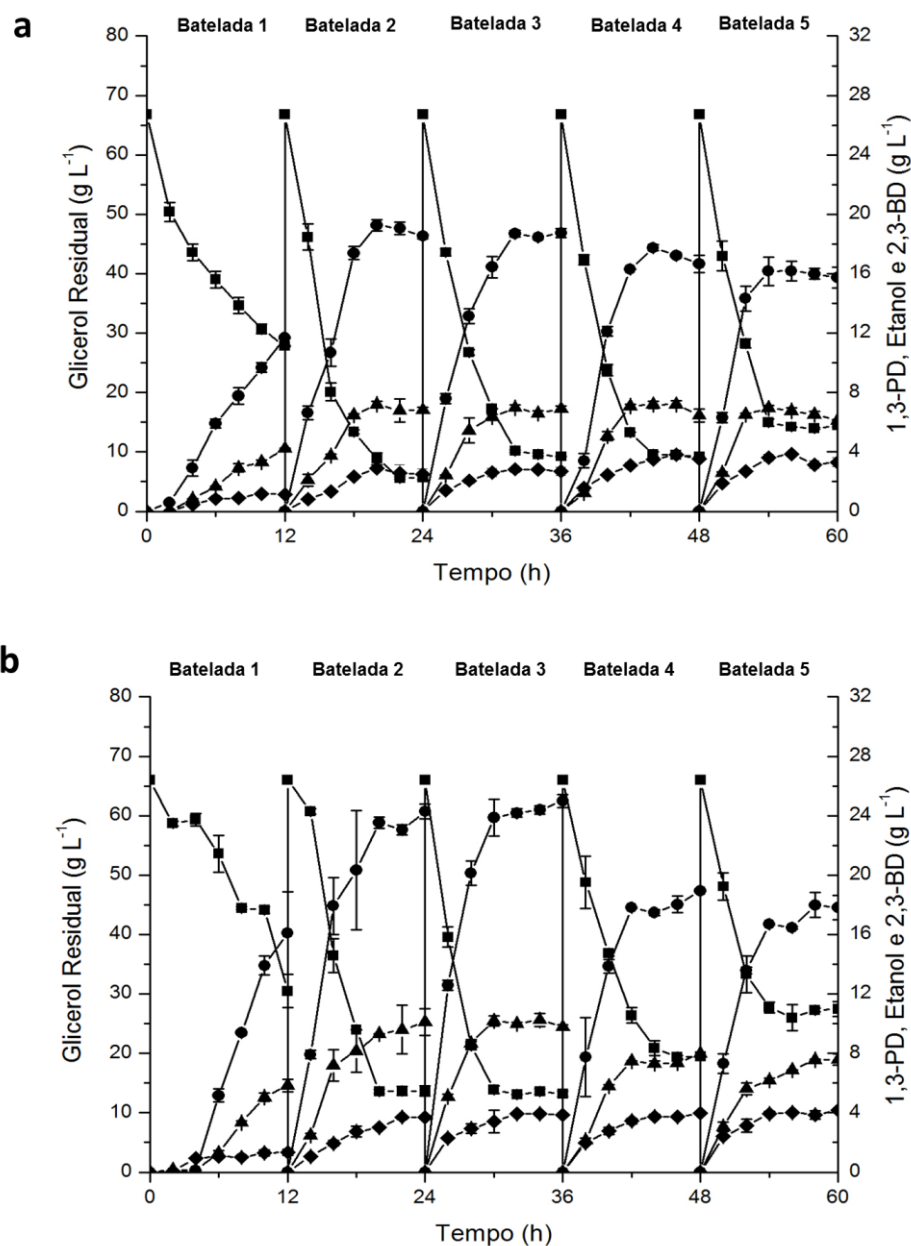


Figura 10. Resultados dos cultivos realizados em agitador orbital com células imobilizadas utilizando reciclo com intervalo de tempo entre as bateladas (a) e reciclo realizado diretamente (b): (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (▲) 2,3-BD e (◆) etanol. Os resultados representam a média de duplicatas.

A Figura 10b mostra os resultados dos experimentos realizados com células imobilizadas, utilizadas diretamente ao fim de cada batelada. A concentração final de 1,3-PD foi diferente em cada corrida e a maior

produtividade ocorreu durante a terceira batelada com valor de $6,29 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabela 6), sendo maior que a encontrada nos primeiros experimentos de reciclo utilizando as esferas com células imobilizadas com intervalo de tempo entre as bateladas.

Tabela 6. Resultados de concentração, rendimento e produtividade de 1,3-PD em bateladas repetidas com intervalo de tempo entre as bateladas e uso direto das células imobilizadas, após cada batelada.

Bateladas	Concentração (g L^{-1})		Rendimento (mol mol^{-1})		Produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	
	Intervalo	Direto	Intervalo	Direto	Intervalo	Direto
1	11,69	16,11	0,36	0,54	0,99	1,39
2	19,26	24,29	0,37	0,58	3,32	4,48
3	18,70	24,99	0,40	0,58	3,80	6,29
4	17,75	18,93	0,38	0,58	3,03	3,88
5	16,19	17,82	0,38	0,56	3,58	3,66

Os resultados representam a media de duplicatas.

Na Tabela 6 se observa que a produção de 1,3-PD e a produtividade foram próximas nos experimentos com intervalo de tempo entre as bateladas, a partir da segunda batelada. Já nos experimentos com utilização direta das esferas após o fim de cada batelada, a produção e a produtividade mostraram uma variação maior no final dos cultivos.

Esta queda de produção pode ser por causa do decréscimo da atividade celular depois de prolongado período de fermentação, que pode ter sido influenciado fortemente pela queda do valor de pH durante os cultivos, que apresentou um valor final de 4,88.

O glicerol não foi totalmente consumido em todas as corridas, outro fato que pode influenciar na produção de 1,3-PD, a presença de glicerol não consumido no meio pode inibir a produção de 1,3-PD porque outros metabólitos podem ser formados (DROZDZYNSKA *et al.*, 2011). O que pode ser observado na Figura 10b, é que a produção de 2,3-butanodiol (2,3-BD) e etanol foram maiores quando comparadas com reciclo com intervalo de tempo (Figura 10a), onde houve um maior consumo de glicerol.

Neste trabalho, o reciclo com intervalo de tempo entre as bateladas parece ser mais estável na produção de 1,3-PD, mas o uso de reciclo direto não está descartado em futuros trabalhos usando biorreatores, onde outros parâmetros possam ser testados, tais como o pH, em um ambiente de fermentação totalmente diferente do encontrado em Erlenmeyers.

