

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

Ana Paula Klaus Damasceno

**CONVERSÃO DE GLICEROL RESIDUAL DA SÍNTESE DE BIODIESEL EM
1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL POR CÉLULAS IMOBILIZADAS DE
Klebsiella pneumoniae BLh-1 EM BIORREATORES CONTÍNUOS**

Porto Alegre
2019

Ana Paula Klaus Damasceno

**CONVERSÃO DE GLICEROL RESIDUAL DA SÍNTESE DE BODIESEL EM
1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL POR CÉLULAS IMOBILIZADAS DE
Klebsiella pneumoniae BLh-1 EM BIORREATORES CONTÍNUOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniele Misturini Rossi

CIP - Catalogação na Publicação

Damasceno, Ana Paula Klaus
CONVERSÃO DE GLICEROL RESIDUAL DA SÍNTESE DE
BIODIESEL EM 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL POR
CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 EM
BIORREATORES CONTÍNUOS / Ana Paula Klaus Damasceno.
-- 2019.
84 f.
Orientador: Marco Antônio Zachia Ayub.

Coorientadora: Daniele Misturini Rossi.

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, 2019.

1. Lentikats. 2. biorretor de leito fluidizado. 3.
biorreator de leito fixo. 4. imobilização celular. 5.
Klebsiella pneumoniae BLh-1. I. Ayub, Marco Antônio
Zachia, orient. II. Rossi, Daniele Misturini,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, marido, mãe e pai que sempre me apoiaram, me dando todo o incentivo e ajuda incondicional para que eu conseguisse concluir e também a toda compreensão que tiveram com a minha ausência em diversos momentos.

À dinda Elenita que por muitas noites me hospedou após sair tarde do Laboratório e não ter como voltar para São Leopoldo e por todo carinho que sempre teve comigo.

Ao meu orientador Marco Antônio Záchia Ayub, por ter me aceito para orientação, pelas experiências adquiridas, pelas oportunidades oferecidas, a confiança que depositou em mim e no meu trabalho e por seus conselhos e conversas em que dividiu suas experiências profissionais.

A minha co-orientadora Daniele Misturini Rossi, pela ajuda, conselhos e a evolução que obtive dentro deste trabalho.

Aos bolsistas e estagiários que me ajudaram por todo o meu percurso, em que inúmeras vezes até no sábado e domingo vieram me ajudar, principalmente a minha bolsista Milena Toillier dos Santos.

Aos meus colegas do BiotecLab, sem exceção, tanto os que já saíram como os que ainda estão, pela convivência, ensinamentos e receptividade por estar entrando em um ambiente novo. Também pelas amizades, risadas, brincadeiras, pegadinhas, músicas, jantãs e comemorações que fizeram esses dois anos serem mais leves, alegres e agradáveis.

Aos afilhados, restante da família, amigos e ao grupo Engcats, pela compreensão nesses dois anos em que não me fiz presente em diversas ocasiões e pelo incentivo de que eu era capaz, e ao cunhado/primo Rodrigo pelo auxílio nos desenhos.

A alguns professores da UERGS que me incentivaram a voltar ao mestrado, principalmente a Cristiane Cassales Pibernat que sempre falou que não me via em outro lugar a não ser dentro de um laboratório.

Ao PPGMAA o qual é o programa de pós-graduação em que ingressei na UFRGS, por proporcionar o estudo dentro da área de biotecnologia e microbiologia industrial, fazendo com que eu pudesse realizar este trabalho.

E por fim ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa, pois sem ela não seria possível realizar este trabalho.

CONVERSÃO DE GLICEROL RESIDUAL DA SÍNTESE DE BIODIESEL EM 1,3-PROPANODIOL E 2,3-BUTANODIOL POR CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 EM BIORREATORES CONTÍNUOS¹

Autor: Ana Paula Klaus Damasceno
Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Co-orientadora: Profa. Dra. Daniele Misturini Rossi

RESUMO

Na indústria de biodiesel, além do produto principal há também a formação de subprodutos, sendo um destes o glicerol residual que é gerado em grandes quantidades. Atualmente sabe-se que o glicerol possui um grande potencial para utilização em bioprocessos, utilizando-o como substrato para produção de bioprodutos através da fermentação bacteriana gerando, por exemplo, 1,3-Propanodiol (1,3-PD) e 2,3-Butanodiol (2,3-BD), além de outros produtos como etanol, ácido acético e ácido láctico. Este trabalho teve como objetivo a conversão de glicerol residual da indústria de biodiesel em 1,3-PD e 2,3-BD utilizando células imobilizadas de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 em um tipo de PVA, chamado *Lentikats*®, em biorreatores de leito fixo (RLE) e leito fluidizado (RLF) em operação contínua. As células de *K. pneumoniae* BLh-1 foram imobilizadas pela técnica de envolvimento em matrizes porosas, onde a tecnologia patenteada de imobilização celular em hidrogel de álcool polivinílico (PVA), *Lentikats*® foi empregada. Foram utilizados biorreatores de coluna de 150 mL de volume em RLE e RLF, operados com diferentes vazões de alimentação e saída, que correspondem às taxas de diluição (D) de 0,14, 0,30 e 0,45 h⁻¹ e 0,10, 0,22 e 0,33 h⁻¹, respectivamente. As vazões de entrada e saída e o pH (7,0) foram controlados ou monitorados na unidade de controle do biorreator e a temperatura (37 °C) foi controlada por um banho termostático. Para a fluidização da coluna de células imobilizadas foi adicionada uma vazão de reciclo de aproximadamente 200 mL.min⁻¹. As concentrações de glicerol e dos bioprodutos foram monitoradas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os melhores resultados para produção de 1,3-PD e 2,3-BD foram obtidos com os RLE nos três experimentos realizados. A melhor produtividade para 1,3-PD foi de 8,69 g.L⁻¹.h⁻¹, em uma D=0,45 h⁻¹, no experimento 2. Para 2,3-BD foi no experimento 1 com 2,99 g.L⁻¹.h⁻¹ em uma D=0,3 h⁻¹. O reator de leito fluidizado com controle de pH em 7,0 proporciona uma produção, rendimento e produtividade menores em relação aos outros experimentos para produção de 1,3-PD e 2,3-BD. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que é possível a utilização de reatores contínuos com células imobilizadas de *K. pneumoniae* para a bioconversão de glicerol residual em produtos de valor agregado, em particular, de 1,3-PD e 2,3-BD.

Palavras-chave: *Lentikats*®, reator de leito fixo, Reator de leito fluidizado, glicerol residual, *Klebsiella pneumoniae* BLh-1.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (82 p.) Abril, 2019.

CONVERSION OF RESIDUAL GLYCEROL OF BIODIESEL SYNTHESIS IN 1,3-PROPANODIOL AND 2,3-BUTANODIOL BY IMMOBILIZED CELLS OF *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 IN CONTINUOUS BIOREACTORS²

Author: Ana Paula Klaus Damasceno
Advisor: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Co-Advisor: Profa. Dra. Daniele Misturini Rossi

ABSTRACT

In the biodiesel industry, besides the main product, there is also the formation of by-products, one of which is the residual glycerol that is generated in large quantities. Glycerol has a great potential for use in bioprocesses, using it as a substrate for the production of bioproducts through bacterial fermentation generating, for example, 1,3-Propanediol (1,3-PD) and 2,3-Butanediol (2,3-BD), as well as other products such as ethanol, acetic acid, and lactic acid. This work aimed at converting residual glycerol from the Biodiesel industry to 1,3-PD and 2,3-BD using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 cells in a PVA (*Lentikats*®) in fixed bed bioreactors (RLE) and fluidized bed (RLF) in continuous operation. *K. pneumoniae* BLh-1 cells were immobilized in porous matrix wrapping technique, where patented *Lentikats*® polyvinyl alcohol hydrogel (PVA) cellular immobilization technology was employed. Bioreactors of 150 mL were used in RLE and RLF, operated under different dilution rates, corresponding to (D) of 0.14, 0.30, and 0.45 h⁻¹ and 0.10, 0.22 and 0.33 h⁻¹, respectively. The inlet and outlet flow rates and the pH (7.0) were either controlled or monitored at the bioreactor control unit and the temperature was (37 °C). For fluidization a recycle flow rate of approximately 200 mL.min⁻¹ was added. The concentrations of glycerol and bioproducts were monitored by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The best results for the production of 1,3-PD and 2,3-BD were obtained with the RLE in the three experiments. The best productivity for 1,3-PD was 8.69 g.L⁻¹.h⁻¹ in a D = 0.45 h⁻¹, in experiment 2. For 2,3-BD was in experiment 1 with 2.99 g.L⁻¹.h⁻¹ at a D = 0.3 h⁻¹. The fluidized bed reactor with pH control at 7.0 provides lower yields and productivity than the other experiments for the production of 1,3-PD and 2,3-BD. The results obtained in this work shows that it is possible to use immobilized cells of *K. pneumoniae* to convert in continuous cultures residual biodiesel into products of commercial importance, such as 1,3-PD and 2,3-BD.

Key works: *Lentikats*®, fixed bed bioreactors, fluidized bed reactor, residual glycerol, *Klebsiella pneumoniae* BLh-1.

² Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (82 p.) April, 2019.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1	Geral	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1.	Biodiesel e Glicerol	3
3.2.	Microrganismo	7
3.3.	Bioprodutos: 1,3-PD e 2,3-BD	14
3.4.	Imobilização celular	17
3.4.1.	<i>Lentikats</i> ®	20
3.5.	Biorreatores de células imobilizadas: Tipos e modo de operação	24
3.5.1.	Operação contínua	24
3.5.2.	Reatores de leito fixo e fluidizado	27
4.	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Substrato e sua caracterização	30
4.2	Microrganismo e sua manutenção	30
4.3	Imobilização do Microrganismo	30
4.4	Fermentação em biorreatores	33
4.4.1.	Biorreatores: <i>Design</i> , montagem e especificações	33
4.4.2.	Controle do Bioprocesso	35
4.4.3.	Reator de Leito Fixo em operação contínua	35
4.4.4.	Reator de Leito Fluidizado em operação contínua	37
4.4.5.	Métodos analíticos	38
4.4.6.	Cálculos dos parâmetros cinéticos	39
4.5	Análise de Microscopia Eletrônica por Varredura	39
4.6	Descarte de resíduos	39
5.	RESULTADOS	41
5.1.	Experimento 1	41
5.2.	Experimento 2	45
5.3.	Experimento 3	51

5.4.	Análise das imagens por MEV	52
6.	DISCUSSÃO	56
7.	CONCLUSÃO	63
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS	64
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
10.	APÊNDICES	73
11.	ANEXOS	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento teórico máximo, produção de ATP e balanço redox durante a produção microbiológica de diferentes metabólitos a partir de glicerol	10
Tabela 2: Imobilização celular com LentiKats® em diferentes microrganismos, fonte de carbono e produtos formados com a cinética.....	22
Tabela 3: Características gerais de operação entre os biorreatores de leito fixo e fluidizado com células imobilizadas.....	29
Tabela 4: Resultados do reator de leito fluidizado do experimento 1	43
Tabela 5: Resultados do reator de leito fixo do experimento 1.....	44
Tabela 6: Resultados do reator de leito fluidizado do experimento 2	48
Tabela 7: Resultados do reator de leito fixo do experimento 2.....	49
Tabela 8: Resultados do reator de leito fixo do experimento 3.....	52
Tabela 9: Reatores contínuos de leito fixo e fluidizado com células imobilizadas de <i>K. pneumoniae</i> sem controle de pH.....	59
Tabela 10: Reatores contínuos de Leito Fluidizado com diferentes células imobilizadas para produção de 1,3-PD	60
Tabela 11: Produção dos Dióis (1,3-PD e 2,3-BD) em diferentes sistemas de operação	60
Tabela 12: Reatores de Leito Fixo para produção de 1,3-PD por <i>K. pneumoniae</i> imobilizada em diferentes suportes	61
Tabela 13: Resultados dos Testes bioquímicos	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de transesterificação de triglicerídeos para produção de Biodiesel.	3
Figura 2: Mapa de distribuição de usinas de biodiesel pelo Brasil e suas capacidades.	5
Figura 3: Rota Metabólica de <i>K. pneumoniae</i> utilizando glicerol como substrato.....	8
Figura 4: Oxidação do glicerol pela rota fermentativa e respiratória.	10
Figura 5: Rota metabólica expandida do glicerol em <i>K. pneumoniae</i>	14
Figura 6: Representação esquemática de uma lente do suporte Lentikats®.	20
Figura 7: Tipos de reatores contínuos para células imobilizadas.	25
Figura 8: Faixa de operação de um sistema contínuo genérico.	27
Figura 9: Etapas do processo de imobilização.	33
Figura 10: Etapas finais de imobilização.	33
Figura 11: Representação esquemática mangueira de alimentação com adaptador	34
Figura 12: Representação esquemática da mangueira de saída.	34
Figura 13: Fotos dos materiais que compõem a montagem do Biorreator.	35
Figura 14: Representação esquemática do sistema operacional do reator de leito fixo	36
Figura 15: Biorreator de leito fixo montado com unidade de controle e frascos de coleta e alimentação.	36
Figura 16: Representação esquemática do sistema operacional do reator de leito fluidizado	37
Figura 17: Biorreator de leito fluidizado montado com unidade de controle, bomba de recirculação e frascos de coleta e alimentação.	38
Figura 18: Cinética reator Leito Fluidizado do experimento 1.	41
Figura 19: Cinética reator Leito Fixo do experimento 1.	42
Figura 20: Cinética do reator de leito fluidizado na $D=0,10\text{ h}^{-1}$ do experimento 2.	46
Figura 21: Cinética do reator de leito fluidizado na $D=0,33\text{ h}^{-1}$ do experimento 2.	46
Figura 22: Cinética do reator de leito fixo na $D=0,14\text{ h}^{-1}$ do experimento 2.....	47
Figura 23: Cinética do reator de leito fixo na $D=0,45\text{ h}^{-1}$ do experimento 2.....	47
Figura 24: Cinética do reator de leito fixo do experimento 3.	51
Figura 25: Imagens de MEV do biocatalizador em 30 X.	53
Figura 26: Imagem de MEV do biocatalizador em 1000 X	54
Figura 27: Imagem de MEV do biocatalizador em 5000 X.	55
Figura 28: Projeto biorreator de coluna de vidro	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,3-PD	1,3-Propanodiol
2,3-BD	2,3-Butanodiol
3-HPA	3-hidroxipropionaldeído
3PG	3-fosfoglicerato
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás e Biocombustíveis
BiotecLab	Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia
CGTRQ	Central de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CMM	Centro de microscopia e microanálise
CSTR	<i>Continuous stirred tank reactor</i>
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
D	Taxa de diluição
D _e	Diâmetro externo
DHA	Di-hidroxiacetona
DHAP	Fosfato de di-hidroxiacetona
D _i	Diâmetro interno
DO	Densidade ótica
DPR	Desvio padrão relativo
EtOH	Etanol
Eq	Equação
F	Vazão de alimentação
GDH	Glicerol desidrogenase,
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
LB	Luria-Bertani
MEV	Microscopia eletrônica por varredura
MWCO	Molecular weight cut-off
OSRH	Hidrolisado de palha de canola
PDOR	1,3-propanodiol oxidoreductase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFR	<i>Plug flow reactor</i>
PPP	Via das pentoses fosfato
PVA	Álcool Polivinílico
Q _P	Produtividade volumétrica de produtos
Q _x	Produtividade volumétrica de biomassa
RLE	Reator leito fixo/empacotado
RLF	Reator leito fluidizado
SBH	Hidrolisado de bagaço de cana
STR	<i>Stirred tank reactor</i>
τ	Tempo de residência
TCA	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
V	Volume de operação do reator
Y _{P/S}	Rendimento

1. INTRODUÇÃO

O glicerol é o principal subproduto gerado na síntese de biodiesel e sua fração corresponde a aproximadamente 10 % do volume total desta produção. Com o aumento da demanda por biocombustíveis alternativos nos últimos anos, como por exemplo biodiesel, e com uma projeção maior ainda para os próximos anos, há também um aumento na quantidade dos subprodutos gerados, passando o glicerol a ser um subproduto excedente, o que já vem sendo evidenciado na baixa do preço do mesmo nos últimos anos.

Diversos estudos em bioprocessos estão sendo propostos devido ao glicerol possuir um grande potencial para utilização em bioconversões, sendo utilizado como substrato (fonte de carbono) para produção de uma grande gama de produtos químicos, os quais poderiam ser usados como produtos finais ou matérias-primas para a produção de outros químicos. Entre estes, estão o 1,3-PD e 2,3-BD, que são amplamente utilizados na indústria de polímeros. A produção biotecnológica destes químicos tem despertado um grande interesse pelos pesquisadores, como uma alternativa à síntese química. Além destes, outros bioprodutos como etanol, hidrogênio, ácido acético e ácido lático, também podem ser produzidos por serem metabólitos nas rotas fisiológicas de diversos microrganismos.

A tecnologia de imobilização celular, associada ao uso de reatores contínuos em bioprocessos tem sido amplamente estudada e difundida nas últimas décadas por melhorar o desempenho e eficiência nos processos biotecnológicos proporcionando uma maior produtividade, diminuição no tempo de fermentação e redução dos riscos de contaminação. Estudos mostram a necessidade de se testar novos suportes de imobilização celular que sejam mais estáveis e resistentes quanto ao aumento das taxas de diluição, composição do meio (normalmente composto por agentes quelantes, como tampão fosfato) e ao controle de pH. Como resposta a este problema, a imobilização celular em hidrogel de álcool polivinílico (PVA) tem surgido como uma opção viável entre os sistemas de imobilização celular.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo principal deste projeto foi avaliar a produção de bioprodutos de potencial interesse industrial, como 1,3-PD e 2,3-DB, através da bioconversão em biorreatores contínuos com células imobilizadas de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 em PVA utilizando glicerol residual como fonte de carbono.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência na utilização de células de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 imobilizadas em PVA em bioprocessos com reatores contínuos;
- Avaliar microscopicamente as estruturas e a biomassa nas lentes de PVA após a imobilização do microrganismo, ao final de cada reator e após seu reuso;
- Comparar a produção de 1,3-PD e 2,3-BD com células imobilizadas em PVA em diferentes taxas de diluição;
- Verificar a co-produção de outros metabólitos como bioprodutos de valor agregado;
- Comparar a produção dos principais bioprodutos entre os reatores de leito fixo e leito fluidizado em operação contínua;
- Verificar as limitações de operação dos biorreatores testados para processo contínuo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biodiesel e Glicerol

Biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural. Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol, obtido a partir de cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel, que é adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis. Atualmente, 18 % dos combustíveis consumidos no Brasil já são renováveis (A.N.P - Agência Nacional Do Petróleo, 2017).

O biodiesel é uma mistura de alquil ésteres de cadeia linear e é produzido a partir da reação de transesterificação (Figura 1) de óleos vegetais ou de gorduras animais que reagem com álcoois primários (cadeia curta), tendo como coproduto o glicerol (Lôbo, Ferreira, Da Cruz, 2009) (A.N.P - Agência Nacional Do Petróleo, 2019a).

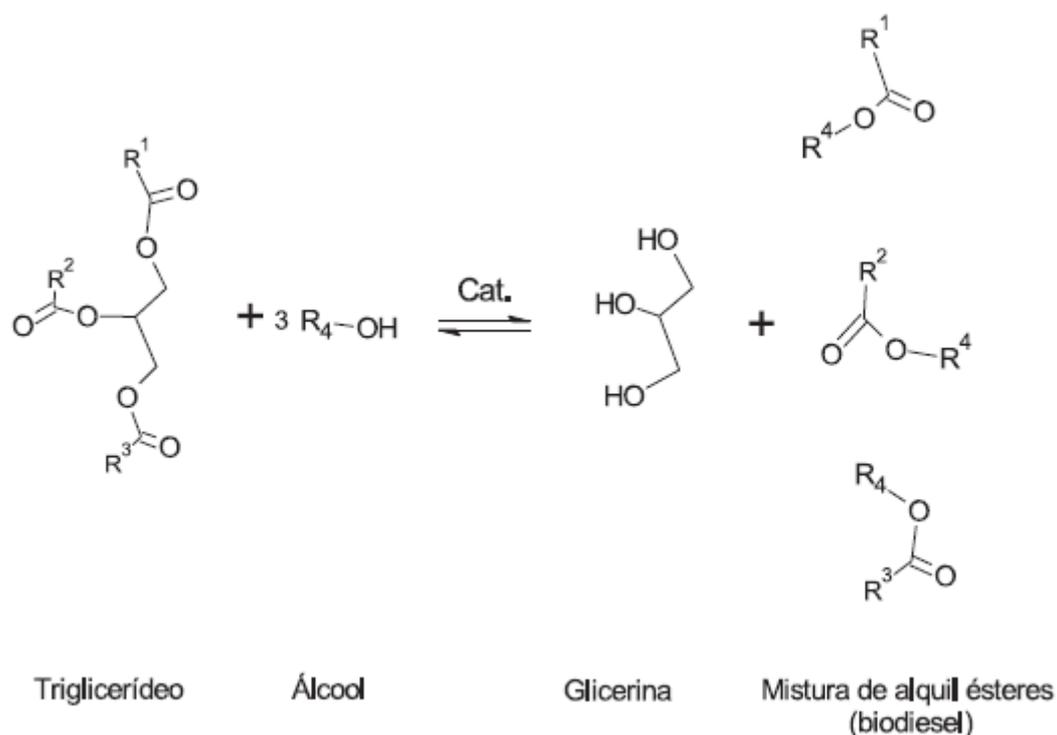


Figura 1: Reação de transesterificação de triglicerídeos para produção de Biodiesel.

Fonte: Lôbo, Ferreira, Da Cruz (2009)

O termo glicerol aplica-se somente ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol. O termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados, normalmente, contendo pelo menos 95 % de glicerol. A denominação glicerina loira ou glicerol residual é normalmente utilizada para a glicerina oriunda dos processos de produção do biodiesel, onde a fase glicerínica sofreu um tratamento ácido para neutralização do catalisador e remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo. Em geral, esta glicerina contém cerca de 80 % de glicerol, além de água, metanol e sais dissolvidos (Mota, Da Silva, Gonçalves, 2009).

Conforme o último boletim mensal do Biodiesel de março de 2019, atualmente existem 52 plantas produtoras de biodiesel autorizadas para operação no país, correspondendo a uma capacidade total de $23.720,02 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$. Há ainda plantas com autorização para construção e outras para ampliação da capacidade de produção. Após a conclusão dessas obras e devida autorização de operação, a capacidade total de produção de biodiesel poderá ser aumentada em $2.050 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$, que representa um acréscimo de 8,64 % na capacidade atual (A.N.P - Agência Nacional Do Petróleo, 2019b). Por volta de 10 % dessa produção, atual $23.720,02 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$ e projeção $25.770,02 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$, é de glicerol.