WONG *et al.* (2011) e ZHAO *et al.* (2006) observaram em seus estudos que o uso de células imobilizadas é efetiva na produção de 1,3-PD, mostrando eficiência e estabilidade na produção quando utilizadas por longos períodos de fermentação. JUN *et al.* (2010) também relataram em seu estudo que, o uso de células imobilizada de *K. pneumoniae* é viável para a produção de 1,3-PD, quando realizadas bateladas alimentadas por longo período.

Os resultados demonstram que o reuso de células imobilizadas é possível por longos períodos. Algumas adaptações na forma de imobilização serão melhoradas para os próximos experimentos, como por exemplo, alterar a solução de CaCl_2 para 4 % deixando assim as esferas mais resistentes, dificultando que as esferas se dissolvam durante os cultivos por longos

períodos, visto que nestes experimentos no final da quinta batelada as esferas estavam com sua estrutura danificada.

Células imobilizadas em géis de alginato produzem sistemas com altos níveis de conversão, pois este sistema apresenta alta atividade catalítica, durabilidade e são estáveis em altas temperaturas. Mas um ponto muito importante é que as esferas de alginato são afetadas por cátions, tais como: Na^+ , Mg^{++} e K^+ , bem como por ânions tais como: ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), citratos e fosfatos, porque causa a perda do Ca^{++} que diminuem a resistência das esferas (BARRANCO-FLORIDO *et al.*, 2001).

4.4. Avaliação de diferentes meios de cultivos na produção de 1,3-PD e melhorias no sistema de imobilização

Neste trabalho, ocorreram problemas na durabilidade das esferas principalmente no final dos primeiros cultivos em agitador orbital e nos primeiros testes em biorreatores com controle de pH, isto pode ter sido influenciado pelo meio de cultivo utilizado, que possui elevada quantidade de fosfato (7 g de K_2HPO_4) e pelas soluções de controle de pH, principalmente o NaOH que possui o cátion Na^+ , que diminuem a resistência das esferas.

Na tentativa de avaliar diferentes meios de cultivo em relação a sua ação na durabilidade das esferas e na produção de 1,3-PD, foi realizado um experimento com quatro meios de cultivos com proporções diferentes de K_2HPO_4 , entre outros componentes (Tabela 3).

Na Figura 11 são apresentados os resultados obtidos neste experimento, indicando que o fosfato de potássio é importante na produção

de 1,3-PD. O meio 4, o qual já é utilizado como meio de cultivo nos experimentos, levou a obtenção da máxima produção de 1,3-PD, que foi de $22,54 \text{ g L}^{-1}$ e o meio 1 sem K_2HPO_4 foi o que apresentou a menor produção ($3,18 \text{ g L}^{-1}$). O gráfico demonstra que quanto maior a quantidade de fosfato no meio de cultivo maior a produção de 1,3-PD, nas condições testadas.

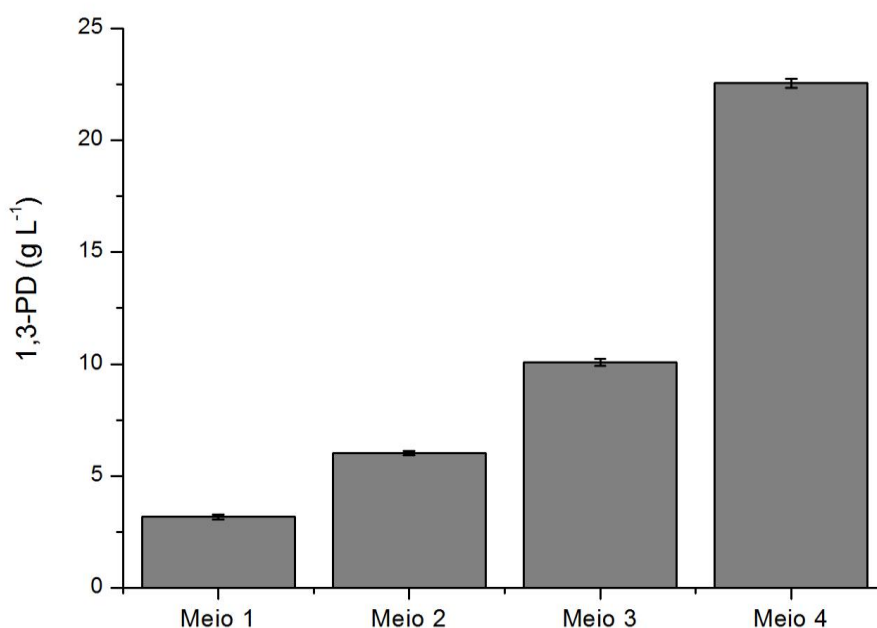


Figura 11. Produção de 1,3-PD comparando diferentes meios de cultivo, com quantidades diferentes de K_2HPO_4 em agitador orbital.

ZHENG *et al.* (2010), relataram que a conversão de glicerol em 1,3-PD por *K. pneumoniae* foi superior em meio de cultivo com limitação de amônia do que quando utilizado meio de cultivo com limitação de fosfato, demonstrando a sua importância no metabolismo deste microrganismo.

Sendo assim, o meio 4 continuará sendo utilizado nos próximos experimentos. Entretanto, como se pretende controlar o pH nos experimentos para se obter melhores resultados, a quantidade de cloreto de cálcio (CaCl_2) foi aumentada na solução de imobilização de 1 % para 4 % (massa em volume),

com o intuito de aumentar a durabilidade das esferas. O aumento da quantidade de CaCl_2 aumenta a estabilidade da ligação entre o Ca^{++} e o alginato.

Para avaliar o efeito na durabilidade das esferas com a mudança na solução de imobilização, foi imobilizado um novo lote de esferas, para serem utilizadas em experimentos em biorreator com e sem controle de pH.

O resultado obtido no experimento acima citado, foi que no biorreator com controle de pH as esferas não mantiveram-se íntegras, e foram afetadas já nas primeiras horas de cultivo. No biorreator sem controle de pH (Figura 12), as esferas mantiveram-se íntegras até o fim do cultivo.

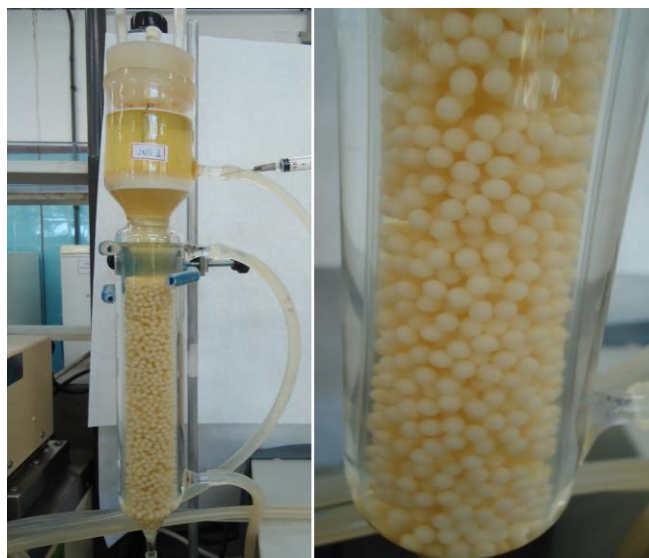


Figura 12. Aparência das esferas de alginato de cálcio imobilizadas em nova solução de CaCl_2 em biorreatores sem controle de pH.