A Figura 2 mostra a capacidade produtiva e a sua distribuição em cada região e estado no Brasil. A Unidade Federativa (UF) com maior capacidade de produção de biodiesel é o Rio Grande do Sul, com nove plantas autorizadas em operação com um volume de $6.533,33 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$. Porém a região com maior produção é a Centro-Oeste, que contempla os estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, totalizando 24 usinas com uma capacidade de $9.411,46 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$, deixando a região sul em segundo lugar com 13 plantas e $9.026,33 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$ (A.N.P - Agência Nacional Do Petróleo, 2019c).

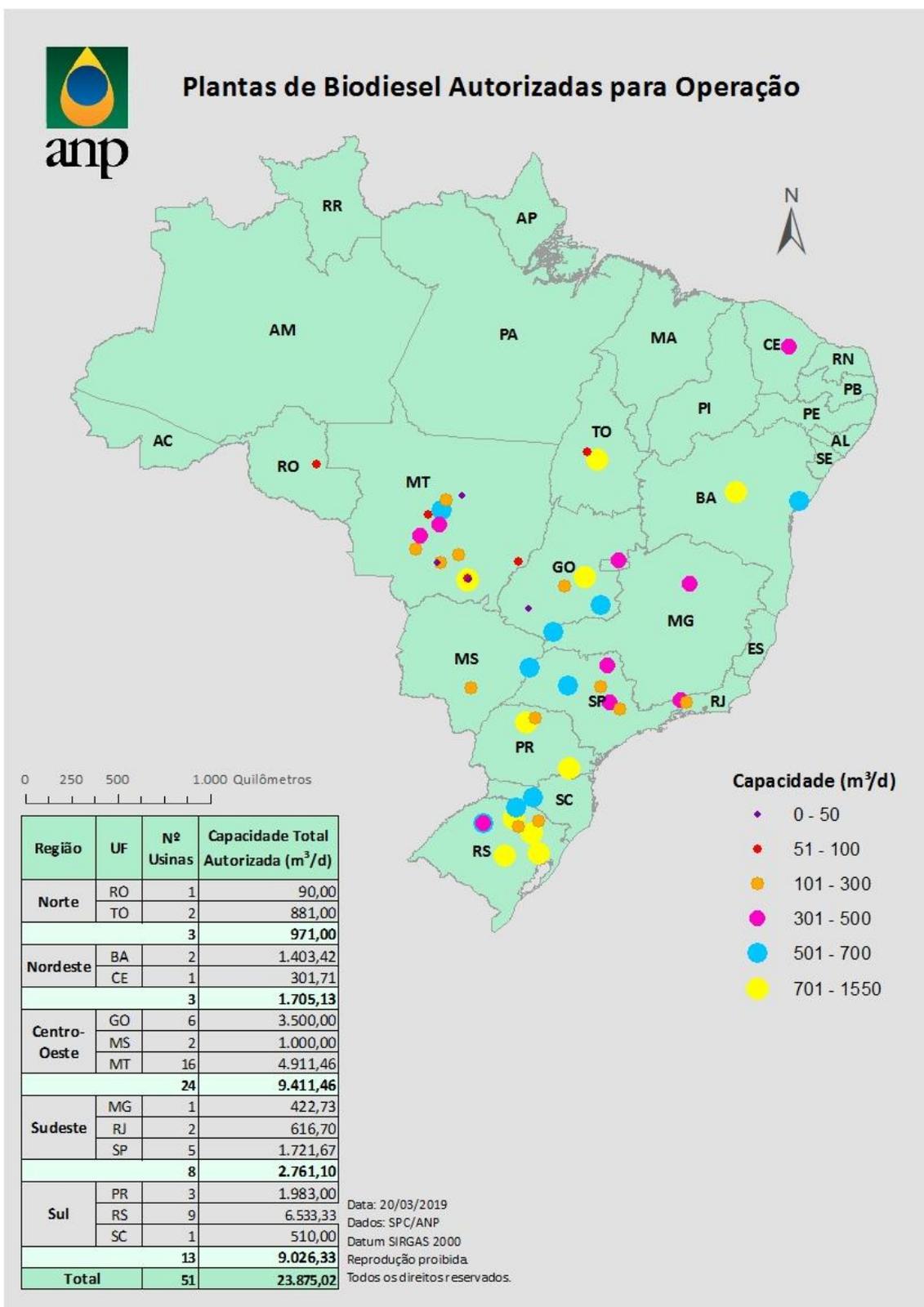


Figura 2: Mapa de distribuição de usinas de biodiesel pelo Brasil e suas capacidades.

Fonte: A.N.P. (2019c)

Com esta grande produção, este subproduto poderá exceder ao

volume absorvido pelo mercado tradicional (indústria de cosméticos, de resinas, farmacêutica, têxtil, alimentícia), ocorrendo a baixa de preço. Um grande receio é que esse excesso de glicerina produzida, altamente poluidora, possa ser descartado de maneira irresponsável no meio ambiente. Sua eliminação ou destinação final é complexa e torna-se cara, impactando economicamente a indústria. Diante desta realidade, estão sendo desenvolvidas pesquisas voltadas à utilização deste volume excedente de glicerol (Gonçalves, Perez, Ângelo, 2009).

O glicerol pode ser convertido em diversos intermediários químicos de valor industrial, tanto por síntese química, quanto por conversão biotecnológica. A conversão microbiana do glicerol apresenta vantagens em relação às sínteses químicas, como por exemplo, requer menor número de etapas, emprega temperaturas medianas e pressão ambiente, não gera intermediários tóxicos e geralmente são obtidos isômeros opticamente puros (Da Silva, Mack, Contiero, 2009).

Desta forma, uma aplicação atualmente promissora é a utilização de glicerol residual como substrato (fonte de carbono) em bioprocessos. Na literatura já existem diversos estudos utilizando glicerol residual da indústria de biodiesel para esta finalidade, entre eles estão: a produção de 1,3-PD com células livres e imobilizadas de *Clostridium butyricum* DSM 10702 (Loureiro-Pinto *et al.*, 2017); produção 1,3-PD usando células imobilizadas de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 (De Souza, Rossi, Ayub, 2014); produção de hidrogênio utilizando um consórcio microbiano ambiental (Rossi *et al.*, 2011); produção de 1,3-PD, ácido cítrico e *single cell oil* (Papanikolaou *et al.*, 2008); a aplicação em escala piloto para produção 1,3-propanodiol e co-produção de 2,3-butanodiol (Park, Rathnasingh, Song, 2017); na utilização de novos biocatalisadores para conversão em 2,3-BD (Ripoll *et al.*, 2016); cultivo em batelada alimentada exponencial sob anaerobiose para produzir produtos de valor agregado (Morcelli *et al.*, 2018); estudo de estratégias de operação em batelada alimentada para produção de 1,3-PD e os subprodutos 2,3-BD, EtOH e ácido láctico (Yang *et al.*, 2018).

3.2. Microrganismo

As bactérias da espécie *Klebsiella pneumoniae* são pertencentes ao Reino, Bactéria; Filo, *Proteobactéria*; Classe, *Gammaproteobactéria*; Ordem, *Eubacteriales*; Família, *Enterobacteriaceae*. Elas possuem morfologia microscópica de bastonetes curtos (0,3-0,5 μm por 5 μm) com extremidades arredondadas. São encapsuladas, não móveis e Gram negativas. Suas colônias em Agar normalmente são convexas, translúcidas, brilhantes, mucóides, inteiras, lisas e possuem coloração branca. São aeróbias e anaeróbias facultativas e sua temperatura ótima de crescimento é 37 °C. Sua caracterização bioquímica é positiva para produção de gás, utilização de citrato de amônio como única fonte de carbono, produção de nitritos a partir de nitratos, e negativa para produção de indol, sulfato de hidrogênio, vermelho de metila. A ureia pode ser ou não ser decomposta lentamente. Este microrganismo é frequentemente encontrado no trato respiratório, intestinal e urogenital de humanos, mas pode também ser isolado de vários animais, materiais e do ambiente (Holt, 2000).

Este microrganismo possui enzimas capazes de utilizar glicerol como substrato tanto em seu metabolismo aeróbio como no anaeróbio (Kumar, Park, 2018). Este processo é demonstrado na Figura 3, que envolve duas rotas metabólicas paralelas em um processo de dismutação. Para isso, primeiramente o glicerol deve estar disponível no citosol e isto ocorre devido ao processo de difusão facilitada e proteínas localizadas na membrana citoplasmática, denominadas permeases (Huang, Gong, Tsao, 2002).

Nesta bactéria pela via reductiva o glicerol é desidratado pela enzima glicerol desidratase (GDHt), que é B₁₂ dependente, cuja síntese deste cofator é limitada a poucos gêneros de microrganismo. A GDHt é a enzima chave e limitante deste processo que forma 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA), o qual é então reduzido a 1,3-PD por duas oxidoreduções, a 1,3-propanodiol oxidoredução (PDOR) codificada pela *dhaT*, dependente de NADH e uma oxidoredução hipotética, dependente de NADPH (HOR). Portanto a via reductora regenera o NAD⁺, possibilitando a assimilação oxidativa do glicerol, e é a responsável pelo crescimento de *K. pneumoniae* em condições anaeróbias (Huang, Gong, Tsao, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Kumar, Park, 2018).

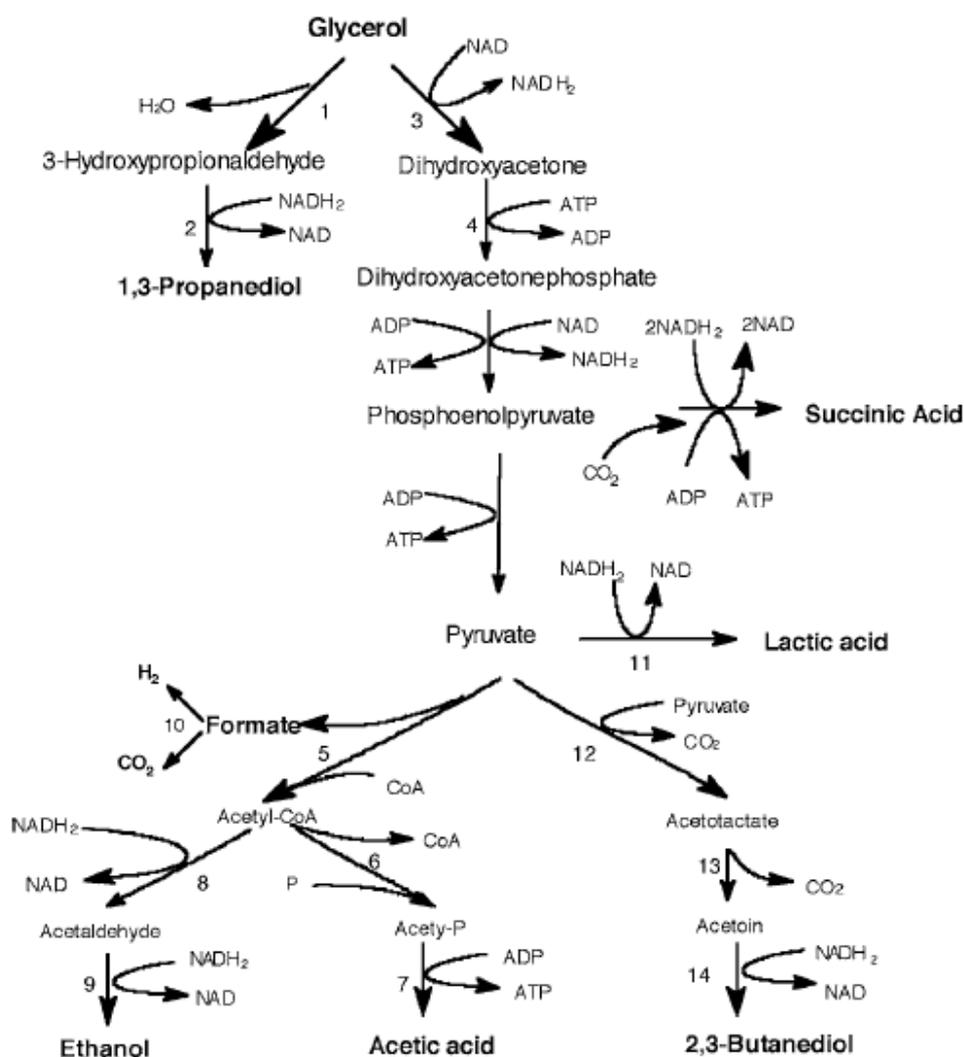


Figura 3: Rota Metabólica de *K. pneumoniae* utilizando glicerol como substrato.³

Fonte: Huang, Gong, Tsao (2002).

Pela via oxidativa o glicerol é desidrogenado pela enzima glicerol desidrogenase (GDH) a dihidroxiacetona (DHA), que é então posteriormente metabolizada até piruvato pela via glicolítica. A via oxidativa também fornece

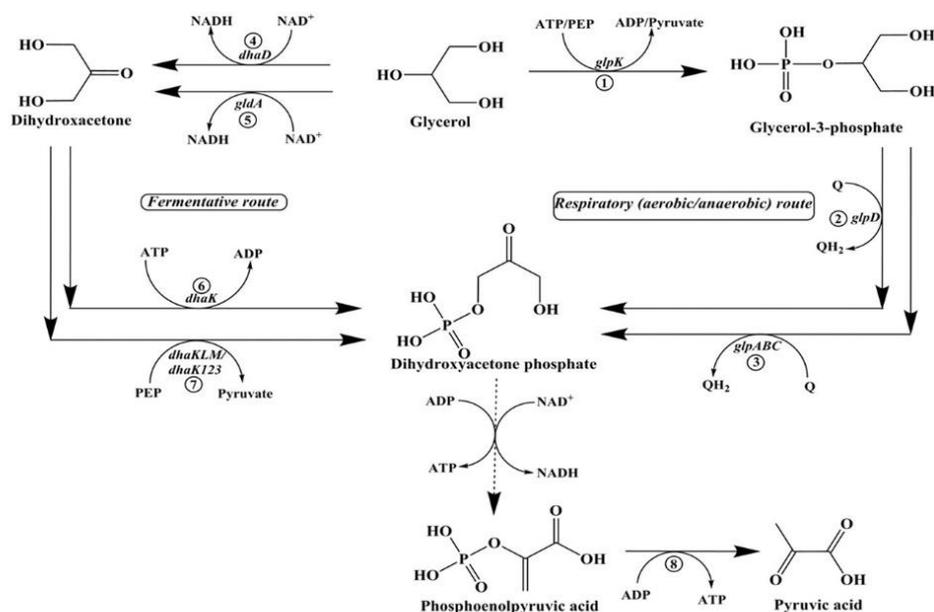
³ Legenda: 1 - Glicerol desidratase; 2 - 1,3-propanediol oxidoreductase; 3 - Glicerol desidrogenase; 4 - Dihidroxiacetona quinase; 5 - Formiato piruvato-liase; 6 - Fosfoacetilase; 7 - Acetato quinase; 8 - Acetaldeido desidrogenase; 9 - Álcool desidrogenase; 10 - Complexo Formiato hidrogênio-liase; 11 - D-lactato desidrogenase; 12 - Acetolactato sintase; 13 - Acetolactato descarboxilase; 14. 2,3-Butanediol desidrogenase. (Huang, Gong e Tsao, 2002).

energia e constituintes de carbono para a síntese da biomassa celular (Huang, Gong, Tsao, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Kumar, Park, 2018).

A oxidação do glicerol pode prosseguir de duas maneiras, pela rota respiratória e/ou fermentativa. A respiração requer um aceptor de elétrons exógeno, como oxigênio, nitrato ou fumarato e é realizado por enzimas codificadas pelo regulon *glp*. Durante a respiração, o glicerol é primeiro fosforilado pela enzima glicerol quinase (*glpK*) para produzir glicerol-3-fosfato usando ATP ou fosfoenolpiruvato (PEP) como um doador de fosfato. Em seguida, o glicerol-3-fosfato é oxidado em fosfato de di-hidroxiacetona (DHAP) com transferência de elétrons para uma molécula de quinona, que está ligada à cadeia de transporte de elétrons (CTE). Esta transformação é catalisada pela glicerol-3-fosfato desidrogenase, que é expressa sob condições aeróbias (*glpD*) e anaeróbias (*glpABC*). Em contraste, a fermentação de glicerol é conduzida sem um suprimento de receptores de elétrons externos, e as reações são catalisadas por enzimas codificadas pelo regulon *dha*. Aqui, o glicerol é oxidado em DHA pela enzima glicerol desidrogenase (principalmente codificada por *dhaD*) usando NAD^+ como um aceptor de elétrons. A DHA é então fosforilada pela di-hidroxiacetona-quinase, uma enzima codificada pelo *dhaK1/dhaK* dependente de ATP e/ou *dhaK2/dhaKLM /dhaK123* dependente de PEP. DHAP obtida da respiração e/ou fermentação é canalizado para a via glicolítica (Figura 4). Uma variedade de ácidos orgânicos e álcoois, incluindo ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, EtOH, 2,3-BD e ácido fórmico, são produzidos pela via em sequência (Figura 3) (Kumar, Park, 2018).

No entanto, isso é verdade se considerarmos apenas as reações proximais do ramo oxidativo, uma vez que as reações distais, catalisadas pela desidrogenase láctica, aldeído desidrogenase, álcool desidrogenase, 2,3-butanodiol desidrogenase, todas requerem uma forma reduzida de NADH, e assim competem com o PDOR pelo cofator (Celińska, 2012).

Na Tabela 1 encontra-se os valores de rendimento teórico máximo para cada produto da rota metabólica de *K. pneumoniae* utilizando glicerol como substrato. Nela ainda se encontram valores de produção de ATP, assim como NADH gerado e consumido pela formação de cada metabólito através de diferentes rotas (Kumar, Park, 2018).



Key enzymes: 1- Glycerol kinase; 2- Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (anaerobic); 3- Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (aerobic); 4- Glycerol dehydrogenase; 5- Putative glycerol dehydrogenase; 6- Dihydroxyacetone kinase I; 7- Dihydroxyacetone kinase II; 8- Pyruvate kinase

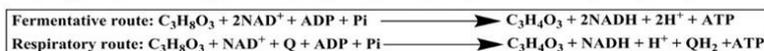


Figura 4: Oxidação do glicerol pela rota fermentativa e respiratória.

Fonte: Adaptado de Kumar, Park (2018)

Tabela 1: Rendimento teórico máximo, produção de ATP e balanço redox durante a produção microbológica de diferentes metabólitos a partir de glicerol

Metabólitos	Máximo rendimento teórico (g/g)	ATP gerado / metabólito (mol / mol)	Redox restrito [NAD(P)H gerado & consumido / metabólito]
1,3-PD $C_3H_8O_2$	0,73	0	SIM (0 & 1)
2,3-BD $C_4H_{10}O_2$	0,63	2	SIM (1 & 0)
EtOH C_2H_6O	0,58	1	SIM / Não (2/3 & 2)
Ácido Lático $C_3H_6O_3$	1,14	1; -1	SIM (2 & 0; 1 & 0)
Ácido Acético $C_2H_4O_2$	1,14	1; 2	SIM (2/3 & 0)
Ácido succínico $C_4H_6O_3$	1,28	0; 1	Não (2 & 2)
Ácido pirúvico $C_3H_4O_3$	1,34	1	SIM (2/3 & 0)
Ácido 3-hidroxipropiônico $C_3H_6O_3$	1,14	0; 1	SIM (1&0)
Butanol $C_4H_{10}O$	0,47	2	SIM (6&4)

Retirado e adaptado de Kumar, Park (2018).

A preferência por determinada via metabólica depende da fonte do nutriente limitante. Se a fonte de carbono é o limitante, será utilizada a via que rende o máximo de energia. Para *Klebsiella pneumoniae*, conforme Zeng *et al.* (1994) essa via é a via do etanol, desfavorecendo a via do 1,3-PD e do ácido acético.

O efeito inibitório que o substrato e os produtos exercem sobre *K. pneumoniae* são diferentes em anaerobiose ou aerobiose (Cheng, Liu, Liu, 2005). Em aerobiose é utilizada a via do regulon *glp*, na qual uma quinase ATP-dependente fosforila o glicerol a glicerol-3-fosfato, que é convertido em DHAP. De acordo com Forage, Lin (1982) o regulon *dha* é induzido em anaerobiose independentemente da concentração de glicerol. Em aerobiose, esta via só é induzida com alta concentração de glicerol, pois em baixa concentração, o regulon *glp* será induzido (Fig. 4). Em relação ao glicerol, a tolerância é maior em aerobiose do que em anaerobiose. Em anaerobiose, acetato é o principal metabólito inibidor, seguido de lactato e etanol. A tolerância ao 1,3-PD é menor em anaerobiose chegando a 69 g.L⁻¹. Em aerobiose, a inibição maior ocorre devido ao etanol, seguido de lactato e acetato (Cheng, Liu, Liu, 2005)

A fermentação do glicerol por enterobactérias sofre inibição devido ao acúmulo de 3-HPA, intermediário da via propanodiólica que é altamente tóxico. A inibição reduz significativamente a atividade biológica e é dependente do pH. *Klebsiella pneumoniae* acumula 3-HPA de forma transitória (Barbirato *et al.*, 1996; Barbirato *et al.*, 1998).

Visando reduzir o acúmulo de 3-HPA e aumentar o suprimento da coenzima NADH em *K. pneumoniae* estudos de biologia molecular foram realizados com este intuito. Chen, Liu, Liu (2009) avaliaram o efeito da super expressão dos genes *dhaD* (GDH) e *dhaT* (PDOR). Nos recombinantes, a atividade das respectivas enzimas foi maior, bem como aumentou a razão entre a atividade enzimática entre PDOR/GHDt e a produção de NADH, com a razão NADH/NAD maior que 1,0. Desta forma, observou-se redução no acúmulo de 3-HPA devido a maior conversão deste em 1,3-PD. Em comparação com o controle em batelada, o acúmulo de 3-HPA reduziu em 52,2 %, enquanto em batelada alimentada, a redução foi de 33,3 %, com concentração de 1,3-PD de 59,2 g.L⁻¹.

Com o objetivo de melhorar a produção de 1,3-PDO por *K. pneumoniae*, diferentes abordagens já foram estudadas. Uma delas é reduzir ou eliminar a formação de coprodutos que concorrem diretamente com o produto de interesse. Diversos estudos foram realizados com este intuito avaliando diversas técnicas desde ferramentas de biologia molecular e análise de fluxo metabólico (Zhang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2016; Park, Rathnasingh, Song, 2017; Zong *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019) até melhores condições e parâmetros de operação (Cheng *et al.*, 2004; Ma, BB *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Rossi, De Souza, Ayub, 2013).

Devido à grande similaridade e proximidade bioquímica de *Klebsiella spp* com *Escherichia coli*, que é o microrganismo mais estudado e com maior disponibilidade de ferramentas e protocolos da área da engenharia genética, permite que estudos com *K. pneumoniae* utilize dessas técnicas que são amplamente desenvolvidas. Neste contexto, Zang *et al.* (2006), inativaram o gene aldeído desidrogenase de *K. pneumoniae*, com o objetivo de melhorar a produção de 1,3-PD através da engenharia da via de formação de etanol com intuito de diminuir a sua produção que compete por cofatores NADH com a rota de 1,3-PD, obtendo resultados melhores em relação à linhagem parental. A análise do fluxo metabólico revelou que ocorreu uma redistribuição pronunciada do fluxo metabólico intracelular. Concentração, produtividade e rendimento de 1,3-PD em relação ao glicerol da linhagem mutante atingiram $70,6 \text{ g.L}^{-1}$, $1,07 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $0,58 \text{ g.g}^{-1}$, respectivamente, que foram muito superiores aos da estirpe parental. Adicionalmente, a capacidade específica de produção de 1,3-PD (1,3-PD produzido por grama de células) da estirpe mutante foi 2 vezes a da estirpe parental. Ao aumentar a disponibilidade de NADH, este estudo demonstrou uma importante abordagem de engenharia metabólica para melhorar a eficiência de bioprocessos acoplados a oxidorredução.

Os estudos de fluxo metabólico elucidam pontos chaves do metabolismo muitas vezes não esclarecidos, que melhoram o entendimento para uma possível manipulação da fisiologia em questão. Pan *et al.* (2018), através da análise do balanço dinâmico de fluxo para conversão de glicerol em 1,3-propanodiol por *Klebsiella pneumoniae* em condições anaeróbias, obtiveram uma via metabólica mais expandida, que inclui a via metabólica já previamente

descrita e três vias adicionais ou local: uma via de pentoses fosfato (PPP) induzida no ponto de conexão com DHA para fornecer mais equivalentes reduzidos (NADH); uma ramificação de síntese de aminoácidos com interligação em 3-fosfoglicerato (3PG); e o α -cetogluturato no TCA conduzindo a vias anabólicas para o glutamato e outros aminoácidos. Com base, nas relações entre a distribuição do fluxo dinâmico dos pontos chaves na via metabólica e o rendimento de 1,3-propanodiol foram analisados. Primeiro, a mudança do fluxo dinâmico do DHA para o PPP está positivamente correlacionada com o rendimento, pois ela gerou NADH suficiente para garantir a produção de 1,3-PD. Em segundo lugar, a variação no fluxo no ciclo do TCA também está positivamente correlacionada com o rendimento do 1,3-PD, pois neste estudo apresenta o ciclo completo diferente de outros autores que termina após succinato. Este modelo de metabolismo traz a conversão de α -cetogluturato em glutamato, seguida por uma série de reações de transaminação até chegar a succinato, elevando o fluxo metabólico deste intermediário. Como a conversão entre succinato e succinil-CoA é uma reação reversível, antes de 10 horas de fermentação, a direção da reação procedia do succinato para succinil-CoA (o fluxo é negativo). Após este tempo, o fluxo de fumarato para succinato diminuiu para zero e os metabolitos no ciclo de TCA tinham acumulado até um certo grau; assim, o ciclo positivo completo foi promovido. A Figura 5 traz a via metabólica expandida neste estudo.

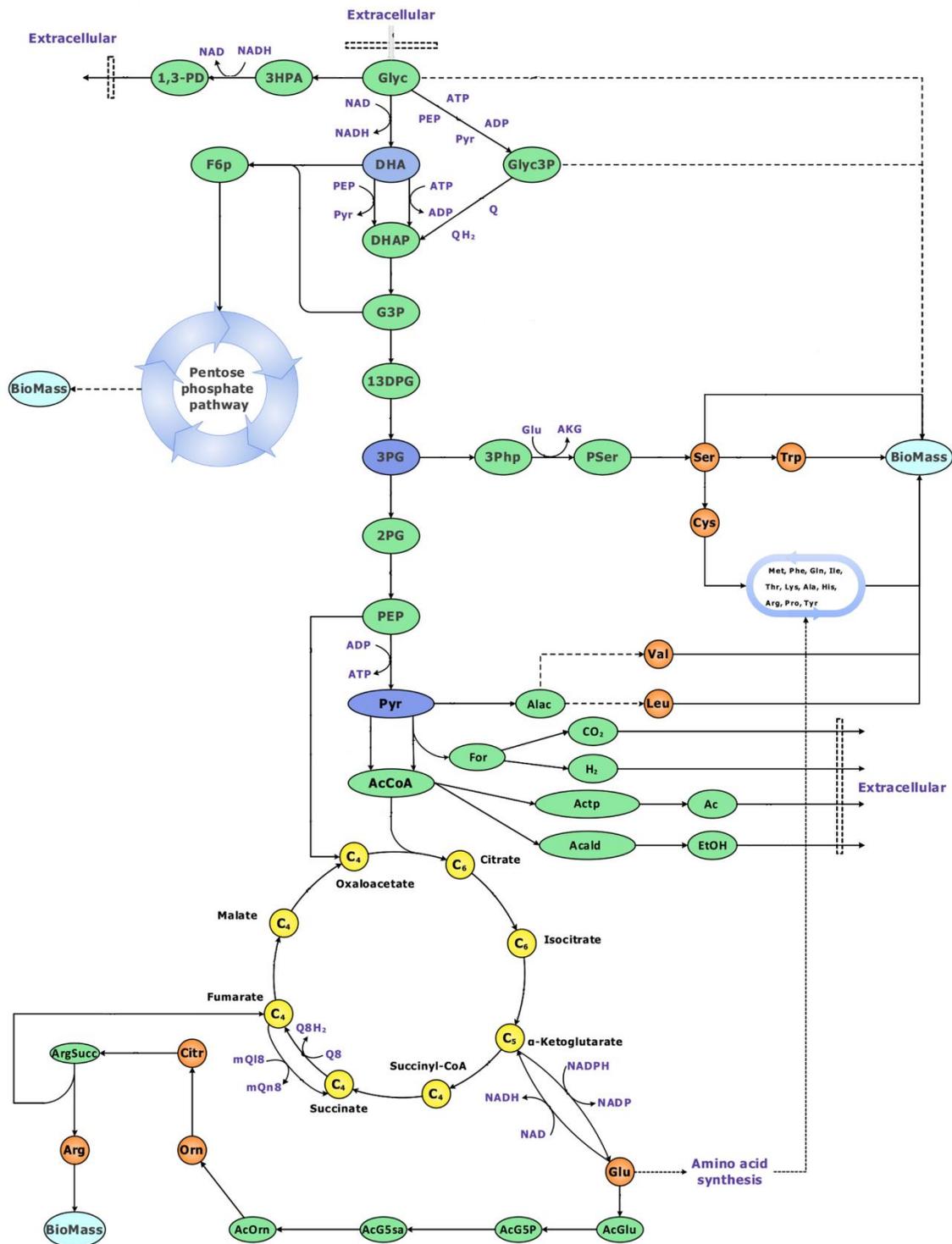


Figura 5: Rota metabólica expandida do glicerol em *K. pneumoniae*.
Fonte: Adaptado de Pan *et al.* (2018).

3.3. Bioprodutos: 1,3-PD e 2,3-BD

Os dióis, 1,3-PD e 2,3-BD são de grande importância industrial por

serem precursores e intermediários químicos de diversos compostos em vários segmentos industriais.

O 1,3-Propanodiol ($C_3H_8O_2$) é também conhecido como trimetileno glicol ou polipropileno glicol e o nome IUPAC é propan -1,3-diol. É um composto alifático linear, líquido, incolor, inodoro, inócuo, miscível em água, álcool e éter. Seu peso molecular é de $76,09 \text{ g.mol}^{-1}$ e possui temperatura de ebulição entre $210\text{-}212 \text{ }^\circ\text{C}$ (Da Silva *et al.*, 2014). É amplamente utilizado como monômero para síntese de poliésteres e poliuretano. Alguns autores destacam a sua utilização para a síntese de politrimetileno tereftalato (PTT) que é um poliéster biodegradável e possui excelentes propriedades para têxteis, carpetes e fibras. Além disso, o 1,3-PD é utilizado para produtos cosméticos, produtos de higiene pessoal, solventes, lubrificantes, conservantes e medicamentos (Park, Rathnasingh, Song, 2017). Por métodos químicos, 1,3-PD pode ser produzido a partir de derivados do petróleo, óxido de propileno, mediante processos químicos convencionais (Rivaldi *et al.*, 2009) pela síntese química partindo da acroleína como matéria prima ou também pela desoxigenação seletiva do álcool secundário do glicerol por catalisadores organometálicos (Da Silva *et al.*, 2014)

O 2,3-Butanodiol ($C_4H_{10}O_2$) possui outras denominações conhecidas como 2,3-butilenoglicol, dimetilenoglicol, dimetiletileno glicol e o nome IUPAC é butano-2,3-diol. Seu peso molecular é $90,121 \text{ g.mol}^{-1}$, podendo existir em 3 formas isoméricas: *D* -(-)-, *L* -(+)- e *meso*. Os pontos de ebulição dos três estereoisômeros são ligeiramente diferentes, variando de 177 a $182 \text{ }^\circ\text{C}$ (Celińska, Grajek, 2009). Este composto possui uma grande variedade de aplicações nas indústrias de produção, especificamente na indústria química, destacando-se a sua utilização como aditivo em combustíveis, pelo seu alto poder energético, sendo convertido em metiletilcetona e 1,3-butadieno, utilizados como solvente industrial e monômero na fabricação de borracha sintética, respectivamente. Grande potencial de aplicabilidade nas indústrias de alimentos, cosméticos e agroindústrias também são descritos (Celińska, Grajek, 2009; Ripoll *et al.*, 2016).

Estes compostos são cada vez mais considerados produtos químicos promissores devido às suas extensas aplicações e suas produções

biotecnológicas tem sido um grande interesse pelos pesquisadores, como uma alternativa a síntese química (Park, Rathnasingh, Song, 2017).

1,3-PD é um típico produto da fermentação do glicerol e não tem sido encontrado em conversões anaeróbias de outros substratos orgânicos. Somente poucos organismos, a maioria deles bactérias, são capazes de formá-lo. Estes organismos incluem enterobactérias do gênero *Klebsiella* (*K. pneumoniae*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*), *Citrobacter* (*C. freundii*), e espécies de *Clostridium butyricum*. Sendo *K. pneumoniae* e *Clostridium butyricum* os mais estudados devido a tolerância ao substrato, alto rendimento e produtividade (Sun *et al.*, 2018).

Em 2007, a produção biotecnológica de 1,3-PD também passou a ser introduzido no mercado devido aos esforços da DuPont Tate & Lyle Bio Products Company, LLC com o desenvolvimento de uma linhagem de *E. coli* recombinante (Sun *et al.*, 2018). Esta bactéria foi clonada com os genes de *S. cerevisiae* para produzir glicerol a partir de glicose e com os genes de *K. pneumoniae* para converter o glicerol a 1,3-PD. Dessa forma, a *E. coli* recombinante passou a produzir glicerol a partir de glicose de milho e 1,3-PD a partir do glicerol intracelularmente acumulado (Da Silva *et al.*, 2014).

O Bio-PDO™ é a denominação dada ao 1,3-PD produzido pela DuPont, sendo este o primeiro a ser produzido em escala comercial a partir de fonte renovável. O Bio-PDO™ está disponível em duas formas: Zemea® e Susterra®. O Zemea® é o 1,3-PD com maior pureza, não causando irritação ou sensibilização da pele, destinado a aplicações em produtos de higiene e cosméticos, podendo substituir o propileno glicol, o butileno glicol ou a glicerina (Dupont Tate & Lyle Bio Products Company, 2018). O Susterra® é o 1,3-PD de grau industrial, utilizado na indústria de poliuretanos e também destinado a aplicações como descongelante e anticongelante, entre outras possíveis aplicações (Dupont Tate & Lyle Bio Products Company, 2018).

Muitas estirpes bacterianas, incluindo *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Lactococcus lactis*, *Paenibacillus polymyxa* e *Bacillus amyloliquifaciens*, produzem 2,3-BD como bioproduto durante a bioconversão de substratos com fontes de carbono. Muitas dessas estirpes também formam outros bioprodutos, tais como ácido láctico, etanol, ácido acético, ácido succínico

e ácido fórmico, o que reduz o rendimento de 2,3-BD e complicam seu processo de recuperação. Entre elas, *K. pneumoniae* mostrou desempenho relativamente alto na produção de 2,3-BD com menor formação de outros bioprodutos (Ji, Huang, Ouyang, 2011; Rathnasingh *et al.*, 2016). Porém a maioria dos estudos para produção de 2,3-BD como principal produto a partir de *K. pneumoniae* são utilizando açúcares e resíduo lignocelulósico como substrato (Yu, Saddler, 1983; Celińska, Grajek, 2009; Ma, CQ *et al.*, 2009). Buscando novos biocatalisadores de 2,3-BD utilizando glicerol como substrato Ripoll *et al.* (2016) identificaram outras duas espécies como produtoras, *Raoultella planticola* e *Raoultella terrigena*.

Os dióis tanto 1,3-PD quanto 2,3-BD, são produzidos ao mesmo tempo por *K. pneumoniae* durante a fermentação com glicerol. As informações expostas até agora sugerem que estudos sejam feitos para a produção simultânea destes dois compostos.

3.4. Imobilização celular

O termo imobilização usado na biotecnologia, segundo IUPAC (2014) é definido como uma técnica usada para a fixação física ou química de células, organelas, enzimas ou outras proteínas (por exemplo, anticorpos monoclonais) sobre um suporte sólido, em uma matriz sólida ou retido por uma membrana, a fim de aumentar a sua estabilidade e tornar possível a sua utilização repetida ou continuada.

A imobilização celular é obtida através do contato de um suporte – material utilizado para a imobilização – com as células vivas, sob condições ambientais controladas (Schmidell *et al.*, 2001).

Entre as principais vantagens dos sistemas com células imobilizadas citadas na literatura destaca-se: a fácil separação do biocatalisador, o que permite a reutilização de partículas em processos repetidos e contínuos; a possibilidade de utilização de altas concentrações celulares no volume reacional, implicando em maiores velocidades de processamento (rendimento e produtividade); possibilidade de utilização de projeto de biorreatores mais adequados à cinética do sistema biológico utilizado; maior proteção ao sistema biológico em relação ao estresse ambiental, ocasionado por elevadas

concentrações de substratos, pH e cisalhamento; bem como melhor estabilidade no processo e armazenamento. Além disso, os biocatalisadores imobilizados possuem menor sensibilidade à contaminação, permitindo então em alguns casos condições não estéreis. Já em sistemas de reatores em operação contínua entre as vantagens se estende a possibilidade de utilização de uma vazão específica de alimentação acima da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) com intuito de obter maiores fatores de conversão de substrato ao produto desejado (Jahnz *et al.*, 2001; Schmidell *et al.*, 2001; Krasnan *et al.*, 2016).

No entanto, como em todos sistemas e processos existem também características inconvenientes e limitações. Para este sistema podemos citar: maiores custos de investimento, inativação celular durante a imobilização, abrasão dos suportes no biorreator, limitações difusionais que podem retardar o processo e causar, por exemplo, inibição do crescimento celular e utilização em reações com substratos ou produtos com alto peso molecular. Moléculas grandes podem ter problemas de penetração através das partículas, o que pode danificar o suporte ou inativar o biocatalisador (Krasnan *et al.*, 2016).

Existe uma grande variedade de métodos de imobilização de biocatalisadores, mas destes basicamente três métodos são utilizados para a imobilização celular, que são: adsorção, ligação covalente e envolvimento. Este último também conhecido como encapsulação, é o mais utilizado para imobilização de células vivas pela sua facilidade, baixa toxicidade e alta capacidade de retenção celular. A técnica consiste no confinamento físico das células em uma matriz polimérica que é formada a partir de um gel hidrofílico que contém os poros menores ao tamanho das células contidas em seu interior, viabilizando a permanência dessas células e a troca de fluídos no compartimento (Jahnz *et al.*, 2001; Nedovic *et al.*, 2001; Schmidell *et al.*, 2001; Obradovic *et al.*, 2004).

Cada técnica pode usar diferentes matrizes para a preparação de suportes. Os materiais dessas matrizes são divididos pela sua origem: natural e sintético (Krasnan *et al.*, 2016). Qualquer material que possa ser transformado em hidrogel por meios físico-químicos é, em princípio, adequado para o encapsulamento de biocatalisadores. A formação do gel pode ser devida à

interação iônica ou ligação química ou também pode ser facilitada pela solidificação térmica (Jahnz *et al.*, 2001).

As matrizes mais utilizadas na técnica de envolvimento são hidrogéis de polissacarídeos naturais como carragenana, pectina e alginato. As partículas de hidrogel permitem o crescimento celular dentro do gel e oferecem um ambiente quase ideal para realizar bioconversões, exceto por uma baixa estabilidade mecânica. Frações elevadas de microrganismos (> 30% [v / v]) ou produção intensa de gás podem levar à ruptura dos grânulos. No caso das pérolas de alginato de cálcio, a presença de quelantes (por exemplo, tampão de fosfato) pode levar à deterioração. Além disso, estes exemplos de matriz de imobilização são altamente biodegradáveis (Guisan, 2006).

No estudo realizado por De Souza (2013), foram testadas células imobilizadas de *K. pneumoniae* BLh-1 em alginato de cálcio para a produção de 1,3-PD utilizando glicerol residual com reatores operando em modo contínuo e batelada. O autor comenta que é essencial o controle de pH para a produção de 1,3-PD por *K. pneumoniae*, porém as esferas de alginato desestabilizaram a sua estrutura com as soluções de controle de pH deste processo, assim como foi observado a destruição das esferas com taxas de diluição acima de $0,5 \text{ h}^{-1}$, o que sugere estudos com novos suportes de imobilização, que sejam mais estáveis e resistentes quanto ao aumento das taxas de diluição, composição do meio e ao controle de pH.

Para superar os problemas desses polímeros naturais e se beneficiar das grandes vantagens, se propõe a utilização de matrizes sintéticas baseadas em álcool polivinílico (PVA). PVA é um polímero sintético que pode ser usado para formar hidrogéis com excelentes propriedades mecânicas. Este tipo de imobilização mostra muitas das vantagens já citadas na imobilização de células vivas e enzimas. A técnica de imobilização ocorre em temperatura ambiente e em ambiente aquoso (Guisan, 2006). Entre os métodos que utilizam PVA, sem a utilização de quaisquer produtos químicos tóxicos e caros, existe a tecnologia patenteada LentiKats®.

3.4.1. *Lentikats*®

Os *LentiKats*® são suportes feitos de PVA. Possuem uma estrutura em forma de lente, com um diâmetro de 3 a 4 mm e uma espessura de apenas 200 a 400 µm (Figura 6).

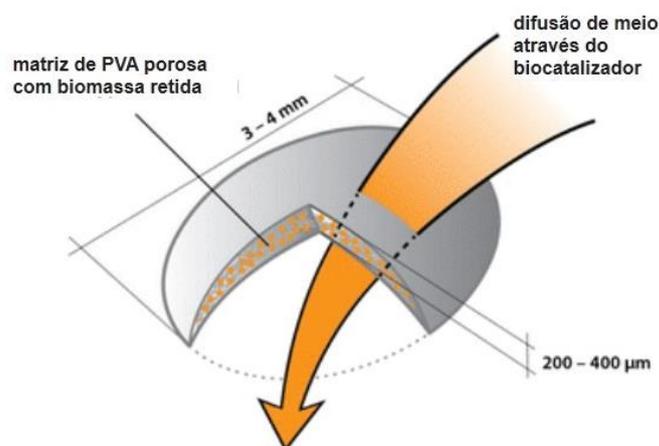


Figura 6: Representação esquemática de uma lente do suporte *Lentikats*®.
Fonte: Traduzida e adaptada de Lentikat's Biotechnologies .

Em outros suportes, a forma mais típica e comumente utilizada é a esférica, que permite uma descrição fácil dos efeitos de difusão por modelos matemáticos que ajudam a entender e otimizar o bioprocesso. No entanto, se as esferas tiverem um diâmetro grande, o centro do biocatalizador sofrerá limitações de difusão. No caso de células vivas, elas serão inibidas e somente as células sob a superfície estarão viáveis. Além disso, partículas grandes são suscetíveis a deterioração causada por agitação e outras cargas mecânicas. Já as muito pequenas podem obstruir a linha de saída em biorreatores e são difíceis de serem retidos (Jahnz *et al.*, 2001). A estrutura em forma de lente proporciona que essas partículas combinem os benefícios de esferas grandes e pequenas. Esta forma e tamanho permitem uma difusão suficiente, devido a sua área superficial máxima e, ao mesmo tempo, ao volume. Sendo assim as limitações de difusão associadas ao transporte do substrato para a lente e os produtos para fora da lente são significativamente reduzidos (Lentikat's Biotechnologies).

Em relação a sua estrutura, os *Lentikats*® possuem alta porosidade interna, alta capacidade de imobilização e excelente estabilidade física e mecânica (elasticidade, baixa abrasão) (Lentikat's Biotechnologies). Entre suas

características, o *LentiKats*® devidamente preparado tolera uma temperatura máxima de 50 °C (Rebroš *et al.*, 2006) e ampla faixa de pH, observado em diversos trabalhos (Durieux, Nicolay, Simon, 2000; Rebroš *et al.*, 2006). A matriz de PVA não é tóxica para microrganismos, enzimas ou o meio ambiente, não é biodegradável (Lentikat's Biotechnologies), e é aceito e reconhecido como seguro (*Generally Recognized As Safe* - GRAS), o que o torna adequado para as indústrias alimentícia e farmacêutica. As condições de aprisionamento são muito suaves, o que permite uma sobrevivência muito alta das células na matriz do biocatalisador (Krasnan *et al.*, 2016) e também uma fácil separação do meio líquido, em fermentações contínuas ou de reuso, por peneiração (Lentikat's Biotechnologies; Jahnz *et al.*, 2001).