Sendo assim, nos experimentos seguintes em biorreatores não haverá controle de pH, pois este afeta a durabilidade das esferas de alginato de cálcio.

4.5. Biorreatores com células imobilizadas em leito fluidizado operados em batelada

Neste trabalho, o aumento de escala dos cultivos para biorreatores, permitiu uma análise mais precisa do metabolismo do microrganismo, pois em biorreatores geralmente o ambiente é mais homogêneo durante a fermentação, pois alguns parâmetros (temperatura e fluidização) são mantidos constantes.

Na Figura 13 é apresentada a produção de 1,3-PD e de outros metabólitos durante uma fermentação de 32 h, realizada em batelada. O glicerol foi rapidamente consumido, restando no meio de cultivo uma quantidade em torno de 5 g L⁻¹. O pico de produção de 1,3-PD ocorreu em 12 h de cultivo atingindo um valor de 25,52 g L⁻¹, produtividade de 2,13 g L⁻¹ h⁻¹, com rendimento de 0,54 mol mol⁻¹. Também foi identificada a produção de 2,3-BD de aproximadamente 11 g L⁻¹ e etanol em torno de 3 g L⁻¹, durante o cultivo. Outros metabólitos como ácido láctico e ácido acético foram produzidos, mas em menores concentrações, dados não mostrados.

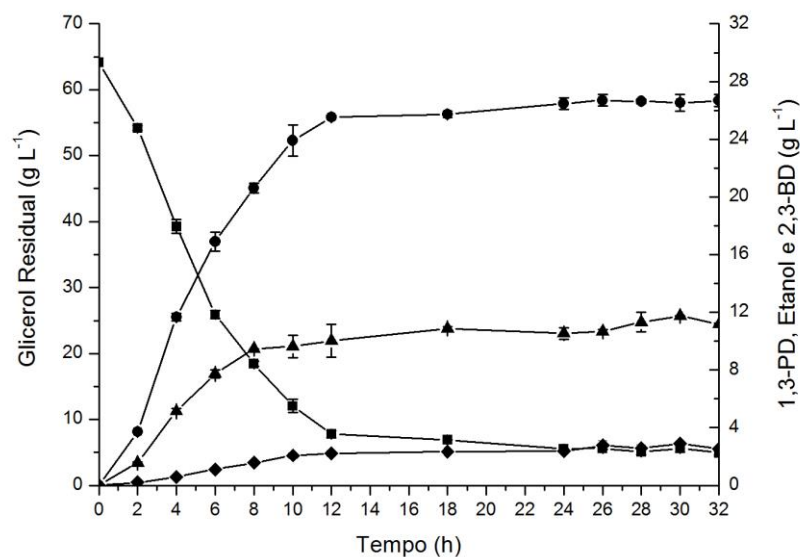


Figura 13. Produção de 1,3-PD em biorreatores com células imobilizadas operados em batelada. (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (▲) 2,3-BD e (◆) etanol. Os resultados representam a média de duplicatas.

O pH apresentou novamente uma queda, chegando ao final do cultivo a um valor de 4,75. Analisando o gráfico percebe-se que houve uma elevada produção de 2,3-BD, o que já havia sido observado em outros experimentos, sendo, provavelmente devido ao baixo valor de pH. Esta alta produção interfere na produção do 1,3-PD, pois está relacionado com um desvio na rota metabólica do microrganismo.

Segundo XUE *et al.* (2010) com o acúmulo de bioprodutos no meio de fermentação, especialmente ácido láctico, etanol e 2,3-BD, ocorre inibição do crescimento celular, mas também ocorre o consumo de muitos equivalentes redutores de NADH, que compete diretamente com a formação do 1,3-PD, resultando em um menor rendimento. Estes autores realizaram manipulação

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

O metabolismo do glicerol é uma reação biológica de oxirredução (Figura 4). O 1,3-PD é o produto final da rota redutiva, enquanto acetato, succinato, lactato, 2,3-BD e etanol são produzidos na rota oxidativa. Ambas as rotas são mutuamente conectadas pela formação NAD e pelo consumo de NADH₂ (PETROV & STOYANOV, 2012).

A fermentação do glicerol por *K. pneumoniae* ocorre com acumulação de mais de cinco metabólitos líquidos: dióis, ácidos orgânicos, e etanol, a taxa de produção depende das condições do processo. Os fatores mais significativos são regime de aeração e o pH (PETROV & STOYANOV, 2012). Estes mesmos autores demonstraram que a manutenção do pH em 7,0 favorece a produção de 1,3-PD e que valores de pH inferiores a 6,0 favorece o acúmulo de bioprodutos, reduzindo o rendimento de 1,3-PD

Já foram isoladas várias linhagens de *Klebsiella* capazes de fermentar o glicerol, pertencentes às espécies *pneumoniae*, *oxytoca*, e *planticola* (BIEBL *et al.*, 1998; HAO *et al.*, 2008). Em todos estes processos, o produto principal é o 1,3-propanodiol (1,3-PD) e 2,3-butanodiol (2,3-BD) é produzido em quantidade menor juntamente com lactato, acetato, succinato, e etanol (PETROV & PETROVA, 2010).

Geralmente, o 2,3-BD aparece com o decréscimo do pH do meio de cultivo, sendo que a secreção de 2,3-BD compreende a uma resposta de

adaptação a mudança de pH do meio, mas este processo de redirecionamento do metabolismo é um processo lento (PETROV & PETROVA, 2010).

O 2,3-BD possui propriedades similares com o 1,3-PD, como alto ponto de ebulição e solubilidade em água. O 2,3-BD não somente compete com o fluxo de carbono e o NADH com o 1,3-PD, mas serve como um obstáculo para obter um 1,3-PD com alta pureza na recuperação do produto do meio de fermentação (ZHANG *et al.*, 2011).

Com os resultados apresentados é possível perceber que o controle do pH é importante nestes cultivos, pois sem controle de pH a produção de 1,3-PD fica prejudicada.

4.6. Biorreatores com células imobilizadas em leito fluidizado operados em batelada alimentada

Estes experimentos tiveram como objetivo verificar o comportamento do microrganismo, frente a alimentações em tempos diferentes. As alimentações foram realizadas com 12 e 24 horas de cultivo, sendo alimentada uma quantidade de 40 g L⁻¹ de glicerol residual em cada tempo.