Schenkmyerová *et al.* (2014), em seu trabalho realizaram caracterização de *LentiKats*®, em relação à distribuição de tamanho das partículas, sua morfologia interna, resistência mecânica, propriedades de exclusão de tamanho, determinação do coeficiente de difusão efetiva da sacarase. As *LentiKats*® foram caracterizadas com um diâmetro de 3,65 mm; com um Desvio Padrão Relativo (DPR) = 10,3 % e altura de 0,341 mm; DPR = 32,3 % e mostraram uma estrutura porosa ao longo de todo o seu volume, no nível mesoscópico (micrométrico), se assemelhando a uma estrutura de esponja, com o diâmetro dos poros de aproximadamente 1,89 nm, o que caracteriza o limite de exclusão deste material. A estrutura da membrana superficial das *LentiKats*® também se mostrou ser opticamente insolúvel para PEGs maiores de 8000 Da (provavelmente devido a poros muito pequenos). A força média necessária para deformação em 70 % foi de 217,1 g por *LentiKats*®, DPR = 39 %. Esses resultados foram utilizados para modelagem matemática, que forneceu as estimativas do coeficiente de difusão efetiva da sacarose em que se obteve o valor de $0,36 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

O benefício da imobilização em PVA é demonstrado por alguns exemplos de imobilização bem-sucedida de células inteiras e enzimas em *LentiKats*®, como por exemplo, na bioconversão de glicerol bruto para 1,3-PD, produção de bioetanol a partir de melaço não-esterilizado, redução do consumo de energia para tratamento de esgoto (Guisan, 2006). Outros exemplos de imobilização celular são trazidos na Tabela 2.

Tabela 2: Imobilização celular com *LentiKats*® em diferentes microrganismos, fonte de carbono e produtos formados com a cinética.

Microrganismo	Substrato (g.L⁻¹)	Produto, (g.L⁻¹)	Regime/ Reator	Produtividade^a/ Conversão^b	Referência
<i>Clostridium pasteurianum</i> 10%(p/v)	Glicerol puro (50)	Butanol (8,38) / 1,3-PD (3,22)	Batelada Repetida STR	3,12 ^a ; 0,21 ^b / 1,19 ^a ; 0,08 ^b	(Krasnan <i>et al.</i> , 2018) ⁱ
<i>Clostridium pasteurianum</i> 10%(p/v)	Glicerol residual (50)	Butanol (8,41) / 1,3-PD (3,67)	Batelada Repetida STR	2,42 ^a ; 0,21 ^b / 1,05 ^a ; 0,09 ^b	(Krasnan <i>et al.</i> , 2018) ⁱ
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> 10%(p/v) / 20% (p/v)	Glicose (20)	Ácido Butírico	Batelada Repetida/ STR	1,16 ^a ; 0,44 ^b / 1,74 ^a ;0,44 ^b	(Rebroš <i>et al.</i> , 2016)
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> 20% (p/v)	Glicose (20)	Ácido Butírico	Contínuo/ CSTR D=0,24 h ⁻¹	1,61 ^a ; 0,48 ^b	(Rebroš <i>et al.</i> , 2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	OSRH ^c - Glicose	EtOH	Contínuo/ Reator de coluna Leito fixo D=0,5 h ⁻¹	12,88 ^a ; 0,43 ^b	(Mathew <i>et al.</i> , 2014)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 1731 - 20% (p/v)	Glicose (20)	Butanol (1,86)	Batelada Repetida STR	0,57 ^a ; 0,13 ^b	(Dolejš <i>et al.</i> , 2014)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 1731	Glicose (20)	Butanol, (1,70)	Contínuo/ CSTR D=0,18	0,31 ^a ; 0,12 ^b	(Dolejš <i>et al.</i> , 2014)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 1731	Glicose (60)	Butanol, (7,8)	Contínuo/ CSTR D=0,05	0,42 ^a ; 0,17 ^b	(Dolejš <i>et al.</i> , 2014)

<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 1731 - 20% (p/v)	Glicose (20 + 30) ^d	Butanol, (9,12)	Batelada Alimentada STR	1,91 ^a ; 0,15 ^b	(Dolejš <i>et al.</i> , 2014)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 10%(p/v)	OSRH ^c – Glicose	EtOH ^e (164,33)	Batelada / Frasco	0,33 ^a ; 0,46 ^b	(Mathew <i>et al.</i> , 2013)
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	SBH ^f -xilose	Xilitol (35,1)	Batelada Repetida / Frasco	0,49 ^a ; 0,58 ^b	(Da Cunha <i>et al.</i> , 2006)
<i>Bacillus coagulans</i> CCM 4318 - 20%(p/v)	Glicose (60)	Ácido Lático	Batelada Repetida STR	7,4 ^a	(Rosenberg <i>et al.</i> , 2005)
<i>Oenococcus Oeni</i>	Suco de maçã ^g	Ácido Lático (\cong 6,5)	Contínuo/ Reator de coluna Leito Fixo τ = 0,3	21,67 ^a ; 2,16 ^b	(Durieux, Nicolay, Simon, 2000) ^h

^a Produtividade em g.L⁻¹.h⁻¹

^b Conversão em g.g⁻¹

^c Hidrolisado de palha de canola – Glicose 60 g.L⁻¹

^d A concentração inicial é de 20 g.L⁻¹, após a alimentação, 50 mL de meio na concentração 500 g.L⁻¹ fica 30 g.L⁻¹

^e unidade em g.Kg⁻¹

^f Hidrolisado de bagaço de cana – Xilose 79,2 g.L⁻¹

^g Ácido Málico 6,7 g.L⁻¹; Fermentação Malolática

^h Autor não mostrou os dados por escrito. Os valores são aproximados e foram retirados do gráfico de cinética.

ⁱ O autor em sua metodologia descreve que a imobilização foi realizada em PVA porém não especifica se é o PVA *LentiKats*®.

3.5. Biorreatores de células imobilizadas: Tipos e modo de operação

Para a escolha do biorreator a ser usado em sistemas com células imobilizadas, vários fatores devem ser levados em conta. Entre eles estão o tipo de matriz de suporte e método de imobilização, requisitos de atividade enzimática / viabilidade celular, natureza do substrato, cinética de reações envolvidas, requisitos operacionais do processo, facilidade de substituição e regeneração do catalisador, considerações hidráulicas, facilidade no projeto, fabricação e aumento de escala e custo do reator (Kosseva *et al.*, 2009).

Atualmente, para células imobilizadas, o modo de operação mais citado e usado é o contínuo (Gabardo *et al.*, 2014; Mathew *et al.*, 2014; Gabardo *et al.*, 2015; Gabardo *et al.*, 2016; Rebroš *et al.*, 2016), porém muito já foi estudado em sistema em batelada, principalmente em estudos de reuso dos biocatalisadores (Rosenberg *et al.*, 2005; Da Cunha *et al.*, 2006; De Souza, Rossi, Ayub, 2014; Dolejš *et al.*, 2014). Entre os reatores mais utilizados estão os reatores de leito fixo (RLE), reatores de leito fluidizado (RLF) e reatores de tanque agitado (STR, Figura 7). Porém, autores como Verbelen *et al.* (2006), Kosseva *et al.* (2009), Obradovic *et al.* (2004), trazem outros reatores com configurações diferentes, que também podem ser usados para esta finalidade, como o reator *airlift* e o reator de membrana.

3.5.1. Operação contínua

Na operação de reatores em modo contínuo existe em tempo integral um fluxo de alimentação de substrato e um fluxo de saída de produto. O volume de líquido se mantém constante dentro do reator, ajustando os fluxos de entrada e saída no mesmo valor. O controle do volume dentro do reator é de extrema importância, afim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, condição na qual as variáveis, concentração de biomassa, substrato limitante e produto permanecem constantes ao longo do tempo de operação (Doran, 1998; Schmidell *et al.*, 2001).

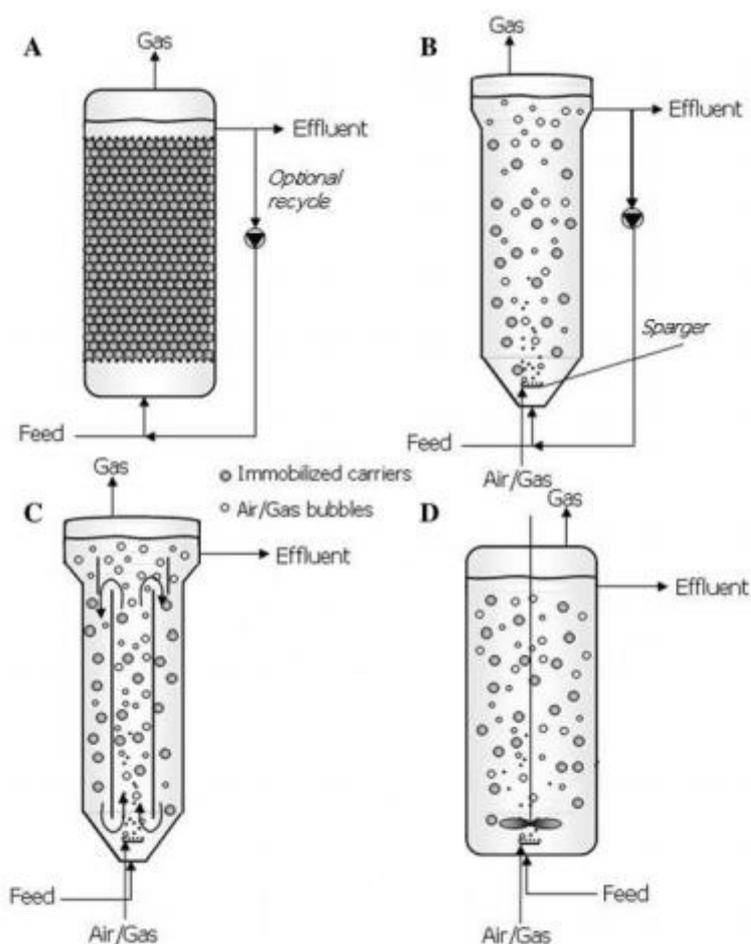


Figura 7: Tipos de reatores contínuos para células imobilizadas.
 A) Reator de leito fixo; B) Reator de leito fluidizado; C) Reator airlift; D) Reator de tanque agitado.

Fonte: Adaptado de Verbelen *et al.* (2006).

Os parâmetros de operação característicos são a taxa de diluição (D) e o tempo de residência (τ). Este último é o tempo que uma substância leva para percorrer o sistema e se dá pela razão entre o volume de retenção do sistema (V), ou seja, o volume de operação do reator, e a taxa de fluxo da substância pelo sistema (F), em outras palavras, a vazão de alimentação do sistema, conforme Equação 1 (Doran,1998). A taxa de diluição é definida como sendo a relação entre a vazão volumétrica e o volume de meio do reator e está representada pela Equação 2 (Schmidell *et al.*, 2001). Sendo assim é um parâmetro utilizado para representar os fluxos de entrada e saída que leva em consideração não apenas a vazão, como também, o volume reacional.

$$\tau = \frac{V}{F} \quad (1)$$

$$D = \frac{F}{V} = \frac{1}{\tau} \quad (2)$$

A partir do balanço de massa para biomassa e assumindo estado estacionário, obtém-se a relação em que D é igual a velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ) (Doran, 1998; Schmidell *et al.*, 2001). Desta maneira o estado estacionário se alcança quando a velocidade de crescimento específico do microrganismo corresponde a taxa de diluição em operação.

Quando se tem uma elevada taxa de diluição que se iguala a velocidade máxima de crescimento do microrganismo (μ_{\max}), temos o que chamamos de taxa de diluição crítica (D_{crit}). No caso de se ter células livres no reator, nesta condição a biomassa tende a zero, pois a extração celular no fluxo de saída de produtos é superior a velocidade de crescimento, situação na qual ocorre um arraste das células do biorreator também conhecida como *wash-out* (Doran, 1998; Schmidell *et al.*, 2001)

Dentro dessa ampla faixa de operação mostrada na Figura 8, de um sistema genérico, observamos que a produtividade aumenta conforme aumenta a D . A maior produtividade de biomassa (Q_x), se tem quando D está muito próximo de μ_{\max} . Quando o produto de interesse for associado ao crescimento celular, neste ponto é onde também teremos a melhor produtividade volumétrica de produtos (Q_p). Porém esta região de operação é muito complexa de ser operada e necessita de um controle rigoroso devido a sua alta sensibilidade e qualquer alteração cria uma instabilidade no sistema e leva ao D_{crit} . Por segurança, sugere-se operar o sistema abaixo desta zona, onde também se obtém uma produtividade alta (Doran, 1998; Schmidell *et al.*, 2001).

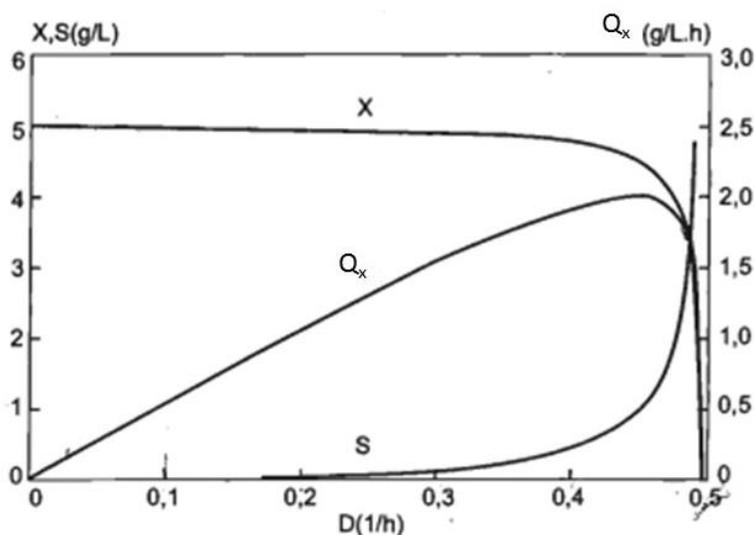


Figura 8: Faixa de operação de um sistema contínuo genérico.
Fonte: Adaptado de Schmidell *et al.* (2001).

3.5.2. Reatores de leito fixo e fluidizado

O reator de leito fixo (RLE) é o tipo de reator mais frequentemente utilizado em sistemas de imobilização (Kosseva *et al.*, 2009). O reator consiste em um tubo, geralmente vertical. Neste tipo de reator a coluna é preenchida com o suporte e o meio de cultivo pode ser alimentado pela parte superior ou inferior da coluna e forma uma fase líquida contínua entre as partículas (Doran, 1998). Conforme Kosseva *et al.* (2009) a alimentação no reator preferencialmente passa de forma ascendente e a coluna é facilmente empacotada quando o biocatalisador é na forma de esferas, chips, discos, folhas, grânulos ou pellets. Em casos que a velocidade do fluido for perfeitamente plana sobre a seção transversal, diz-se que o reator funciona como um *Plug Flow Reactor* (PFR).

Nos leitos fixos os danos causados pela abrasão das partículas são mínimos em comparação com os STR e a transferência de massa entre o meio líquido e os catalisadores sólidos é facilitada trabalhando a taxas de fluxo elevado. Para evitar que o catalisador seja arrastado para fora da coluna coloca-se barreiras na saída do líquido. Existem configurações com ou sem recirculação de meio, o qual deve estar limpo e livre de detritos para evitar o tamponamento do leito. Quando se deseja aerar o sistema geralmente se realiza a aeração em um recipiente separado, pois se injetar o ar diretamente no leito a coalescência das bolhas produzirá bolsões de gás formando caminhos preferenciais e/ou uma distribuição pobre do fluxo. Por isso este tipo de leito não é recomendado para processos em que a evolução de CO₂ ou outros

gases seja intensa, podendo estes ficarem presos no recheio da coluna. Quando em operação contínua de longa duração, devido ao aumento de biomassa dentro do leito, pode ocorrer o bloqueio físico do sistema, que também gera caminhos preferenciais e ou entupimento e conseqüentemente queda na conversão, podendo essa situação ser resolvida com o aumento da taxa de fluxo do líquido (Lilly, 1992; Doran, 1998; Schmidell *et al.*, 2001; Obradovic *et al.*, 2004).

Os reatores de leito fluidizado (RLF) se caracterizam pela movimentação das partículas do catalisador ao longo da coluna que se expande devido ao escoamento ascendente, pelo fluxo contínuo do substrato. Para isso as partículas devem ter tamanho e densidade conhecidos (Doran, 1998; Schmidell *et al.*, 2001). Esta contínua movimentação das partículas é chamada de fluidização e pode ser obtida pela recirculação do meio (substrato), ou pela injeção de ar ou gás inerte. Um exemplo da utilização de ar é quando a oxigenação é necessária para células imobilizadas (Schmidell *et al.*, 2001). Neste caso, o ar pode ser introduzido diretamente na coluna, pois a fluidização faz com que não haja formação de caminhos ou compactação (Doran, 1998).

Movimentos de partículas e colisões na fluidização resultam em tensões de cisalhamento e abrasão, criando a necessidade de suportes mecanicamente estáveis neste tipo de reatores (Obradovic *et al.*, 2004). Além de pensar no tipo de matriz de imobilização, é importante considerar a densidade das células imobilizadas ao projetar um sistema de leito fluidizado, as partículas de baixa densidade requerem taxas de fluxo de líquido muito baixas para fluidização, o que pode ser difícil de manter e acarretar um *wash-out*. Por outro lado, as células imobilizadas com altas densidades podem elevar os custos de bombeamento (Nedovic *et al.*, 2001; Verbelen *et al.*, 2006).

Biorreatores de leito fluidizado fornecem soluções para alguns dos problemas inerentes ao uso de reatores de leito fixo. Sendo assim a Tabela 3, traz as principais diferenças entre os dois reatores.

Dentro deste contexto até o momento apenas um trabalho foi realizado usando reatores tubulares de leito fixo e fluidizado em regime contínuo para produção de 1,3PD e 2,3-BD com células imobilizadas (De Souza, 2013). Neste estudo, foram imobilizadas em alginato de cálcio células de *K. pneumoniae* BLh-1 e os reatores operados a uma D de 0,05 h⁻¹. O autor afirma que um melhor resultado foi observado com o RLF, se comparado os regimes estacionários, com a produção de 1,3-PD em torno de 22 g.L⁻¹, e 2,3 BD em 8 g.L⁻¹. Neste sistema, a alimentação foi iniciada com

10 h de cultivo, menos da metade do tempo obtido com o reator de leito fixo, e atingindo o regime estacionário com 56 h de cultivo. O RLE atingiu seu regime estacionário com mais de 70 h de cultivo. Essa melhor performance no RLF foi descrita devido ao sistema interno ser mais homogêneo pela mistura que ocorre devido à fluidização, que neste caso se dava pela recirculação do meio, o que gerou uma eficiente transferência de massa no RLF em relação ao RLE.

Tabela 3: Características gerais de operação entre os biorreatores de leito fixo e fluidizado com células imobilizadas

	RLE	RLF
Controle de Temperatura	Difícil/Complexo	Possível
Controle de pH	Difícil	Possível
Produção de gases	Impróprio	Aceitável
Dano mecânico do catalisador	Improvável	Possível
Concentração máxima de biomassa	Alta	Alta
Transferência de oxigênio	Reduzida	Alta
Transferência de massa	Alta	Alta
Taxa de reação	Alta	Alta

Outros trabalhos sem ser nessa configuração foram realizados para produção de 1,3-PD e os outros metabólitos, como por exemplo, reator contínuo de tanque agitado (CSTR) com células imobilizadas (Krasnan *et al.*, 2018) e células livres (Biebl, 2001; Gonzalez-Pajuelo, Andrade, Vasconcelos, 2004; González-Pajuelo, Andrade, Vasconcelos, 2005; Loureiro-Pinto *et al.*, 2017; Varrone *et al.*, 2017); sistema em batelada com célula imobilizada em frascos (De Souza, Rossi, Ayub, 2014) e células livres em STR (Rossi *et al.*, 2012; Rossi, De Souza, Ayub, 2013); batelada alimentada com células livre em STR (Rossi, De Souza, Ayub, 2013; Rossi *et al.*, 2013; Morcelli *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018) e batelada alimentada em reator de coluna de leito fixo (Zhao, Chen, Yao, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos realizados neste trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia (BiotecLab), localizado no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), no Campus do Vale, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

4.1 Substrato e sua caracterização

O substrato utilizado foi glicerol residual da síntese de biodiesel, fornecido por uma empresa produtora de biodiesel de Passo Fundo, Brasil. O mesmo já havia sido coletado e cedido para trabalhos anteriores e já se encontrava no laboratório. O substrato contém (em massa): 81,8 % glicerol, 5,82 % cinzas, 6 % NaCl, 11,7 % umidade, 0,6 % monoacilgliceróis.

4.2 Microrganismo e sua manutenção

O microrganismo utilizado foi *Klebsiella pneumoniae* BLh-1, isolado e caracterizado por Rossi *et al.*, (2011) e encontra-se na Coleção de Culturas Microbiológicas do BiotecLab (UFRGS, Brasil) liofilizado e estocado em glicerol 50 % a -80 °C. Este microrganismo foi recuperado e mantido em placa com meio Luria-Bertani (LB) a 4 °C e um novo repique feito a cada 4 semanas para manutenção da linhagem. Novos estoques do microrganismo também foram realizados, iguais aos já citados, além do glicerol 50 % armazenado a -20 °C para a utilização nos experimentos.

4.3 Imobilização do Microrganismo

As células de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 foram imobilizadas pela técnica de envolvimento em matrizes porosas, onde a tecnologia patenteada de imobilização celular em hidrogel de álcool polivinílico (PVA), *Lentikats®* (*GeniaLAB, Braunschweig* - Alemanha), foi empregada, conforme feito por Gabardo (2015), com adaptações.

Primeiramente realizou-se um pré-inóculo, transferindo uma colônia isolada, pura e com 24 horas de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 para um Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL meio de crescimento composto por: 4 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,52 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0,25 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 0,2 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1,5 g.L⁻¹ extrato de levedura; 1 g.L⁻¹ peptona bacteriológica; 30 g.L⁻¹ de glicerol residual; e 1

mL de solução traço contendo: $0,1 \text{ g.L}^{-1} \text{ MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $0,06 \text{ g.L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$; $0,0037 \text{ g.L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $0,2 \text{ g.L}^{-1} \text{ CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $0,025 \text{ g.L}^{-1} \text{ NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $0,035 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,14 \text{ g.L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e $0,9 \text{ mL HCl } 37 \%$. Este frasco foi incubado em uma incubadora *shaker* (Nova Técnica) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm , até atingir a medida de densidade ótica (DO) no comprimento de onda de 600 nm igual a $1,00$, aproximadamente 6 h nestas condições.