Na Figura 14 é apresentado o perfil da fermentação realizada durante 54 h de cultivo. Houve acúmulo de glicerol residual, pois o glicerol adicionado no biorreator não foi consumido pelo microrganismo, a produção se manteve constante, após a primeira alimentação e durante todo o cultivo.

A máxima produção de 1,3-PD ocorreu em 12 h de cultivo apresentando um valor de 25,49 g L⁻¹ e manteve, aproximadamente, neste valor até o final. A produção foi similar à obtida em batelada, indicando que

nestas condições a alimentação com glicerol residual não influenciou a produção, mas o seu acúmulo pode ter prejudicado o desenvolvimento do microrganismo.

Houve a produção de 2,3-BD e etanol, e em menores concentrações ácido láctico e ácido acético. Houve queda acentuada do pH ficando no final no cultivo num valor de 4,53.

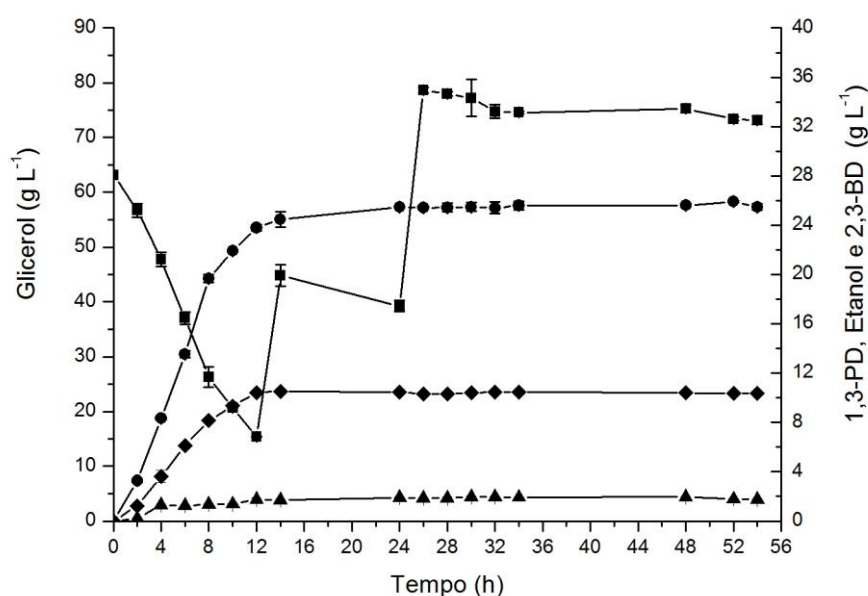


Figura 14. Produção de 1,3-PD em biorreatores com células imobilizadas operados em batelada alimentada. (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (▲) 2,3-BD e (◆) etanol. Os resultados representam a média de duplicatas.

O acúmulo de glicerol pode favorecer o aparecimento de substâncias tóxicas como o 3-hidroxiopropanaldeo (3-HPA), que pode inibir o crescimento do microrganismo e a formação de 1,3-PD. O 3-HPA é excretado no meio de cultivo quando há excesso de glicerol (ZENG & BIEBL, 2002). O 3-HPA é um metabólito intermediário na rota de síntese de 1,3-PD, a sua

acumulação cessa o crescimento celular, causa decréscimo do consumo do substrato e inibe a formação de produtos (BARBIRATO *et al.*, 1998).

Segundo CHENG *et al.* (2005), concentrações acima de 70 g L^{-1} de glicerol no meio de cultivo tende a cessar o crescimento celular, ou seja o acúmulo de glicerol não consumido inibe o crescimento celular, conhecido como o fenômeno de inibição pelo substrato. A chamada repressão de produção que pode ocorrer em uma fermentação, acontece por alguns fatores como: repressão pelo próprio produto devido a alta quantidade no meio de cultivo, pela presença de metabólitos tóxicos (ácido lático, ácido acético e etanol), falta de nutrientes e pH.

4.7. Biorreatores com células imobilizadas em leito fluidizado contínuo

As culturas contínuas foram realizadas em biorreatores fluidizados com diferentes taxas de diluições ($0,05$, $0,1$ e $0,2 \text{ h}^{-1}$), mas aqui serão apresentados somente os resultados com taxa de diluição de $0,05 \text{ h}^{-1}$, pois nas outras condições avaliadas, foi observado a destruição das esferas com células imobilizadas. A concentração de glicerol no meio de alimentação foi fixada em 65 g L^{-1} .

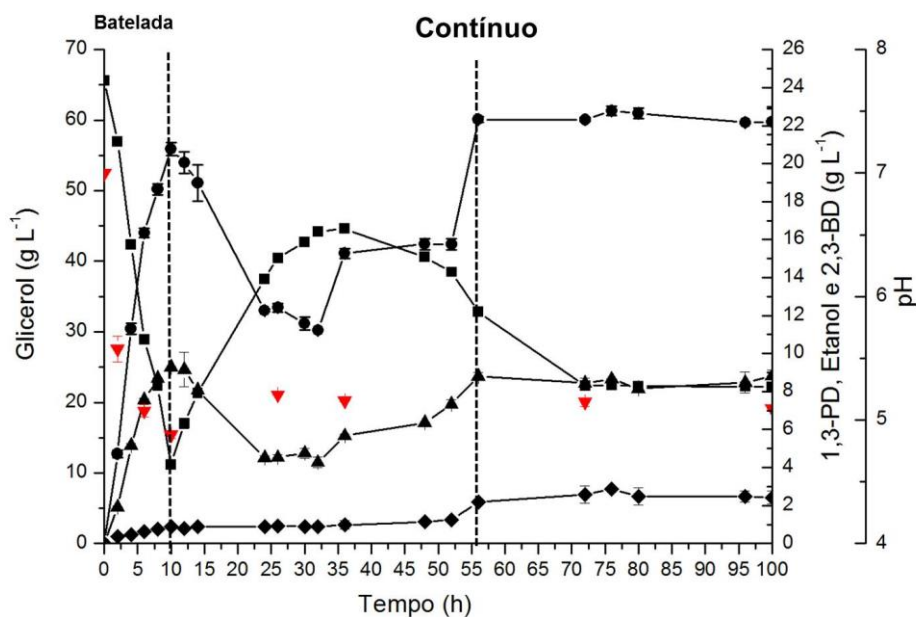


Figura 15. Produção de 1,3-PD em biorreatores com células imobilizadas em sistema contínuo fluidizado. (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (▲) 2,3-BD, (◆) etanol e (▼) pH. Os resultados representam a média de duplicatas.

Na Figura 15 são apresentados os resultados obtidos com taxa de diluição de $0,05 \text{ h}^{-1}$. O experimento tem início como uma batelada e a partir de 10 h de cultivo foi iniciada a alimentação do sistema. O regime estacionário foi alcançado a partir de 56 h de cultivo.