Posteriormente, foram realizados dois inóculos transferindo 44 mL do pré-inóculo para cada Erlenmeyer de 2 L contendo 396 mL de meio de crescimento. A incubação se deu nas mesmas condições do pré-inóculo até atingir o final da fase exponencial de crescimento (células viáveis e com grande quantidade de biomassa), aproximadamente 12 h para este microrganismo. Em seguida realizou-se a medida de DO no comprimento de onda de 600 nm e retirou-se uma alíquota de 10 mL para quantificação de biomassa por peso seco, pela análise de gravimetria em analisador de umidade (balança de infravermelho), e determinação da concentração de células por litro de meio no inóculo (C_M).

A concentração celular desejada para imobilização nos experimentos foi de 10 g de células (peso seco) por 1 L de solução. Para isso, inicialmente, deve-se descobrir a quantidade de células necessárias para chegar a esta concentração (Equação 3).

$$m = V_s \times C \quad (3)$$

Onde:

m = massa de células necessárias para obter a concentração desejada, em gramas;

V_s = Volume de solução (50 mL do gel *Lentikats*® mais os $12,5 \text{ mL}$ da suspensão celular), em Litros

C = Concentração desejada de células imobilizadas por volume de solução em gramas por Litro.

Obtendo:

$$m = 0,0625 (L) \times 10 (g.L^{-1}) = 0,625 g \quad (4)$$

Com a determinação da concentração de células por litro de meio no inóculo (C_M), pela quantificação de biomassa por peso seco, foi feito o cálculo conforme Equação 5, que determinou a quantidade de meio necessária a ser recolhido do inóculo. Este volume foi centrifugado em uma centrífuga (*Hitachi* CR21GIII com o rotor R12A3) a $6000 \times g$ por 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Após centrifugação descartou-se o sobrenadante e as células precipitadas foram lavadas 3 vezes com solução salina 0,85 % estéril, e novamente centrifugadas nas mesmas condições, após cada lavagem, por fim ressuspensas em 12,5 mL de solução salina 0,85 % estéril.

$$V_M(L) = \frac{m(g)}{C_M(g/L)} \quad (5)$$

Onde:

V_M = Volume de meio a ser retirado do inóculo, em Litros;

C_M = Concentração de células (peso seco) por Litro de meio no inóculo

m = massa de células necessárias para obter a concentração desejada, em gramas;

Os 50 mL do gel *Lentikats*® (*GeniaLAB, Braunschweig* - Alemanha), foram aquecidos a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho-termostato até ficar totalmente líquido e aguardou-se esfriar até atingir $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida os 12,5 mL de suspensão celular previamente preparada foram adicionados.

Com a solução pronta (PVA mais células), esta mistura foi gotejada em placas de Petri de poliestireno estéril com o auxílio de uma seringa estéril (agulha 0,70 x 25 22 G 1), de forma a se obter gotículas no formato de “lentes”, com 3-4 mm de diâmetro (Figura 9 A), conforme recomendado pelo fabricante. As placas estiveram em câmara de fluxo laminar em todo este processo e também para gelificação, quando a evaporação reduziu 72 % da massa inicial (Figura 9 B).



Figura 9: Etapas do processo de imobilização.
A) Gotejamento em placa de Petri. B) Gelificação.

Em seguida, as lentes foram estabilizadas e reentumecidas em solução estabilizadora (*GeniaLAB, Braunschweig* - Alemanha) sob constante agitação por no mínimo 2 h (Figura 10-A). Após a estabilização as mesmas foram lavadas 3 vezes com solução salina 0,85 % estéril (Figura 10-B e C). As lentes com *K. pneumoniae* BLh-1 imobilizada foram armazenadas em meio LB a 4 °C, sendo feito a cada 30 dias, a troca do meio (Figura 10-D).

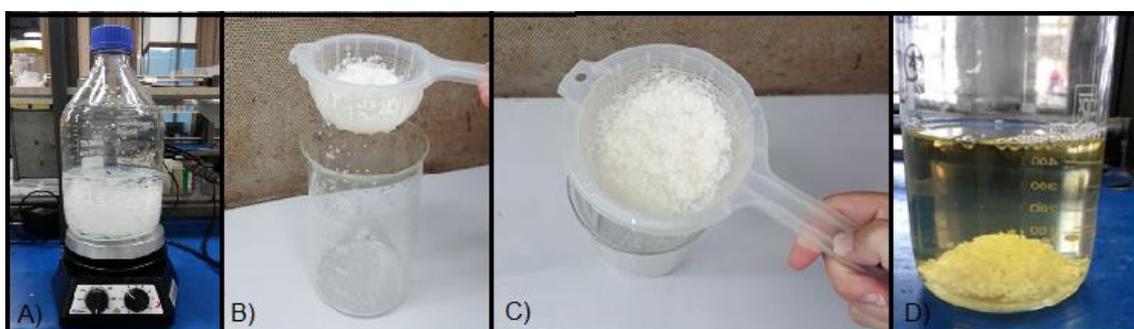


Figura 10: Etapas finais de imobilização.
A) Estabilização das lentes; B) Lavagem das lentes em solução salina; C) Lentes após lavagem; D) Armazenamento em meio LB

4.4 Fermentação em biorreatores

4.4.1. Biorreatores: *Design*, montagem e especificações

Foram utilizados biorreatores de coluna de vidro de 150 mL de volume total, projetados pelo grupo de pesquisa do BiotecLab, para a condução dos experimentos. As dimensões dos biorreatores estão descritas no projeto em anexo. O leito do biorreator onde ocorreu a fluidização e empacotamento possui 24 mm de diâmetro e 180 mm de altura, o qual é envolto por uma camisa que é alimentada com água para o controle da temperatura.

As mangueiras de alimentação e saída eram de silicone e foram calibradas para cada vazão. Para se obter as vazões necessárias para o processo foi necessário usar mangueiras muito finas. Para conectá-las à entrada e saída dos biorreatores necessitou-se a utilização de adaptadores. Abaixo segue as representações esquemáticas das mangueiras já adaptadas e suas dimensões e diâmetro interno (D_i) e diâmetro externo (D_e). Na Figura 11 a de alimentação com um comprimento total de 2 metros, e a de saída com um comprimento total de 2,2 metros. Na de saída ainda, colocou-se um divisor de fluxo para a retirada de amostra (ponto) (Figura 12).

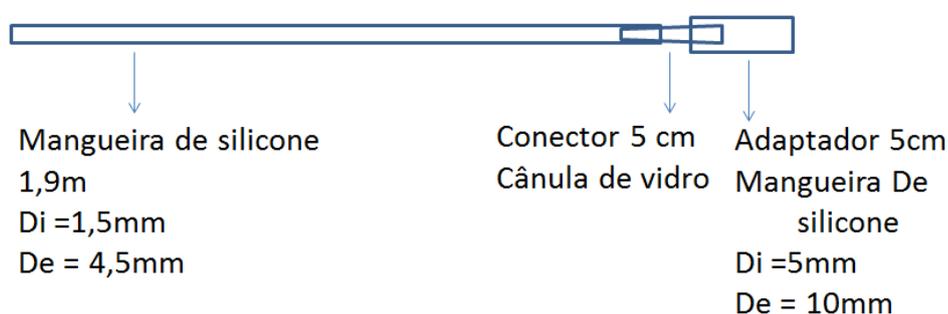


Figura 11: Representação esquemática mangueira de alimentação com adaptador

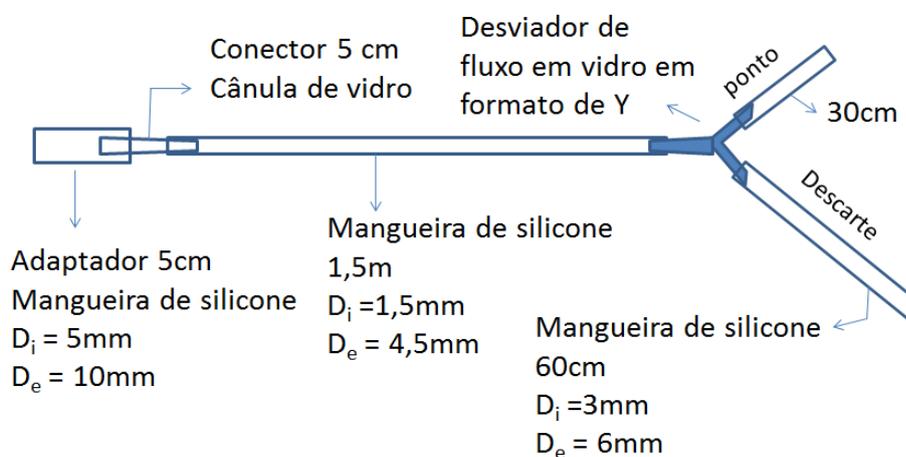


Figura 12: Representação esquemática da mangueira de saída.

Esferas de vidro de 4 mm foram adicionadas abaixo do leito e uma tela de inox nas dimensões de 4x4 cm acima do leito para impedir que as lentes saíssem do mesmo. Na boca da parte superior do biorreator para a vedação da mesma foi colocada uma rolha de teflon. Nesta se encontrava 1 furo central para acoplar o eletrodo de pH e outros 4 periféricos para conectar cânulas com mangueiras para a saída de CO_2 e gases e entrada de ácido e base para ajuste de pH (Figura 13).

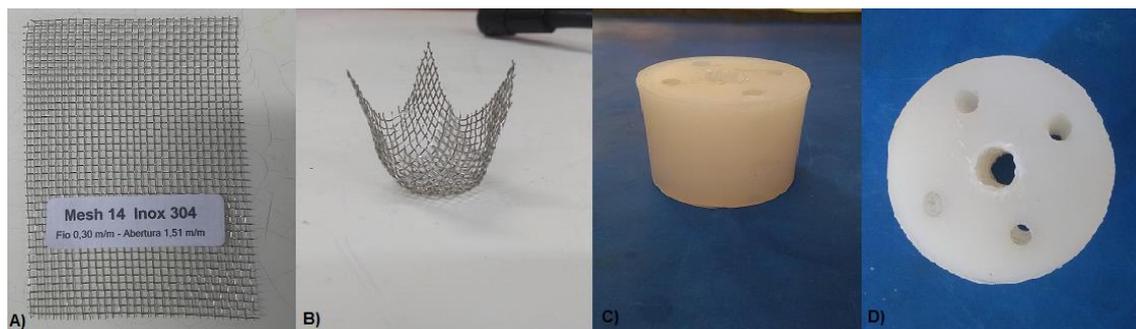


Figura 13: Fotos dos materiais que compõem a montagem do Biorreator. A) Tela de inox com suas especificações. Inox 304, fio 0,3 mm; abertura 1,51 mm; Mesh14 (Telas Ernesto Muleer). B) Tela cortada na dimensão 4x4 cm moldada conforme o diâmetro interno do leito do reator. C) Rolha de Teflon vista frontal. D) Rolha teflon vista superior mostrando as aberturas.

4.4.2. Controle do Bioprocesso

O pH foi medido por um eletrodo acoplado ao reator, previamente calibrado, e as vazões de entrada e saída foram controlados pela unidade de controle do biorreator *Biostat-B* (*B. Braun Biotech International* - Alemanha).

O processo foi conduzido a 37 °C. A temperatura foi controlada e fornecida por um Banho Termostato Thermomix® BM (*B. Braun Biotech International*) com recirculação, que alimentava água responsável pela troca de calor na camisa dos reatores.

4.4.3. Reator de Leito Fixo em operação contínua

Para cada fermentação foram usadas aproximadamente, 80 mL de lentes de PVA com células imobilizadas que foram adicionadas ao meio de fermentação dentro do reator. A Figura 14 mostra o fluxograma do processo e a Figura 15 uma foto do biorreator e todo o sistema montado pronto para operação. O meio de fermentação foi composto por: 7 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 7 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 5 g.L⁻¹ extrato de levedura; 5 g.L⁻¹ peptona bacteriológica; 65 g.L⁻¹ de glicerol residual; e 1 mL de solução traço.

Testou-se diferentes vazões de alimentação e saída ao reator, que correspondem às taxas de diluição (D) de 0,14 h⁻¹, 0,3 h⁻¹, 0,45 h⁻¹. O cálculo necessário para obtenção dos valores de D segue na equação 2, no item 3.5.1., onde V é o volume de operação do reator e F é a vazão de alimentação. O resultado é expresso em h⁻¹.

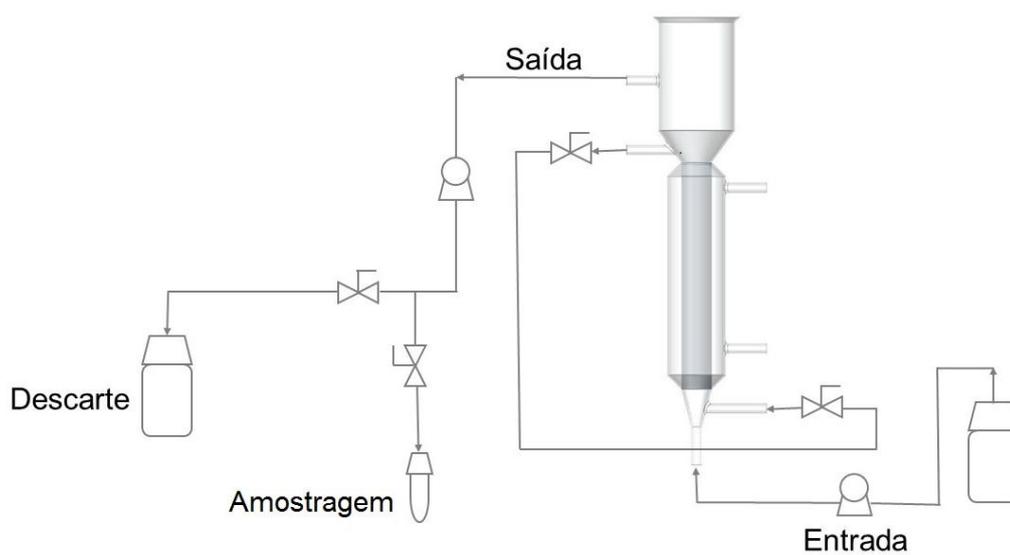


Figura 14: Representação esquemática do sistema operacional do reator de leito fixo



Figura 15: Biorreator de leito fixo montado com unidade de controle e frascos de coleta e alimentação.

4.4.4. Reator de Leito Fluidizado em operação contínua

Para cada fermentação foram usadas aproximadamente 40 mL de lentes com células imobilizadas, que foram adicionadas ao meio de fermentação dentro do reator. Para a fluidização, através de uma bomba peristáltica (Marte MPV-6000 MC-32), adicionou-se uma vazão de reciclo de aproximadamente 200 mL.min⁻¹. A mangueira utilizada na recirculação era de silicone com 1,5 m de comprimento e 8 mm de D_e e 4 mm de D_i.

Testou-se diferentes vazões de alimentação e saída do reator, que correspondem às taxas de diluição (D) de 0,1 h⁻¹, 0,22 h⁻¹, 0,33 h⁻¹. A Figura 16 mostra o fluxograma do processo e a Figura 17 uma foto do biorreator e todo o sistema montado pronto para operação.

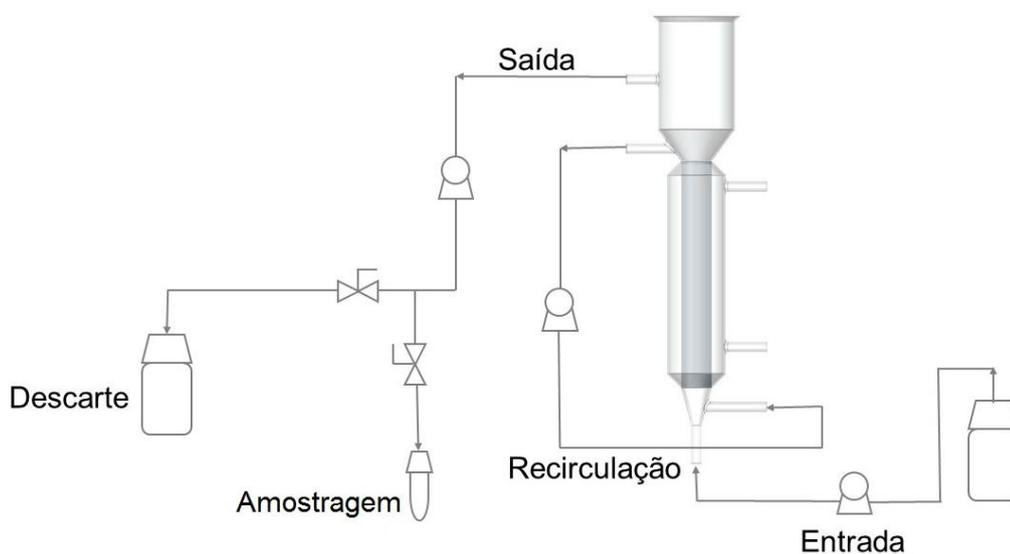


Figura 16: Representação esquemática do sistema operacional do reator de leito fluidizado



Figura 17: Biorreator de leito fluidizado montado com unidade de controle, bomba de recirculação e frascos de coleta e alimentação.

4.4.5. Métodos analíticos

A amostragem coletada para as análises dos biorreatores foi de 6 mL. Destes, 5 mL foram usados para a quantificação de biomassa por gravimetria. Para isso este volume foi centrifugado a 3500 g, durante 15 min, a 4 °C em tubos Falcons previamente secos e pesados. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram para estufa a 90 °C até peso constante. Antes de cada pesagem os tubos ficavam por no mínimo 10 min em um dessecador com sílica.

As concentrações de glicerol, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, etanol, ácido láctico, ácido acético e ácido succínico foram monitoradas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (*Shimadzu Corp.*, Japão) equipado com um detector de índice refrativo RID-10^a e uma coluna *Aminex HPX-87H* (300 x 7,8 mm, *Bio-Rad*, EUA). As análises foram realizadas utilizando fase móvel de ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹, com uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹, a 65 °C com volume injeção de amostra de 20 µL. As amostras (1 mL) coletadas nos biorreatores para essas análises foram primeiramente centrifugadas a 3.500 g, durante 15 minutos, a 4 °C, após, o sobrenadante foi coletado e filtrado em membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm (*Sartorius*, Alemanha).

4.4.6. Cálculos dos parâmetros cinéticos

Para apresentar os valores de concentração de produtos (P) e substrato (S) em cada taxa de diluição (D) foi realizada a média dos resultados dos pontos dentro da mesma D, conforme segue abaixo na Equação 6 e Equação 7, obtendo os resultados em g.L⁻¹.

$$P = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^n P_i \quad (6)$$

$$S = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^n S_i \quad (7)$$

Para os cálculos de conversão ($Y_{P/S}$) e produtividade (Q_P), Equações 8 e 9 respectivamente, os valores utilizados para P e S foram os valores das médias encontradas pelas equações acima. Os valores de $Y_{P/S}$ foram expressos em g.g⁻¹ e de produtividade em g.L⁻¹.h⁻¹

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{-dS} = \frac{P-P_0}{S_0-S} \quad (8)$$

$$Q_P = P \cdot D \quad (9)$$

4.5 Análise de Microscopia Eletrônica por Varredura

As estruturas do suporte de imobilização e a distribuição e colonização da biomassa nessas estruturas foram investigadas pela técnica de Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV). Esta análise foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS.

A avaliação se deu após a imobilização do microrganismo (tempo zero), ao final da primeira fermentação de cada reator (fixo e fluidizado) e após seu reuso. As lentes coletadas foram congeladas em ultrafreezer por no mínimo 4 h e em seguida liofilizadas por 32 h. Após, foram levadas ao CMM e fixadas em *stubs* por uma fita carbono. Posteriormente a metalização das amostras com ouro foi realizada pelo técnico responsável no CMM. O microscópio utilizado na análise foi o JSM-6060 (Tóquio, Japão)

4.6 Descarte de resíduos

Os resíduos gerados neste trabalho foram submetidos a diferentes formas de descarte. Por isso, todos os rejeitos foram destinados ao seu correto local de descarte, conforme normas da UFRGS juntamente ao Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos onde se situa o BiotecLab. Os resíduos químicos foram

direcionados a Central de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos (CGTRQ) da UFRGS. Todos os materiais biológicos foram esterilizados antes de seu descarte, bem como os materiais considerados como hospitalares, que foram incinerados por empresa terceirizada para garantir a morte de qualquer microrganismo presente.

5. RESULTADOS

Neste trabalho os resultados serão apresentados conforme a execução dos experimentos que tiveram em sua maioria, particularidades e problemas operacionais que tentou-se resolver para iniciar o próximo experimento.

5.1. Experimento 1

Neste experimento o pH foi controlado em 7,0 com operação simultânea de um reator leito fixo e outro leito fluidizado em operação contínua. As soluções de ajuste de pH foram NaOH 10 M e H₃PO₄ 1 M. A utilização de uma base em uma concentração elevada se deu pela rápida, brusca e constante queda do pH devido a reação produzir ácidos orgânicos. Abaixo segue a cinética de ambos os reatores (Figuras 18 e 19).

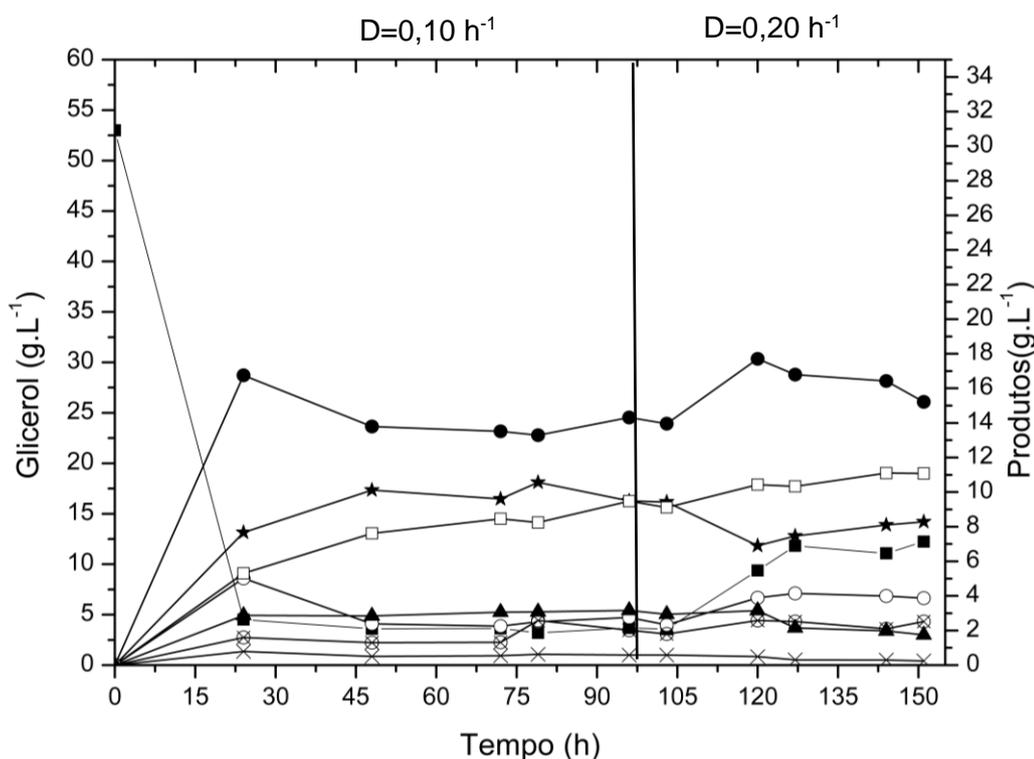


Figura 18: Cinética reator Leito Fluidizado do experimento 1.