A partir do início da alimentação do sistema, percebe-se que houve um período de muita instabilidade no metabolismo do microrganismo. Problemas difusionais podem ter ocorrido, pois o microambiente dentro das esferas pode ser completamente diferente do ambiente externo, pode haver diferença de pH externo e interno, e acúmulo de produtos tóxicos, que influem negativamente no desenvolvimento do microrganismo. Pelo gráfico observa-se que o microrganismo leva em torno de 40 h até atingir o regime estacionário.

A não possibilidade de controle de pH nestes experimentos dificultou muito a obtenção de um regime estacionário, que é o que se espera de culturas contínuas, pois o pH ideal para este microrganismo é pH 7,0.

Os problemas com a instabilidade do suporte frente aos componentes do meio de cultivo e ao controle de pH, influenciaram a obtenção de resultados mais consistentes. A escolha pela utilização do alginato de sódio como suporte de imobilização neste trabalho, deve-se ao fato deste já ter sido utilizado em trabalhos anteriores pelo grupo de pesquisa (GABARDO *et al.*, 2012, SILVEIRA, 2007), ser uma técnica de imobilização relativamente fácil, de baixo custo e de fácil obtenção no mercado.

Os trabalhos realizados anteriormente com esferas de alginato, foram realizados utilizando soro de queijo como substrato, que não afetou a durabilidade das esferas. Os resultados obtidos, sugerem que este suporte, nas condições em que foram realizados os experimentos, não pode ser usado para imobilização celular em reatores para conversão biológica de glicerol, pois a durabilidade das esferas vai depender do meio sintético que é utilizado, pois os componentes do meio pode influenciar na durabilidade das esferas.

4.8. Biorreatores com células imobilizadas em leito fixo contínuo

Foram realizados experimentos em biorreatores leito fixo para avaliar o desenvolvimento do microrganismo durante a fermentação. Foram utilizados 60 mL de esferas e 300 mL de meio de cultivo, o experimento foi conduzido a 37 °C. A taxa de diluição usada foi 0,05 h⁻¹, o meio de alimentação possuía 65 g L⁻¹ de glicerol.

A Figura 16 mostra a cinética deste experimento, a partir das 10 h de cultivo quando começa o sistema contínuo, ocorre um período de instabilidade e não ocorre um regime estacionário. Com 72 h de fermentação começa um regime estacionário.

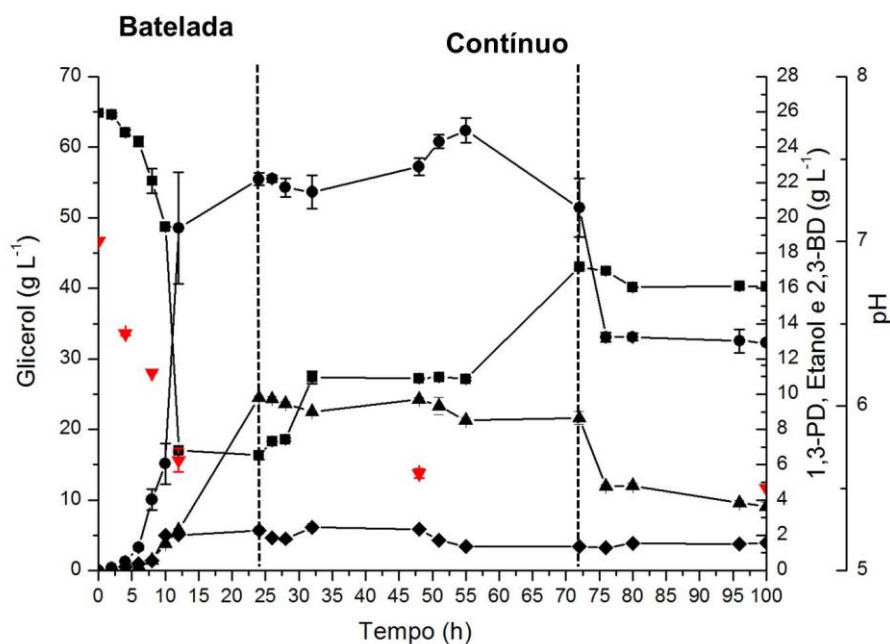


Figura 16. Produção de 1,3-PD em biorreatores com células imobilizadas em leito fixo contínuo. (■) glicerol residual, (●) 1,3-PD, (▲) 2,3-BD, (◆) etanol e (▼) pH. Os resultados representam a média de duplicatas.

Pode-se observar que por ser leito fixo, onde não ocorre recirculação de meio de cultivo a batelada é mais lenta. Quando comparada ao leito fluidizado (Figura 15), onde o sistema interno é homogêneo devido à mistura que ocorre em função da fluidização, aqui no cultivo em batelada leva-se em torno de 24 h para ter a mesma produção de 1,3-PD. Por este motivo o regime contínuo começou com 24 h de cultivo.

A melhor performance dos biorreatores em leito fluidizado reflete uma eficiente transferência de massa deste sistema em relação aos biorreatores em

leito fixo, devido à homogenização do meio que é realizado através da recirculação, com auxílio de bomba peristáltica (GABARDO *et al.*, 2012).

Com relação ao pH, durante o sistema contínuo não foi observado uma alteração significativa, devido ao fato de sempre estar entrando no sistema meio de alimentação novo. Como já foi visto anteriormente, valores de pH inferiores a 6,0 não favorecem a produção de 1,3-PD.

A partir dos resultados aqui apresentados e discutidos, torna-se necessário o aprofundamento de estudo sobre outros suportes de imobilização, que não sejam prejudicados pela composição do meio de cultivo utilizado para a produção de 1,3-PD e para que seja possível o controle de pH do sistema.

Outro ponto que de certa forma é positivo, é que este microrganismo é capaz de produzir grandes quantidades de 2,3-BD. E que o pH é o principal fator que influencia sua produção. Sendo assim, este produto pode ser outra linha de pesquisa possível de ser estudada.

A produção biotecnológica de 2,3-BD tem apresentado um grande interesse por parte de pesquisadores e uma alternativa à síntese química. 2,3-BD possui diversas aplicações práticas como: produção de borracha sintética, plastificantes, fumegantes, agente anticongelante, aditivo de combustível e muitos outros (CELINSKA & GRAJEK, 2009).

4.9 Avaliações das imagens obtidas com microscopia eletrônica (MEV)

Pela observação das imagens de microscopia eletrônica de varredura, observa-se a imobilização do microrganismo. A Figura 17a e 17b mostram a estrutura da esfera (setas brancas) e as células imobilizadas de *K. pneumoniae* BLh-1 (setas pretas) no tempo zero, pelas imagens do MEV células imobilizadas.