(■) Glicerol, (●) 1,3-PD, (○) 2,3-BD, (★) EtOH, (□) Ac. lático, (▲) Ac. acético, (×) Ac. succínico, (⊗) biomassa livre.

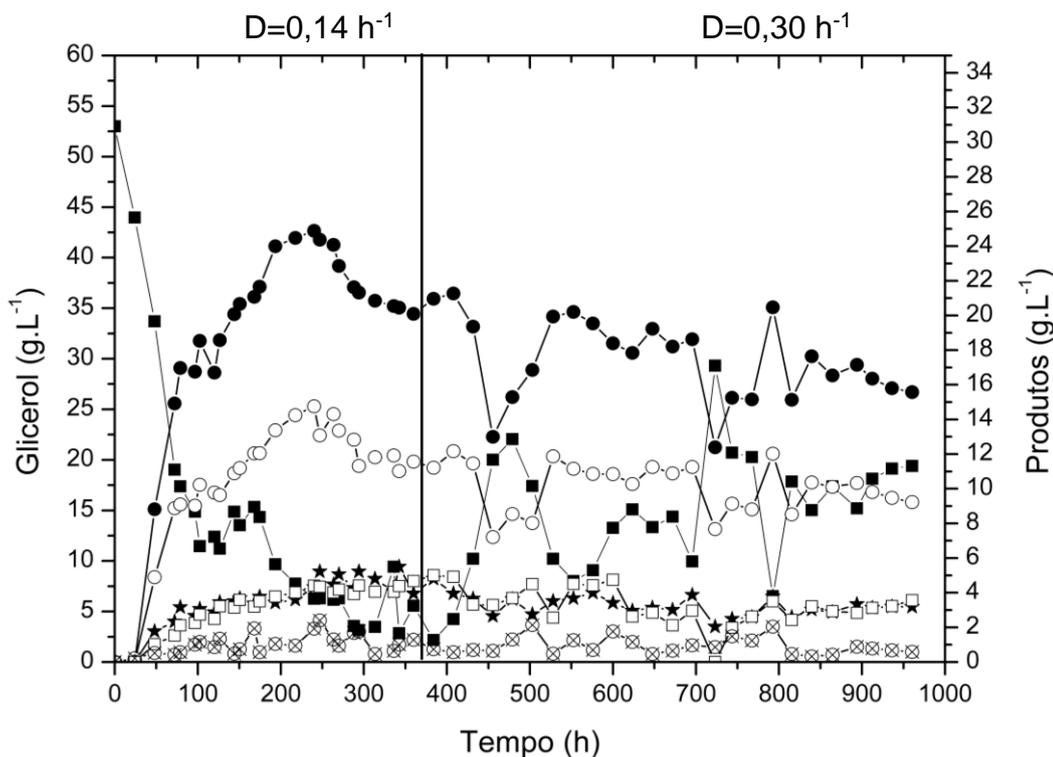


Figura 19: Cinética reator Leito Fixo do experimento 1.

(■) Glicerol, (●) 1,3-PD, (○) 2,3-BD, (★) EtOH, (□) Ac. láctico, (▲) Ac. acético, (⊗) biomassa livre.

Analisando as Figuras 19 e 20 verificamos um comportamento diferente entre os dois reatores em seus primeiros pontos em relação ao consumo de glicerol. Ambos iniciaram com 53 g.L^{-1} de glicerol, no entanto, no RLF nas primeiras 48 h de cultivo a concentração de glicerol diminuiu para $3,56 \text{ g.L}^{-1}$ enquanto o reator de RLE se encontra com $33,77 \text{ g.L}^{-1}$ no mesmo tempo, ou seja, em um mesmo intervalo de tempo o sistema com leito fluidizado consumiu dez vezes mais glicerol que o RLE. O sistema com leito fixo atingiu esses valores apenas em 288 h de reação ($3,56 \text{ g.L}^{-1}$) alcançando a partir desse ponto, o estágio estacionário da sua primeira taxa de diluição. Este mesmo estágio se iniciou no RLF com 48 h de cultivo.

Em relação aos produtos formados também foi evidenciado diferenças entre os dois reatores. A maior produção em ambos os reatores foi de 1,3-PD, porém em concentrações distintas. As maiores concentrações foram de $17,7 \text{ g.L}^{-1}$ e de $24,88 \text{ g.L}^{-1}$ nos RLF e RLE, respectivamente. Ao analisar a formação de produtos com o consumo de glicerol no RLE, percebe-se que apesar do consumo de glicerol ocorrer de forma mais lenta, a produção de 1,3-PD atinge valores maiores ao longo do tempo, quando comparado ao RFL. Isso possivelmente ocorreu devido ao microrganismo

possuir um processo de dismutação em sua rota metabólica onde uma parte do substrato (glicerol) é reduzido e outra oxidado. O 1,3-PD é formado quando o glicerol é reduzido, quando oxidado forma outros compostos como EtOH, ácido láctico, 2,3-BD entre outros ácidos orgânicos. No RLF provavelmente houve uma maior competição pelo substrato pela rota oxidativa, obtendo conseqüentemente maiores valores de produção de EtOH e ácido láctico e produzindo outros ácidos, como é o caso do ácido acético e ácido succínico. Os valores de concentração, conversão e produtividade de cada produto se encontram na Tabela 4, para reator de leito fluidizado e Tabela 5 para o reator de leito fixo.

Em relação ao EtOH e ácido láctico no RLF, também é observado que a fisiologia mudou ao trocar a taxa de diluição, ao aumentar o fluxo ocorreu uma maior produção de ácido láctico ao invés de EtOH. Uma hipótese para esta tendência/fenômeno ao RLF é que por ter a recirculação, esta proporciona uma mistura reacional mais homogênea permitindo uma melhor transferência de massa e do oxigênio que vem dissolvido no meio de cultura. Com fluxo de líquido mais uniforme em todo o volume do reator se têm um melhor controle sobre o pH da reação.

Tabela 4: Resultados do reator de leito fluidizado do experimento 1

	Concentração (g.L ⁻¹) ^a		Y _{P/S} (g.g ⁻¹) ^b		Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b	
D (h ⁻¹)	0,10	0,20	0,10	0,20	0,10	0,20
Glicerol	3,70	11,12	-	-	-	-
1,3-PD	14,27	16,53	0,29	0,39	1,43	3,31
2,3BD	2,87	3,98	0,058	0,09	0,30	0,80
EtOH	9,48	7,60	0,19	0,18	0,95	1,54
Ac. Láctico	8,04	10,74	0,16	0,26	0,80	2,15
Ac. Acético	3,00	2,26	0,06	0,05	0,30	0,45
Ac. Succínico	0,60	0,34	0,012	0,008	0,06	0,07
Biomassa livre	1,77	2,43	0,04	0,06	0,18	0,49

^a Estes valores são a média dos resultados dentro da mesma D.

^b Para estes cálculos utilizou-se a média obtida de concentração de produto e substrato dentro da mesma D.

Tabela 5: Resultados do reator de leito fixo do experimento 1

	Concentração (g.L ⁻¹) ^a		Y _{P/S} (g.g ⁻¹) ^b		Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b	
D (h ⁻¹)	0,14	0,30	0,14	0,30	0,14	0,30
Glicerol	11,5	15,74	-	-	-	-
1,3-PD	19,48	17,13	0,47	0,46	2,73	5,13
2,3BD	10,95	9,96	0,26	0,27	1,53	2,99
EtOH	3,70	3,15	0,09	0,08	0,52	0,95
Ac. Lático	3,42	3,09	0,08	0,08	0,48	0,93
Biomassa livre	1,02	0,95	0,02	0,02	0,14	0,29

^a Estes valores são a média dos resultados dentro da mesma D.

^b Para estes cálculos utilizou-se a média obtida de concentração de produto e substrato dentro da mesma D.

No RLE, apesar do pH também ter sido controlado em 7,0, por não ter recirculação (mistura reacional menos homogênea) e por sua característica operacional de ser mais difícil o controle de pH, junto as diferenças nas cinéticas, é possível que a reação não ocorria no pH em que se desejava controlar. Outro indício dessa situação é que no RLE ao invés de ácido láctico e EtOH o segundo maior produto foi o 2,3-BD, uma vez que a produção de 2,3-BD é favorecido em pH 6,0.

Outras diferenças que são evidenciadas entre os reatores são as taxas de diluição e o tempo de operação entre eles. Como a taxa de diluição é calculada levando em consideração o volume de meio dentro do reator, e este é diferente em cada reator devido a quantidade de biocatalizador (*K. pneumoniae* BLh-1 imobilizada em *Lentikats*®), para se obter a mesma D, também se faz necessário vazões de alimentação diferentes. Porém as bombas das unidades de controle não possuem um ajuste fino, mesmo trocando os valores no controlador, as vazões não mudavam dentro de uma faixa de valor, portanto as taxas de diluição foram selecionadas e ajustadas conforme as possibilidades do equipamento.

As diferenças de tempo entre o reator de leito fluidizado (151 h) e para o RLE (960 h), deve-se pelo rompimento da mangueira de recirculação na bomba peristáltica, devido ao atrito da mangueira com os rolamentos. A lubrificação com óleo de silicone para melhorar a fricção já havia sido pensada e estava sendo feita

diariamente, porém sem êxito. Antes dessa mangueira de recirculação utilizada nesse experimento ($D_i = 5 \text{ mm}$ e $D_e = 10 \text{ mm}$) outra já havia sido testada ($D_i = 3 \text{ mm}$ e $D_e = 6 \text{ mm}$) porém também rompeu-se após 78 e 101 h. A mudança de uma para outra foi feita com o pensamento de que aumentando o diâmetro a velocidade programada na bomba para uma mesma vazão seria menor e com giro dela sendo mais lento ocasionaria em menos fricção, evitando o rompimento. Apesar da mangueira, nesta segunda situação, ter suportado 50 h a mais de operação em relação a primeira, a mesma não evitou o rompimento novamente. Sendo assim para os próximos experimentos utilizamos uma nova mangueira de tamanho intermediário a essas duas ($D_i = 4 \text{ mm}$ e $D_e = 8 \text{ mm}$).

No RLE, que operou por mais tempo, verificamos um outro problema operacional que foi a colonização das mangueiras, principalmente a de fluxo de saída, gerando o entupimento delas. No caso da mangueira de saída, o entupimento gerou um acúmulo de meio dentro do sistema e na mangueira de entrada uma diminuição no fluxo e provavelmente consumo do substrato antes de entrar no reator. Com isso após 695 h se fez necessário a troca das mangueiras, que coincide com um pico de glicerol e baixa nos produtos no ponto seguinte. Em consequência destas adversidades para os próximos experimentos se pensou em ao mesmo tempo que trocar o vaso que contém meio novo para alimentação e o frasco de coleta do fluxo de saída, fazer a troca das mangueiras a fim de evitar estas situações novamente.

5.2. Experimento 2

Neste experimento optou-se por não controlar o pH com a ideia de se ter um melhor esclarecimento entre as diferenças das cinéticas obtidas no experimento 1, pois no RLF, onde o pH teve um controle efetivo, o mesmo não favoreceu a produção de 2,3-BD, um dos objetivos deste trabalho. Como uma das vantagens da imobilização celular é poder reutilizar os biocatalizadores, nesse experimento foram reutilizados os biocatalisadores do experimento anterior. As cinéticas do RLF encontram-se nas Figuras 20 e 21 e do RLE nas Figuras 22 e 23.

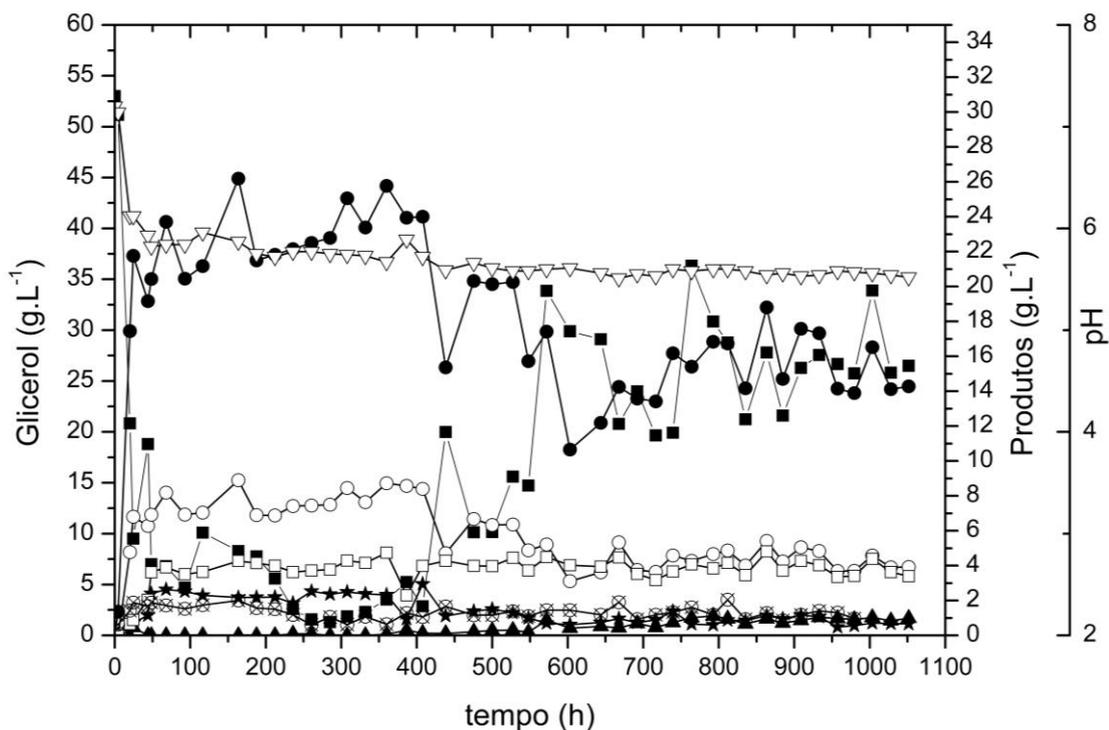


Figura 20: Cinética do reator de leito fluidizado na $D=0,10 \text{ h}^{-1}$ do experimento 2. (■) Glicerol, (●) 1,3-PD, (○) 2,3-BD, (★) EtOH, (□) Ac. lático, (▲) Ac. acético, (⊗) biomassa livre, (▽) pH.

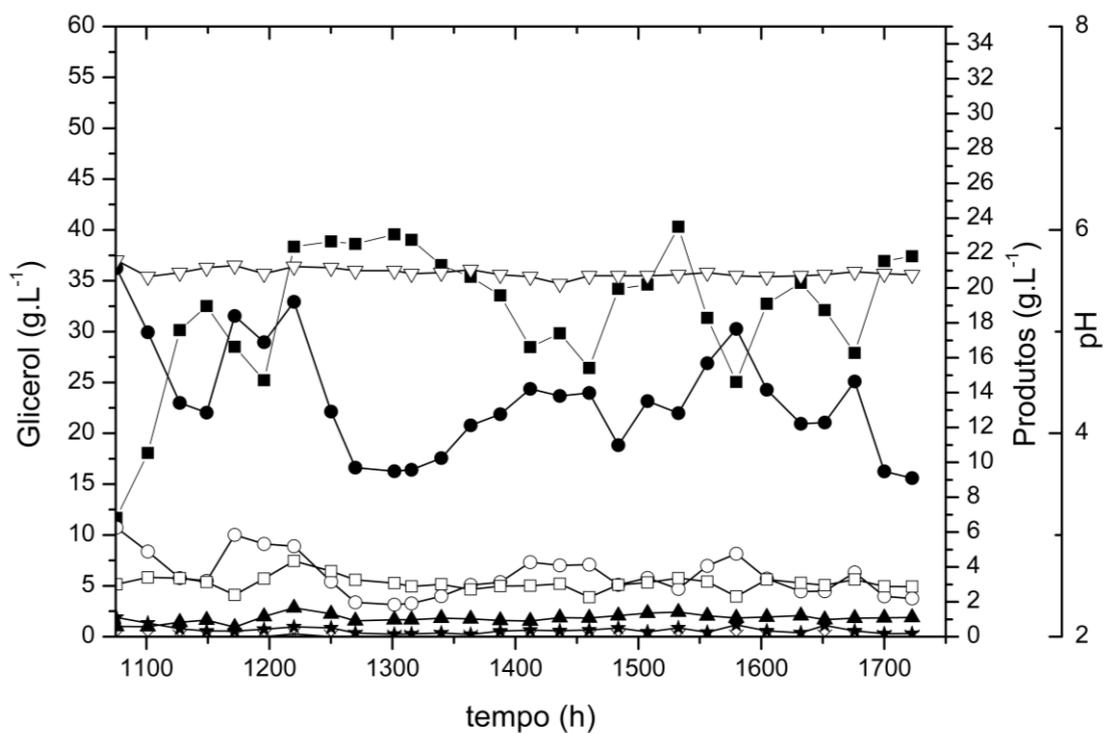


Figura 21: Cinética do reator de leito fluidizado na $D=0,33 \text{ h}^{-1}$ do experimento 2. (■) Glicerol, (●) 1,3-PD, (○) 2,3-BD, (★) EtOH, (□) Ac. lático, (▲) Ac. acético, (▽) pH.

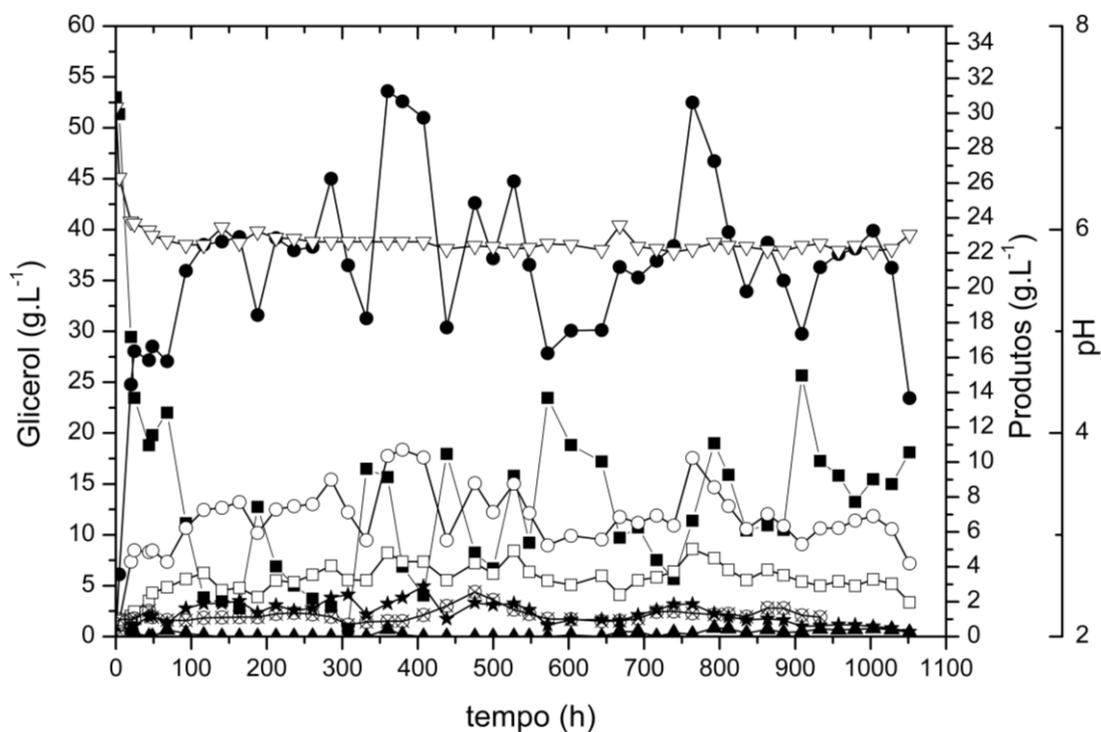


Figura 22: Cinética do reator de leito fixo na $D=0,14 \text{ h}^{-1}$ do experimento 2.
 (■) Glicerol, (●) 1,3-PD, (○) 2,3-BD, (★) EtOH, (□) Ac. lático, (▲) Ac. acético, (⊗) biomassa livre, (▽) pH.

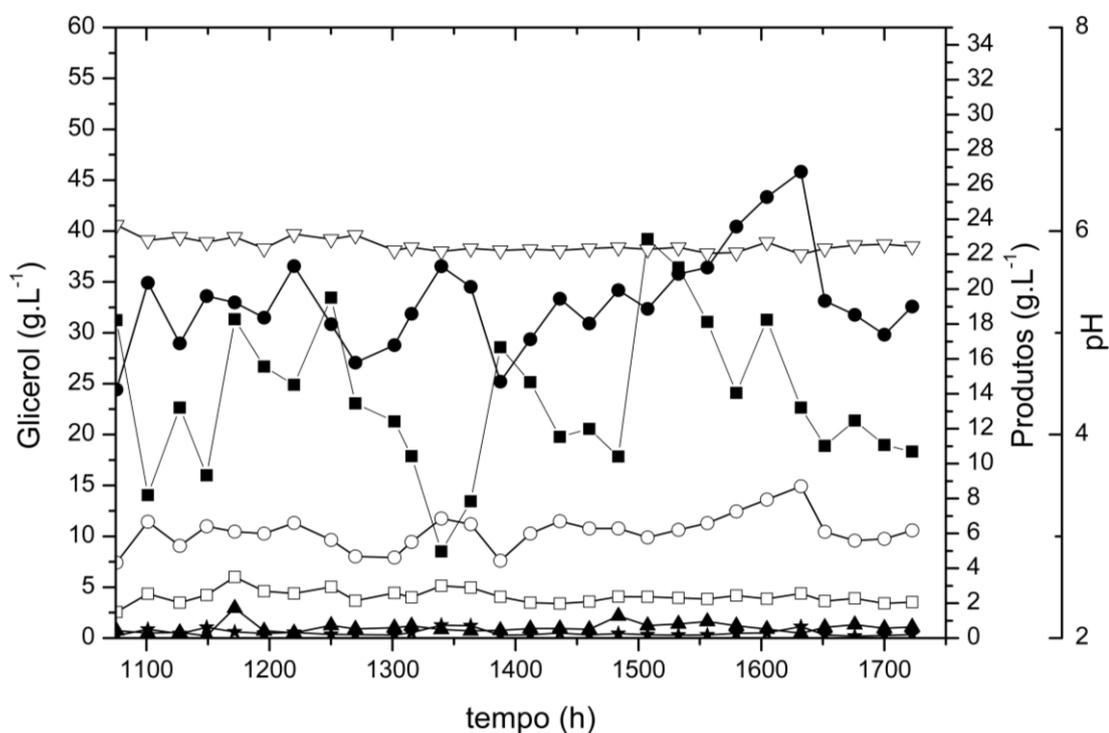


Figura 23: Cinética do reator de leito fixo na $D=0,45 \text{ h}^{-1}$ do experimento 2.
 (■) Glicerol, (●) 1,3-PD, (○) 2,3-BD, (★) EtOH, (□) Ac. lático, (▲) Ac. acético, (▽) pH.