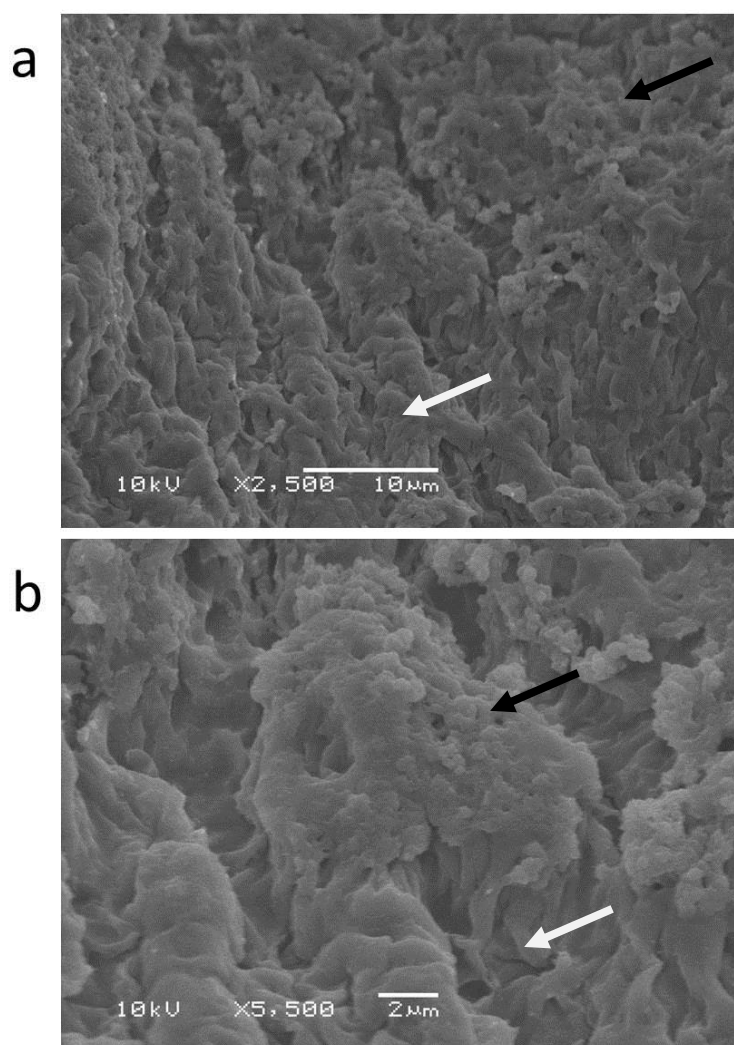


Figura 17. Imagem de Microscopia Eletrônica com esferas no início do experimento. (a) aumento de 2,500 X e (b) aumento de 5,500 X.

A Figura 18a e 18b mostram as imagens obtidas das esferas com células imobilizadas no final da fermentação, mostrando a colonização do microrganismo em toda a esfera. Sugerindo um crescimento vigoroso nas condições do presente trabalho.

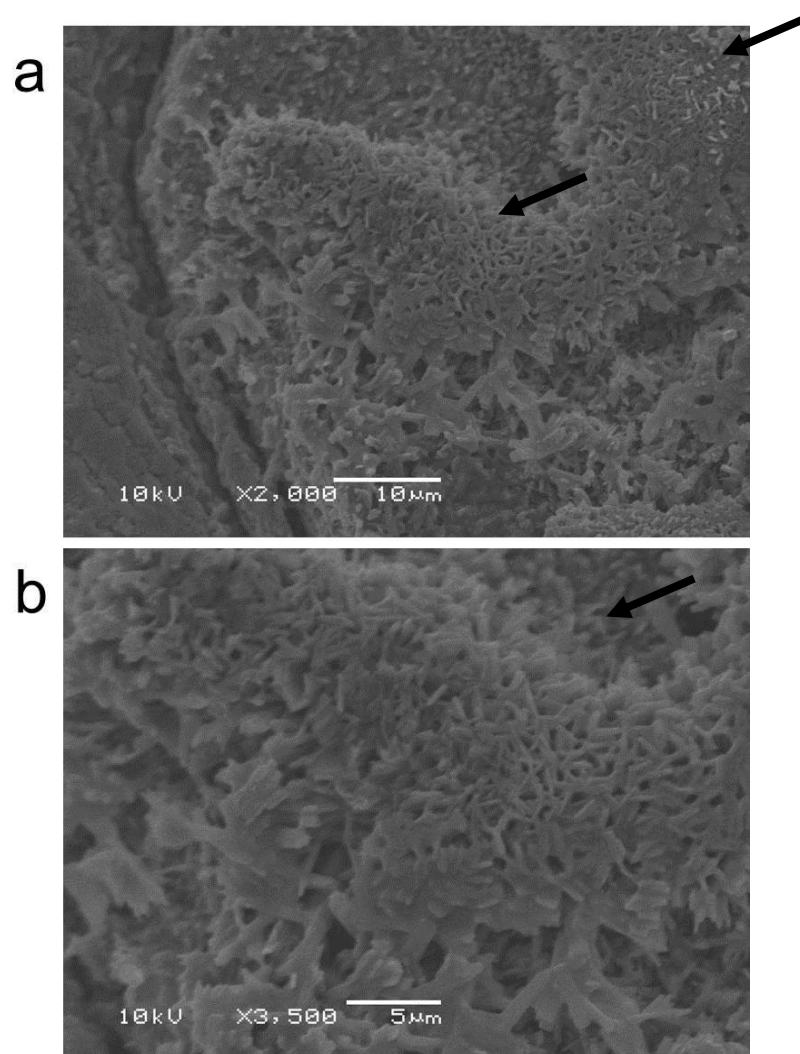


Figura 18. Imagem de Microscopia Eletrônica com esferas no final do experimento. (a) aumento de 2,000 X e (b) aumento de 3,500 X.

Estas imagens estão ilustrando e confirmando que houve imobilização do microrganismo no suporte de imobilização.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo foram determinados como parâmetros a serem utilizados no processo de imobilização, a concentração celular é de 100 mg de biomassa úmida por mL da solução de alginato de cálcio e diâmetro de 3,40 mm como diâmetro das esferas com células imobilizadas, pois apresentaram a melhor produtividade em relação aos parâmetros estudados.

A partir dos resultados apresentados nesse trabalho, pode-se observar a produção de 1,3-PD a partir de glicerol residual utilizando *K. pneumoniae* BLh-1 na forma imobilizada em agitador orbital e que a produtividade de 1,3-PD com células imobilizadas foi melhorada em relação às produtividades obtidas com células em suspensão, sendo a imobilização celular uma opção biotecnológica relevante para a produção de 1,3-PD.

Pela análise dos resultados, foi observado que a reutilização das células imobilizadas por longos períodos de cultivo é possível.

Foi observado a produção de 1,3-PD nos experimentos em biorreatores com células imobilizadas e o controle de pH se configura como necessário para obtenção de melhores resultados em relação a produção de

1,3-PD e para diminuir a produção de outros metabólitos que possam interferir no metabolismo da *K. pneumoniae* BLh-1.

A utilização de alginato de sódio como suporte de imobilização celular não se mostrou adequado, nas condições testadas, devido a sua instabilidade em função da composição do meio de cultivo utilizado nos experimentos e à solução de controle de pH utilizadas.

Através das imagens de microscopia eletrônica observou-se a imobilização e a colonização do microrganismo no suporte de imobilização.

6. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, sugerem-se como continuidade da pesquisa com imobilização celular:

- A busca por novos suportes de imobilização.
- Um estudo mais aprofundado da rota metabólica deste microrganismo, relacionados às enzimas, cofatores e genes envolvidos no metabolismo do microrganismo.
- Busca por outros microrganismos capazes de produzir 1,3- propanodiol.
- Aprofundamento de estudos sobre a produção de 2,3-butanodiol por *K. pneumoniae* BLh-1.
- Avaliar ciclos com células imobilizadas em biorreatores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-NABY, M. A. et al. Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and continuous cultures. **Biochemical Engineering Journal** v. 5. p. 1-9. 2000.

AMORIM, E. L. C. et al. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 34. p. 783-790. 2009.

AMSDEM, B. & TURNER, N. Diffusion Characteristics of Calcium Alginate Gels. **Biotechnology and Bioengineering**. v.65. n. 5. p. 605-610. 1999.

ANP - **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?id=472>>. Acesso: 12 de fevereiro de 2013.

ARRUDA, P. V. et al. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**. v. 26. p. 56-62. 2007.

ASTM – American Society for Testing and Materials. Biodiesel Basics. Disponível em: <<http://www.biodiesel.org/what-is-biodiesel/biodiesel-basics>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2013.

BARBIRATO, F. et al. 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**. V. 7 p. 281-289. 1998.

BARBIRATO, F. et al. Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions. **Research Microbiology**. v. 148. p. 475-484. 1997.

BARON, G. V. et al. Immobilized cell reactors. Em: WIALBERT, R.G. Immobilized living cells systems: Modelling and experimental methods. London: John Willey & Sons. p. 67-95. 1996.

BARRANCO-FLORIDO, E. et al. Immobilization sistem of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 37. p. 513-519. 2001.

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

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

BORENSTEIN, I. M. Uso de alumina como suporte para imobilização de leveduras, Dissertação de mestrado, USP. São Paulo. 2003.

CELINSKA, E. & GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol current state and prospects. **Biotechnology Advances**. P. 715-25. 2009.

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

CHENG, K. K. et al. 1,3 propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. **Biotechnology Letters**. v. 26. p. 911-915. 2004.

CHENG, K. K. et al. Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3 propanediol fermentation. **Biotechnology Letters**. v. 27. p. 19-22. 2005.

CHENG, K-K. et al. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* from glycerol broth. **Biotechnology Letters**. v. 28(22) p. 1817-1821. 2006.

CHOI, W.J. et al. Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 98. p. 1255-1264. 2011.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 28. p. 143-160. 2007.

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

DECKWER, W-D. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 16(2-3). p.143-149. 1995.

DEVI, S. & SHIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Process biochemistry**. v. 36. p. 523-569. 2000.

DROZDYNSKA, A. et al. Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. **Journal of Biotechnology, Computation Biology and Bio nanotechnology**. v. 92(1). p. 92-100. 2011.

DURAN, P. M. & BAILEY, J. E. Effects of immobilization on growth, fermentation properties. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 28. p. 73-87. 1986.

ESTAPÉ, D. et al. Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 14. p. 396-401. 1992.

FORAGE, R. G. et al. Production of extracellular alkaline protease by immobilized of the marine bacterium *Teredinobacter turnirae*. **Process Biochemistry**. v. 38. p. 1445-1450. 2003.

FUKUDA, H. Immobilized microorganism bioreactor. Em: ANSEJO, J.A e MERCHUK, J.C. Bioreactor system design. New York: Marcel Dekker. p.339-375. 1994.

GABARDO, S. et al. Performance of different immobilized-cell systems to efficiently produce ethanol from whey: fluidized batch, packed-bed and fluidized continuous bioreactors. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 87(8). p. 1194-1201. 2012.

GROBOILLOT, A. et al. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 14 (2). p. 75-107. 1994.

GUNGORMUSLER, M. et al. Use of ceramic-based cell immobilization to produce 1,3-propanediol from biodiesel-derived waste glycerol with *Klebsiella pneumonia*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 111(5). p. 1138-1147. 2011.

HAMDY, M. K. et al. Continuous ethanol production by yeast immobilized onto channeled alumina beads. **Biomass**. v. 21. p. 189-206. 1990.

HAO, J. et al. Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 24. p. 1731-1740. 2008.

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

HONG, A. et al. Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. **Journal Chemical Technological Biotechnology**. v. 84. p. 1576-1581. 2009.

HORNG, Y. T. et al. Inactivation of *dhaD* and *dhaK* abolishes by-product accumulation during 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 37(7). p. 707-16. 2010.

IGARI, S. et al. Effects of molecular structure of aliphatic diols and polyalkylene glycol as lubricants on the wear of aluminum. **Wear**. v. 244. p. 180-184. 2000.

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

JUN, S. et al. Microbial Fed-Batch production of 1,3 propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Biochemical Biotechnology**. v. 16. p. 491-501. 2010.

JUNTER, G & JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the Proteome in leader or the cart before the horse. **Biotechnology advances**. v. 22. p. 633-658. 2004.

KAUR, G. et al. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. **Biochemical Engineering Journal**. v. 64 p. 106-118. 2012.

KOSSEVA, M.R. et al. Use of immobilized biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.45. p. 437–447. 2009.

KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**. v. 21. p. 377-397. 2004.

KOUTINAS, A.A. et al. The biochemurgist – Bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**. v.1. p. 24-38. 2007.

KRISHNAN, M.S. et al. Ethanol production from corn starch in a fluidized-bed bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 77. p.359-372. 1999.

LEE, T. H. et al. Performace of an an immobilized yeast reactor system for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 5 p. 41-45. 1983.

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

LÔBO, I. P. & FERREIRA, S. L. C. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**. v. 32. n. 06. p. 1596-1608. 2009.

MENZEL, K. et al. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme Microb. Technol.** v. 20. p. 82-86. 1997.

MU, Y. et al. A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40(3). p. 537-541. 2008.

NAKAMURA, C. E. et al. Method for the production of 1,3-propanediol of recombinant microorganism. United States Patent No. 6. 013. 494. 2000.

NAKAS. J. P. et al. System development for linked-fermentation products of solvents from algal biomass. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 46. p. 1017-1023. 1983.