Neste experimento, os gráficos de um mesmo reator foram separados conforme a taxa de diluição para uma melhor visualização das tendências e comportamentos nos mesmos, que ficava muito agrupado devido a um período de tempo maior. No RLF com a mudança no diâmetro da mangueira ocorreu uma leve alteração no volume de meio utilizado conseqüentemente também na taxa de diluição.

Neste experimento o consumo de glicerol novamente foi mais rápido comparado ao RLE, porém o estado estacionário foi difícil de se atingir em ambos os reatores. Podemos também observar que os produtos formados no RLF foram diferentes comparados ao experimento 1, como por exemplo, neste experimento as concentrações de ácido láctico e EtOH diminuíram consideravelmente, aumentando a produção de 2,3-BD e 1,3-PD na primeira taxa de diluição operada em cada reator. Os resultados de concentração, conversão e produtividade do RLF se encontram na Tabela 6 e do RLE na Tabela 7.

Tabela 6: Resultados do reator de leito fluidizado do experimento 2

	Concentração (g.L ⁻¹) ^a		Y _{P/S} (g.g ⁻¹) ^b		Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b	
	0,10	0,33	0,10	0,33	0,10	0,33
D (h ⁻¹)	0,10	0,33	0,10	0,33	0,10	0,33
Glicerol	17,70	32,08	-	-	-	-
1,3-PD	18,15	13,6	0,51	0,65	1,81	4,48
2,3BD	5,66	3,52	0,16	0,17	0,57	1,16
EtOH	1,34	0,39	0,04	0,02	0,13	0,13
Ac. Acético	0,43	1,05	0,01	0,05	0,04	0,35
Ac. Láctico	3,62	3,07	0,10	0,15	0,36	1,01

^a Estes valores são a média dos resultados dentro da mesma D.

^b Para estes cálculos utilizou-se a média obtida de concentração de produto e substrato dentro da mesma D.

Tabela 7: Resultados do reator de leito fixo do experimento 2.

	Concentração (g.L ⁻¹) ^a		Y _{P/S} (g.g ⁻¹) ^b		Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b	
D (h ⁻¹)	0,14	0,45	0,14	0,45	0,14	0,45
Glicerol	13,58	23,53	-	-	-	-
1,3-PD	21,07	19,31	0,53	0,65	2,95	8,69
2,3BD	6,71	6,10	0,17	0,20	0,94	2,74
EtOH	1,29	0,30	0,03	0,01	0,18	0,13
Ac. Acético	0,16	0,61	0,004	0,02	0,02	0,27
Ac. Lático	3,22	2,38	0,08	0,08	0,45	1,07

^a Estes valores são a média dos resultados dentro da mesma D.

^b Para estes cálculos utilizou-se a média obtida de concentração de produto e substrato dentro da mesma D.

O 1,3-PD continuou sendo o produto obtido em maior concentração, produtividade e rendimento em ambos reatores, e por segundo, neste experimento, o 2,3-BD. As maiores concentrações ao longo do cultivo em RLE foram de 31,27 e 10,72 g.L⁻¹, e no RLF 26,19 e 8,89 g.L⁻¹, respectivamente. Entre os reatores pode-se observar valores muito parecidos de conversão, sendo a produtividade no RLE mais alta devido a maiores taxas de diluição.

Neste experimento observamos uma grande oscilação entre o glicerol e os produtos sendo isso mais visível para 1,3-PD. Com o passar do tempo se verificou também que a capacidade do glicerol em ser consumido foi diminuindo e junto disso uma grande quantidade de biomassa livre era visível dentro do reator. Essa visualização de biomassa era mais evidente no afunilamento da parte superior do reator que se liga ao leito onde ocorria a sedimentação e acúmulo das células livres. Devido a isto a análise de biomassa livre foi retirada a partir do momento em que isto foi constatado por não estar sendo representativa e por isso não aparecem nos gráficos da segunda taxa de diluição. O decaimento da concentração dos produtos e conseqüentemente da conversão também foi observada ao longo do cultivo o que indica que limitações difusionais estavam presentes.

Uma grande quantidade de biomassa livre também foi observada nos leitos dos reatores junto ao *LentiKats*® com o microrganismo imobilizado assim como uma

alta evolução de CO₂. No reator de leito fixo devido ao biocatalisador estar empacotado e estático se observava biofilme e formação de aglomerados de células ao redor deles. Isso impedia a saída de gases do leito ocorrendo a formação de bolsões, que posteriormente formava caminhos preferenciais. Já no leito fluidizado o aumento da quantidade de biomassa livre no leito foi notada pela turbidez do meio e pela fluidização que com o passar do tempo movimentava menos os biocatalisadores, alcançando uma altura menor, muito provavelmente pela mudança na densidade do líquido dentro do reator assim como mudança no peso do biocatalisador. Devido a essa condição desfavorável se pensou em uma saída para a eliminação desta biomassa e então se tentou realizar um *wash out*. As bombas foram acionadas em sua velocidade máxima até se observar uma diminuição nas células livres e nos acúmulos do bocal na parte superior. Após, os fluxos de entrada e saída foram trocados para a $D = 0,33 \text{ h}^{-1}$ ao invés de $0,22 \text{ h}^{-1}$ no RLF e $D = 0,45 \text{ h}^{-1}$ ao invés de $0,3 \text{ h}^{-1}$ no RLE, afim de evitar um novo acúmulo de células livres.

Mesmo fazendo o *wash out* e trocando a taxa de diluição para uma maior, o comportamento dos reatores seguiu com uma baixa conversão do glicerol e concentração dos produtos ao longo do cultivo, novamente sugerindo que limitações difusionais estavam presentes.

Neste experimento, a cada reposição do frasco de meio novo e do frasco de coleta do fluxo de saída se fez a troca das mangueiras para evitar entupimentos. Comportamento similar ao ocorrido no experimento 1, após a troca das mangueiras coincide um pico de glicerol e baixa nos produtos no ponto seguinte em todas as trocas. Notamos que após a troca das mangueiras provavelmente o microrganismo passa por uma fase lag de adaptação mudando de anaerobiose para aerobiose devido a inserção de ar aprisionado nas mangueiras. Entretanto, o metabolismo desejado era rapidamente retomado devido à alta capacidade deste microrganismo de consumir oxigênio. Na fluidização do RLF mesmo utilizando uma nova mangueira com diâmetros diferentes, o problema de desgaste ocorreu e se fez necessário a troca intermitente da mangueira antes de seu rompimento.

Em todos os gráficos, um novo elemento foi adicionado que é a medida de pH. Devido a não estar mais sendo controlado o pH, este foi monitorado em cada retirada de ponto. Em ambos os reatores o pH iniciou em 7,2. No RLE seu decaimento foi observado até 260 h e depois se manteve estável em 5,8. No RLF se observou o mesmo comportamento, porém o seu decaimento se prolongou até 643 h em que

posteriormente se manteve estável em 5,5. Essa diferença no valor de pH provavelmente se deu ao RLF ter produzido uma concentração maior de ácidos, (ácido acético e ácido láctico) em relação ao RLE em qualquer taxa de diluição.

5.3. Experimento 3

Este experimento foi elaborado com o objetivo de se ter uma réplica do RLE do primeiro experimento, afim de comparar os resultados. O pH não foi controlado, e foram usados biocatalisadores que não haviam ainda sido utilizados. A cinética deste cultivo é mostrada na Figura 24.

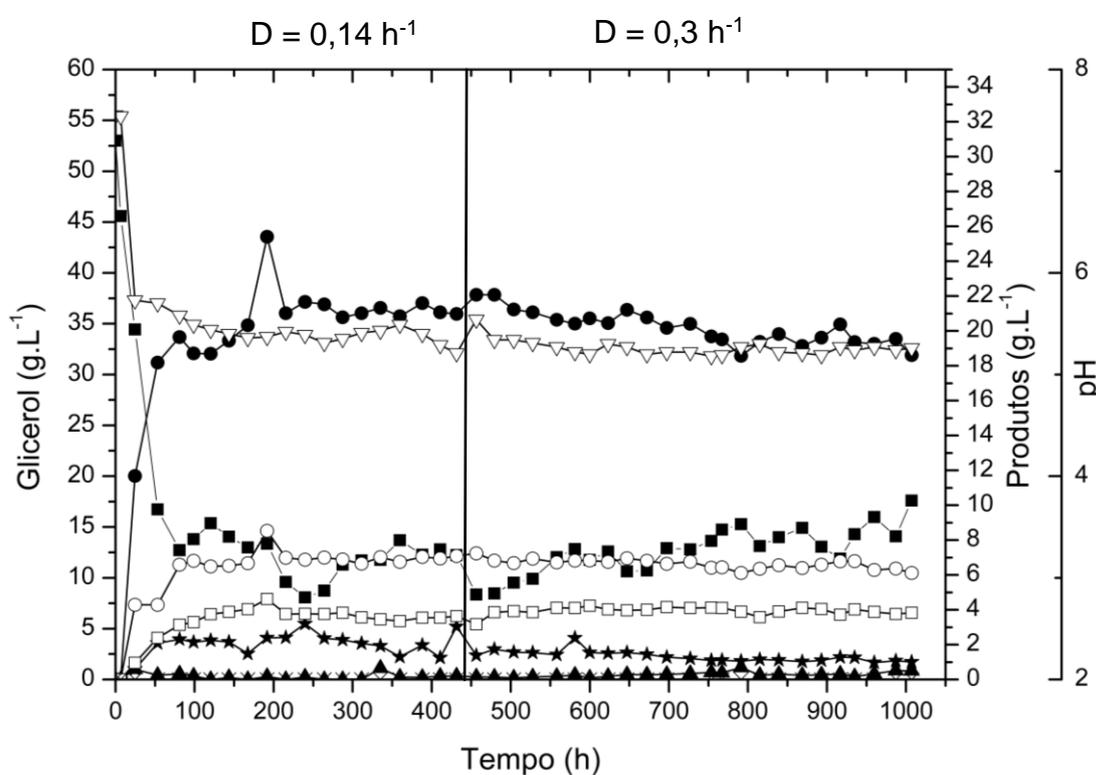


Figura 24: Cinética do reator de leito fixo do experimento 3.

(■) Glicerol, (●) 1,3-PD, (○) 2,3-BD, (★) EtOH, (□) Ac. láctico, (▲) Ac. acético, (▽) pH.

Claramente observando a cinética da Figura 24, rapidamente conclui-se que neste cultivo foi obtido uma melhor estabilidade no sistema, e que não houve mudanças na fisiologia do microrganismo após a troca da taxa de diluição.

A tendência no consumo inicial de glicerol foi muito parecida com o primeiro experimento, obtendo resultados ligeiramente mais rápidos. No segundo dia de cultivo, a concentração de glicerol já estava em $16,73 \text{ g.L}^{-1}$. Uma concentração próxima a atingida no experimento 1 em 48 h ($33,70 \text{ g.L}^{-1}$), neste experimento foi

obtida em 24 h (34,43 g.L⁻¹). O 1,3-PD continuou sendo o produto obtido em maior concentração, produtividade e rendimento, e o 2,3-BD o segundo, assim como no experimento 2. As maiores concentrações ao longo do cultivo foram de 31,27 e 10,72 g.L⁻¹, respectivamente. Relacionando o reator de leito fixo deste experimento com o do experimento 1, pode-se notar valores muito parecidos de conversão, e produtividade para 1,3-PD e para 2,3-BD valores levemente maiores no experimento 1. Os resultados deste experimento encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados do reator de leito fixo do experimento 3.

	Concentração (g.L ⁻¹) ^a		Y _{P/S} (g.g ⁻¹) ^b		Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b	
D (h ⁻¹)	0,14	0,30	0,14	0,30	0,14	0,30
Glicerol	15,33	12,17	-	-	-	-
1,3-PD	19,15	20,37	0,51	0,50	2,68	6,11
2,3BD	6,29	6,68	0,17	0,16	0,88	2,00
EtOH	1,96	1,38	0,05	0,03	0,27	0,41
Ac. Acético	0,16	0,26	0,004	0,006	0,02	0,08
Ac. Lático	3,28	3,96	0,09	0,10	0,46	1,19

^a Estes valores são a média dos resultados dentro da mesma D.

^b Para estes cálculos utilizou-se a média obtida de concentração de produto e substrato dentro da mesma D.

5.4. Análise das imagens por MEV

Esta análise foi realizada com o intuito de avaliar microscopicamente as estruturas e biomassa nas lentes de PVA *LentiKats*® após a imobilização do microrganismo, ao final da primeira fermentação de cada reator (experimento 1) e após o seu reuso (experimento 2), afim de elucidar dúvidas quanto a limitações difusionais. As imagens obtidas nesta análise estão dispostas nas Figuras 25, 26 e 27. Quando se teve particularidades em relação a um determinado reator, este foi indicado nas legendas das figuras. Quando não há indicação é porque não diferiu entre os reatores.

Nas imagens obtidas verificamos que, após o experimento 2, em que as *LentiKats*® foram reutilizadas, uma quantidade muito maior de biomassa estava

presente nas lentes em relação aos demais estágios em que foi analisado, o que pode ter levado a limitações de difusão, devido à obstrução nos poros. Macroscopicamente durante cultivos de longa duração já se observava a formação de biofilme e formação de aglomerados de células ao redor das lentes. Ao final de cada reator, para dissipar esses aglomerados, as lentes eram lavadas com solução salina estéril, até a completa separação visual. Com esta análise verificamos que ainda assim há formação desses grumos microscopicamente que comprometem a difusividade do biocatalisador.

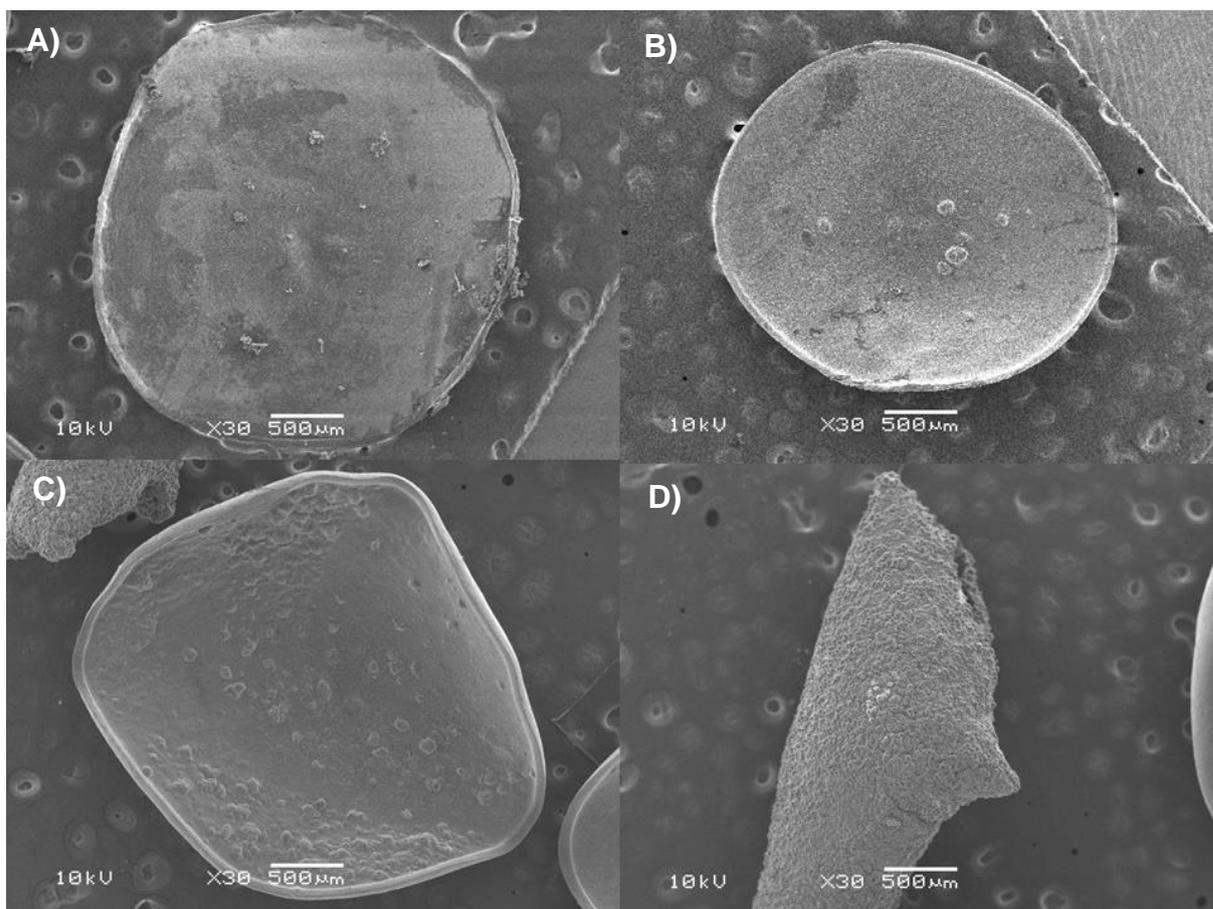


Figura 25: Imagens de MEV do biocatalizador em 30 X.
A) após a imobilização do microrganismo; B) após experimento 1; C) após experimento 2; D) após experimento 2 para RLF.

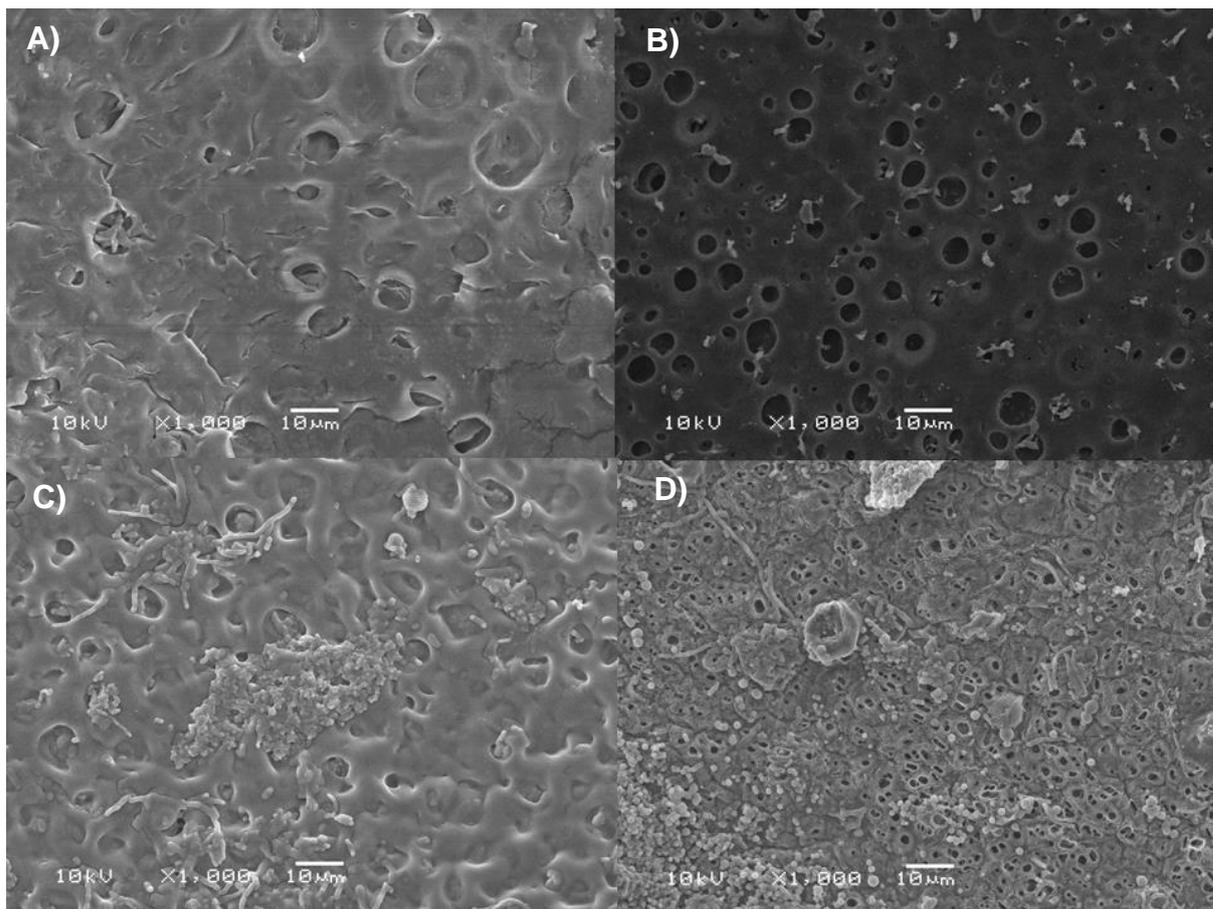


Figura 26: Imagem de MEV do biocatalizador em 1000 X
A) após a imobilização do microrganismo; B) após experimento 1; C) após experimento 2 para RLF; D) após experimento 2 para RLE.