OH, B. R. et al. Fermentation strategies for 1,3-propanediol production from glycerol using a genetically engineered *Klebsiella pneumoniae* strain to eliminate by-product formation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 35. p. 159-165. 2012.

OH, B. R. et al. Efficient production of ethanol from crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. **Bioresource Technology**. v. 102. p. 3918-3922. 2011.

PAPANIKOLAOU, S. et al. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. **Journal Biotechnology**. v.77. p. 191–208. 2000.

PETROV, K. & PETROVA, P. Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 87. p. 943-949. 2010.

PETROV, K. & STOYNOV, A. Accelerated production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using the method of forced pH fluctuations. **Bioprocess Biosystem Engineering**. v. 35. p. 317-321. 2012.

PILKINGTON, P. H. et al. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. v. 18 (2 e 3). p. 237-255. 1998.

PRADELLA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. Em: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora: Edgard Blücher Ltda., v. 2. p. 355-372. 2001.

QUIRÓS, C. et al. Diffusion of microorganisms in calcium alginate beads. **Biotechnology Techniques**. v. 9. n. 11. p. 809-814. 1995.

RAMAKRISMA, V. S. Microbial fermentations with immobilized cells. **Current Science**. v. 77. p. 87-100. 1999.

REVISTA FAPESP. Resíduos bem-vindos. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/wpcontent/uploads/2012/06/058063_glicerina_196.pdf>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2013. **Revista Fapesp**. ed. 196. p. 58-63. 2012.

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

RIVALDI, J. D. et al. An Evaluation of Different Bioreactor Configurations with Immobilized Yeast for Bioethanol Production. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**. v. 6 A. 115. 2008.

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

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

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

SBRT – Serviço Brasileiro de Resposta Técnica – 2007. Purificação da glicerina vegetal bruta obtida na produção de biodiesel. Disponível em: < <http://sbrt.ibict.br/upload/sbrt4614.pdf?PHPSESSID=a28fb2f325906a5eb65814acd820af0> > Acesso em: 25 de fevereiro de 2013.

SCHMIDELL, E. & FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. Em: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora: Edgard Blücher Ltda. v. 2. p. 355-372. 2001.

SERP, D. et al. Characterization of an Encapsulation Device for the Production of Monodisperse Alginate Beads for Cell Immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 70. n.1. p.41-53. 2001.

SILVA, G. P. et al. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**. v. 27. p. 30-39. 2009.

SILVEIRA, R. F. Produção de etanol por leveduras em biorreatores com células livres e células imobilizadas utilizando soro de queijo. Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do sul, 2007. Dissertação de mestrado. Disponível em:

<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/10386/000595952.pdf?sequence=1>>. Acesso em 04 de Março de 2013.

VELINGS, N. M. e MESTDAGH, M. M. Physico-Chemical properties of alginate gel beads. **Polymers gels and Networks**. v. 3. p. 311-330. 1995.

VERBELEN, P.J. et al. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**. v. 28. p. 1515-1525. 2006.

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

WILLKE, T. & VORLOP, K. Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. **European journal Lipid Science Technology**. v. 110. p. 831-840. 2008.

WONG, C-L. et al. Converting crude glycerol to 1,3-propanediol using resting and immobilized *Klebsiella* sp. HE-2 cells. **Biochemical and Engineering Journal**. v. 58–59(0). p. 177-183. 2011.

XU, Y. Z. et al. Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology Bioengineer**. v. 104. p. 965-972. 2009.

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

YANG, G. et al. Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 73. p. 1017-1024. 2007.

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

YING, M. et al. Microbial production of 1,3 propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnology Letters**. v. 28. p. 1755-1759. 2006.

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

ZHANG, G. et al. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 37. p. 256-260. 2007.

ZHANG, G. et al. Influence of blocking of 2,3-butanediol pathway on glycerol metabolism for 1,3-propanediol production by *Klebsiella oxytoca*. **Applied Biochemical Biotechnology**. 2011.

ZHANG, W. e FRANCO, C. Characterizing the heterogeneity of an immobilized cell gel matrix. **Engineering in Life Science**. v. 2. p. 409-414. 2002.


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

ZHAO, Y-N. et al. Microbial production of 1,3 propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 32. p. 93-99. 2006.

ZHENG, Z. M. et al. Ammonium and phosphate limitation in 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Letters**. v. 32. p. 289 – 294. 2010.

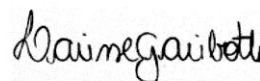
APÊNDICE 1

Laudo enviado pela empresa fornecedora de glicerol residual.

 BS BIOS ENERGIA RENOVÁVEL	Laudo Analítico
---	------------------------

Produto:	Número do Lote:	Data de Carregamento:
9- LICERINA BRUTA	890000001506	

Item Analítico	Unidade	Resultado	Especificação(1)		Métodos
			Min	Máx	
Umidade	% (m)	11.720	-	13.000	AOCS Ca 2e-84
Glicerol	% (m)	81.780	80.000	-	Official Mon.XXI
Cinza	% (m)	5.820	-	8.000	Official Mon.XXI
Cloretos	% (m)	6.000	-	7.000	Método de Mohr
pH		5.370	4.500	9.000	-
MONG	% (m)	0.680	-	2.000	Cálculo



LARISSÉ GARIBOTTI
CRQ 05302605 - 5ª Região / CREA 10.471D

APÊNDICE 2

ARTIGOS PUBLICADOS COMO COAUTORA DURANTE MESTRADO

- Costa, J.B; Rossi, D.M.; Souza, E.A.; PERALBA, M.C.R.; Samios, D.; Ayub, M.A.Z. The optimization of biohydrogen production by bacteria using residual glycerol from biodiesel synthesis. Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic Hazardous Substances and Environmental Engineering, v. 46, p. 1461-1468, 2011. <http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2011.609036>.
- Rossi, D.M.; Costa, J.B ; Souza, E.A ; PERALBA, M.C.R. ; Ayub, M.A.Z. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 4814-4819, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.005>.
- Rossi, D.M.; Costa, J.B; Souza, E.A; PERALBA, M.C.R.; Ayub, Marco Antonio Zachia. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. Renewable Energy, v. 39, p. 223-227, 2012. Doi: 10.1016/j.renene.2011.08.005.
- Rossi, D.M.; Souza, E.A; Ayub, M.A.Z. Biodiesel residual glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae*: pool of metabolites under anaerobiosis and oxygen limitation as a function of feeding rates. Applied Biochemistry and Biotechnology. v. 169, p. 1952-1964, 2013. DOI 10.1007/s12010-013-0114-5.
- Rossi, Daniele Misturini; Souza, Elisangela Aquino de; Flores, Simone Hickmann ; Ayub, Marco Antônio Záchia . Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. Renewable Energy, v. 55, p. 404-409, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2012.12.048>.