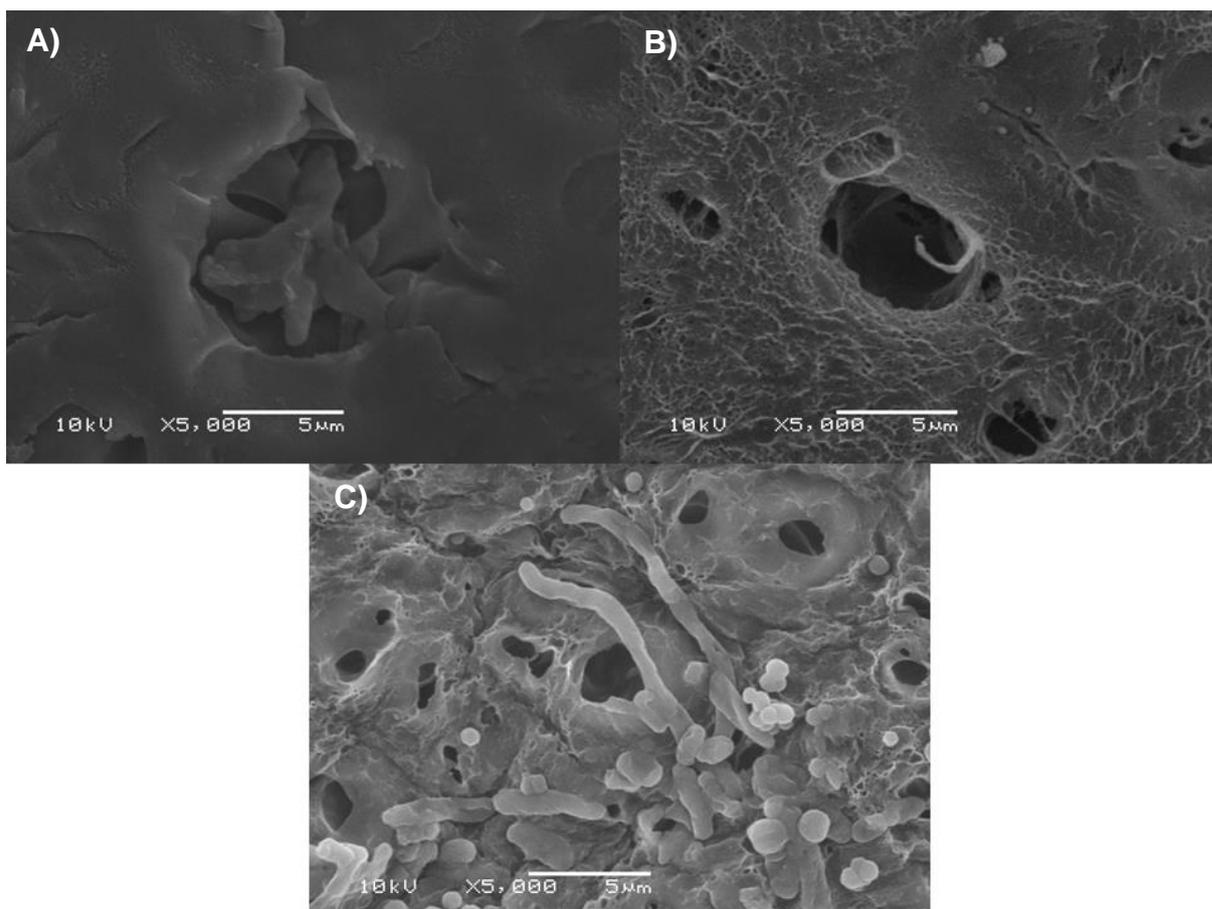


Figura 27: Imagem de MEV do biocatalizador em 5000 X.
 A) após a imobilização do microrganismo; B) após experimento 1; C) após experimento 2.

Na imagem que abrange toda a superfície das lentes (30 X) observamos que após o experimento 2 há uma leve mudança na conformação da borda da lente (Figura 25-C) e no RLF além dessa característica algumas lentes apresentaram uma completa mudança em sua estrutura (Figura 25-D).

Na Figura 26 onde se conseguiu um aumento de 1000 X, é possível diferenciar a quantidade de biomassa após o segundo experimento nos RLF (Figura 26-C) e o RLE (Figura 26-D). O RLE apresenta maior quantidade de biomassa pois o tempo de cultivo somando os experimentos 1 e 2 neste reator é maior que o do RLF, proporcionando um maior tempo para colonização e propagação das células.

As imagens em 5000 X (Figura 27) foram realizadas para ter uma maior visibilidade dos poros, onde eles não estão obstruídos ou recobertos.

6. DISCUSSÃO

A tendência mostrada no experimento 1 e 2 em relação ao consumo de glicerol, também foi observada por De Souza (2013) comparando o reator de leito fluidizado com o fixo, tanto em relação ao consumo rápido de glicerol pelo RLF, quanto no menor tempo em atingir o estado estacionário. O autor descreve que essa melhor performance no RLF foi devida ao sistema interno ser mais homogêneo, obtendo uma melhor mistura que ocorre devido à fluidização, que neste caso se dava pela recirculação do meio, o que gerou uma eficiente transferência de massa no RLF em relação ao RLE que não havia recirculação, assim como no mesmo sistema deste trabalho.

No experimento 1, a menor produção de 1,3-PD no RLF comparado ao RLE ocorreu possivelmente pela presença de EtOH e ácido lático, pois as enzimas responsáveis pela formação de etanol (aldeído desidrogenase e álcool desidrogenase), assim como a enzima responsável pela formação de ácido lático (desidrogenase láctica), requerem a forma reduzida do cofator NADH, competindo com a enzima 1,3-propanodiol oxidoredutase (PDOR) que também é dependente deste e responsável pela formação de 1,3-PD.

Conforme Celińska (2012), durante a fermentação do glicerol, as culturas que apresentam maior rendimento em 1,3-PD são as que produzem somente ácido acético como coproduto, além de CO₂ e H₂, convertendo 64 % do glicerol consumido em 1,3-PD. Ao contrário, se ocorre a formação de etanol, o rendimento do 1,3-PD é menor, aumentando a produção de biomassa.

Zang *et al.* (2006) em seu trabalho também reporta que a produção de etanol durante a fermentação propanodiólica por *K. pneumoniae* reduz a produção de 1,3-PD, pois a primeira etapa da fermentação etanólica utiliza acetil-CoA, catalisada pela enzima aldeído desidrogenase, que compete com PDOR pelo cofator NADH.

A baixa conversão de glicerol em 1,3-PD, assim como a mudança na fisiologia com o aumento do fluxo de alimentação, favorecendo a produção de ácido lático no lugar de EtOH, no RLF do experimento 1 deste trabalho, também foi observada, por Rossi, De Souza, Ayub (2013) quando operaram biorreatores em batelada alimentada. Estes autores estudaram o metabolismo de *K. pneumoniae* BLh-1 sob condições anaeróbias e de limitação de oxigênio (0,4 vvm) com o objetivo de investigar os efeitos da alimentação do glicerol bruto nas células. A batelada

alimentada sob condições de anaerobiose mostrou que as concentrações de 1,3-PD e EtOH aumentaram com a taxa de alimentação, com produções máximas de 26,12 e 19,2 g.L⁻¹, respectivamente. As condições de limitação de oxigênio desviaram o metabolismo da bactéria para uma formação elevada de ácido láctico, chegando a 59 g.L⁻¹ em maiores taxas de alimentação de glicerol, diminuindo a produção de etanol. Essa analogia sugere que talvez o RLF no experimento 1 deste trabalho, tenha sido operado em uma condição de oxigênio limitante o que é possível através da alimentação contínua do meio novo, que possui uma quantidade de oxigênio dissolvida no meio, e pela recirculação que melhora a transferência de massa e oxigênio dentro do sistema. Porém isto não pode ser afirmado pois as concentrações de oxigênio não foram monitoradas.

Cheng *et al.* (2004) também obtiveram resultados de fisiologia semelhantes aos recém descritos. Os autores avaliaram a produção de 1,3-PD por *K. pneumoniae* com diferentes estratégias de aeração (0,2 vvm de N₂; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 vvm de ar) e observaram que a formação de biomassa é maior à medida que se aumenta a aeração, canalizando mais substrato para a via oxidativa, reduzindo o rendimento de 1,3-PD. Na presença de O₂, houve certa inibição na produção de acetato e de etanol, acumulando ácido láctico e 2,3-butanodiol, uma resposta à maior demanda pelos equivalentes redutores e por energia. Testaram também em uma mesma cinética a alteração de anaerobiose/aerobiose. Esta estratégia não beneficiou a produção de 1,3-PD, porém reduziu a inibição provocada pelo ácido acético e pelo etanol, que podem afetar adversamente a fermentação do glicerol. Nesse estudo, os autores obtiveram 70 g.L⁻¹ de 1,3-PD e 16 g.L⁻¹ de 2,3-butanodiol.

No trabalho de Park, Rathnasingh, Song (2017), através de uma análise em *sílico*, avaliaram o efeito da agitação sob a produção de 1,3-PD e 2,3-BD e crescimento celular. Desta análise, realizaram experimentos em microaerofilia (0,5 vvm) com agitação de 200 a 400 rpm com uma linhagem modificada de *K. pneumoniae* onde os genes *ldhA* e *mdh* foram inativados. O melhor resultado foi obtido a 300 rpm com concentração de 125 g.L⁻¹, rendimento de 0,65 g.g⁻¹ e produtividade de 2,0 g.L⁻¹.h⁻¹ de dióis. A 400 rpm houve menor concentração de dióis, porém houve uma maior concentração de 2,3-BD em relação a 300 rpm. A 400 rpm também houve o maior consumo de glicerol, porém não foi utilizado para aumentar a produção dos dióis e sim de biomassa, o que sugere que a essa velocidade de agitação a via tenha se

deslocado para a rota oxidativa, provavelmente por uma melhor transferência de oxigênio no meio

Porém, Chen *et al.* (2003), em estudo teórico sobre a bioconversão do glicerol em 1,3-propanodiol por *K. pneumoniae*, concluem que a produção de 1,3-PD em microaerofilia é favorecida em relação a anaerobiose ou aerobiose. O rendimento máximo teórico de 1,3-PDO a partir de glicerol poderia chegar a $0,70 \text{ g.g}^{-1}$ ($0,85 \text{ mol.mol}^{-1}$), em vez de $0,60 \text{ g.g}^{-1}$ ($0,72 \text{ mol.mol}^{-1}$), se todo o acetil-CoA entrasse no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) em detrimento da via do ácido acético, como ocorre em condições anaeróbias. A concentração final e o rendimento de 1,3-PD em microaerofilia se aproximam dos valores encontrados sob anaerobiose, com menor produção de etanol, além de ocorrer em tempo muito menor em relação à fermentação anaeróbia.

Entre as condições e parâmetros de operação já estudadas, um trabalho avaliou o efeito da oscilação do pH durante a fermentação em batelada alimentada por *K. pneumoniae* a fim de reduzir a formação de 2,3-BD (produzido entre os pH 5,0-6,5) e ácido láctico (produzido entre os pH 7,1-8,0). A produção de 1,3-PD foi de $70,0 \text{ g.L}^{-1}$, apresentando baixa produção desses coprodutos (Ji *et al.*, 2009). Os resultados destes autores conferem com os obtidos analisando o efeito do pH nos experimentos 1 e 2 no RLF. No experimento 1 onde o pH foi controlado (7,0) favoreceu a produção de ácido láctico em relação ao 2,3-BD. Os resultados do experimento 2 em que não se controlou o pH e este caiu até 5,5 comprova este efeito diminuindo consideravelmente a produção de EtOH e ácido láctico e aumentando a produção de 2,3-BD.

Os maiores valores de 2,3-BD obtidos no RLE do experimento 1 comparado com os do experimento 3 podem ter ocorrido devido o pH do reator ter ficado com um valor intermediário, entre o que se desejou controlar (7,0) e o que se obtém quando não é controlado (5,8). Sendo esse valor dentro da faixa indicada para melhor produção de 2,3-BD descrito acima.

Sobre produção de 1,3-PD e 2,3BD com células imobilizadas de *K pneumoniae* em reatores tubulares de leito fixo e fluidizado em regime contínuo apenas um trabalho foi realizado até o momento. No estudo de De Souza (2013), os reatores foram operados a uma D de $0,05 \text{ h}^{-1}$ e sem controle de pH. O autor afirma que um melhor resultado foi observado com o RLF, se comparado os regimes estacionários, com a produção de 1,3-PD em torno de 22 g.L^{-1} , e 2,3 BD em 8 g.L^{-1} . No RLE, o autor obteve um pico máximo de aproximadamente 25 e 10 g.L^{-1} de 1,3-

PD e 2,3-BD, respectivamente. Estes resultados foram comparados com o experimento 2 deste trabalho em que os reatores também foram operados sem o controle de pH e os dados encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Reatores contínuos de leito fixo e fluidizado com células imobilizadas de *K. pneumoniae* sem controle de pH.

		RLF	RLE
Neste trabalho (experimento 2)	D (h ⁻¹)	0,10	0,14
	1,3-PD (g.L ⁻¹)	26,19	31,27
LentiKats®	2,3-BD (g.L ⁻¹)	8,89	10,72
De Souza (2013) Alginate	D (h ⁻¹)	0,05	0,05
	1,3-PD (g.L ⁻¹)	22	25
	2,3-BD (g.L ⁻¹)	8	10

Ainda em relação ao trabalho citado acima, a imobilização de *K. pneumoniae* foi realizada em esferas de alginato de cálcio e o autor cita algumas desvantagens quanto ao uso dessa matriz, como baixa resistência as taxas de diluição, e desestabilização quando em contato com as soluções de controle de pH. Com o PVA nenhuma das adversidades citadas foram apuradas.

Em comparação à produção por *K. pneumoniae* BLh-1, Loureiro-Pinto *et al.* (2017), realizou cultura contínua em reator de coluna vidro de leito fluidizado, com *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 imobilizado em esferas de alginato de cálcio para a produção apenas para a produção de 1,3-PD pois até o momento não há relatos deste microrganismo ser um produtor de 2,3-BD porém é amplamente estudado para a produção 1,3-PD. O substrato utilizado foi glicerol bruto derivado de biodiesel. Os resultados mostraram que a concentração de 1,3-PD e a absorção de glicerol diminuíram quando a taxa de diluição aumentou. A concentração máxima do produto foi de 20,5 g.L⁻¹, para uma concentração de glicerol de 50 g.L⁻¹ e uma taxa de diluição de 0,05 h⁻¹. As produtividades mais altas foram observadas para uma taxa de diluição 0,20 h⁻¹. Esse resultado foi comparado com os de *K. pneumoniae* BLh-1 nos RLF dos experimentos 1 e 2 deste trabalho que estão na Tabela 10. Em ambos os experimentos, a taxa de conversão acompanhou o aumento da taxa de diluição e os maiores valores obtidos de rendimento de 1,3-PD foram de 0,39 g.g⁻¹ de glicerol no experimento 1 e 0,65 g.g⁻¹ de glicerol no experimento 2.

Tabela 10: Reatores contínuos de Leite Fluidizado com diferentes células imobilizadas para produção de 1,3-PD

	Suporte/ Microrganismo	D (h⁻¹)	Produtividade de 1,3-PD (g.L⁻¹.h⁻¹)
Loureiro-Pinto <i>et al.</i> (2017)	Alginato/ <i>Clostridium butyricum</i>	0,20	2,80
Neste trabalho Experimento 1	<i>Lentikats</i> ®/ <i>K. pneumoniae</i>	0,20	3,31
Neste trabalho Experimento 2	<i>Lentikats</i> ®/ <i>K. pneumoniae</i>	0,33	4,48

Em relação aos produtos, Park, Rathnasingh, Song (2017), construíram um mutante *K. pneumoniae* $\Delta ldhA \Delta mdh$ com base em análise de fluxo metabólico *in silico*⁴ de escale genômica, que previram que a inativação dos genes *ldhA* e *mdh*, responsáveis por codificar desidrogenase láctica e malato desidrogenase, respectivamente, reduziria efetivamente a formação de subprodutos e melhoraria a produção de 1,3-PD e 2,3-BD sem retardo de crescimento celular. A linhagem mutante foi avaliada com sucesso em relação a linhagem selvagem por fermentações preliminares. Em condição de microaerofilia e 300 rpm os autores realizaram fermentações em batelada alimentada em escala laboratorial e piloto (5.000 L), para avaliar a produção industrial do mutante. Os resultados estão descritos na Tabela 11 comparados com o experimento 2 que foi onde se obteve a maior co-produção dos dióis.

Tabela 11: Produção dos Dióis (1,3-PD e 2,3-BD) em diferentes sistemas de operação

Trabalho	Operação	Concentração (g.L⁻¹)	Conversão (g.g⁻¹)	Produtividade (g.L⁻¹.h⁻¹)
Park, Rathnasingh, Song (2017)	Batelada Alimentada Laboratório	130	0,65	2,1
Park, Rathnasingh, Song (2017)	Batelada Alimentada Escala piloto	114	0,6	2,2
Neste trabalho Experimento 2	Contínuo RLE D=0,14	27,78	0,7	3,89
Neste trabalho Experimento 2	Contínuo RLE D=0,45	25,41	0,85	11,43

⁴ *In silico* é uma expressão usada para denotar simulações computacionais que modelam um processo natural ou de laboratório ou para indicar algo ocorrido, em ou através de, uma simulação computacional.

Zhao *et al.* (2006) utilizou um reator de coluna de leito fixo para avaliar a conversão contínua de glicerol em 1,3-PD, ácido acético e etanol, não apresentando dados para 2,3-BD. O microrganismo utilizado foi *K. pneumoniae* imobilizada em microcápsulas de sulfato de sódio celulose/cloreto de poli-dimetil-dialil-amônio. As concentrações obtidas por esses autores de 1,3-PD, EtOH e ácido acético foram de 13,60, 2,22 e 1,87 g.L⁻¹ respectivamente. Os resultados de concentração, conversão e produtividade de 1,3-PD foram comparados com o do experimento 1 por ter uma taxa de diluição muito próxima a dos autores e seguem na Tabela 12.

Tabela 12: Reatores de Leito Fixo para produção de 1,3-PD por *K. pneumoniae* imobilizada em diferentes suportes

Trabalhos	Suporte	D (h ⁻¹)	Parâmetros cinéticos	
Zhao <i>et al.</i> (2006)	Microcápsulas de sulfato de sódio celulose/ cloreto de poli-dimetil-dialil-amônio	0,33	Concentração (g.L ⁻¹)	13,60
			Conversão (g.g ⁻¹)	0,36
			Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	4,49
Neste trabalho Experimento 1	<i>Lentikats</i> ®	0,30	Concentração (g.L ⁻¹)	17,13
			Conversão (g.g ⁻¹)	0,48
			Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	5,13

Com as imagens obtidas pela MEV, no experimento 2, onde se fez o reuso dos biocatalisadores e se observou uma grande oscilação entre o glicerol, que com o passar do tempo a capacidade de ser consumido foi diminuindo, e a formação dos produtos, podemos aferir que realmente houve limitações difusionais pela obstrução dos poros. Os parâmetros afetados por essa situação já são bem conhecidos, como retardo do processo, inativação celular, onde as células do centro da matriz serão inibidas e somente as células sob a superfície estarão viáveis (Jahnz *et al.*, 2001; Krasnan *et al.*, 2016).

Diversos trabalhos que usam *LentiKats*® como suporte para imobilização celular, geralmente espécies do gênero *Clostridium*, (Rebroš *et al.*, 2016; Krasnan *et al.*, 2018) ou levedura (Mathew *et al.*, 2013) em sua metodologia antes de executar efetivamente a fermentação e após a imobilização, realizam a propagação celular do

microrganismo nas lentes. Conforme o observado com a MEV e o comportamento que o experimento 2 teve, conclui-se que esse processo intermediário não é vantajoso para microrganismos como *K. pneumoniae* que possuem velocidade de crescimento alta e formação de biofilmes.

Jun *et al.* (2010), em seu trabalho para produção de 1,3-PD a partir de *K. pneumoniae*, em reator de leito empacotado com célula imobilizada em poliuretano hidrofóbico poroso, também relatou problemas de mistura e transferência de massa devido ao aumento de células no suporte, diminuindo a produtividade significativamente com o aumento do tempo. Este autor realizou batelada alimentada repetida com reator tubular. Junto ao reator de coluna havia um STR onde o meio de cultura foi preparado, purgado com nitrogênio e as condições operacionais foram controladas, temperatura, pH e agitação. O reator de coluna era alimentado através de uma bomba com o meio deste tanque, que recirculava de volta para o mesmo. O meio fermentado era removido do fermentador quando se observava altas concentrações de produto e que esta não aumentava mais. Depois era adicionado meio novo para iniciar um novo lote alimentado. Com este sistema as produções máximas de 1,3-PD, 2,3-BD e EtOH foram de aproximadamente 64 g.L⁻¹, 18 g.L⁻¹ e 8 g.L⁻¹, respectivamente em 69 horas na primeira repetição. A produtividade de 1,3-PD aumentou com o número do ciclo (1,06 g.L⁻¹.h⁻¹ versus 1,61 g.L⁻¹.h⁻¹ no primeiro e quarto ciclos, respectivamente). Após o quinto ciclo alimentado em batelada até o quadragésimo sexto, a concentração final global de 1,3-PD foi relativamente estável de 30 a 40 g.L⁻¹, assim como dos demais produtos. A produtividade em 20 a 24 h de fermentação permaneceu estável na faixa de 1,3 a 1,7 g.L⁻¹.h⁻¹, entre os ciclos que tiveram uma duração total de 1460 horas.

7. CONCLUSÃO

A matriz de PVA *LentiKats*® se mostrou eficiente para imobilização celular de *K. pneumoniae* e sua utilização em bioprocessos, porém a grande propagação celular de *K. pneumoniae* na matriz, após longos tempos de cultivo, pode trazer problemas de difusividade para o biocatalisador. O suporte de PVA utilizado na imobilização resistiu a diversas taxas de diluição testadas assim como a faixa de pH entre 5,5-7,2 e as soluções de ajuste de pH.

Nas imagens de MEV além da grande propagação de células no suporte foi observado mudanças na conformação da borda após o reuso da lente. No RLF houve também a mudança na estrutura em alguns casos.

Os resultados obtidos neste trabalho foram similares ou superiores aos da literatura em sistemas similares. Os melhores resultados para produção de 1,3-PD e 2,3-BD foram obtidos com os RLE nos três experimentos realizados. A melhor produtividade para 1,3-PD foi de 8,69 g.L⁻¹.h⁻¹, em uma D=0,45 h⁻¹, no experimento 2. Para 2,3-BD foi no experimento 1 com 2,99 g.L⁻¹.h⁻¹ em uma D=0,30 h⁻¹.

Há um grande número de co-produtos que podem ser formados, dependendo das condições de operação utilizadas nos biorreatores para induzir ou favorecer a formação deles. No reator de leito fluidizado com controle de pH em 7,0 a produção, rendimento e produtividade foram menores de 1,3-PD e 2,3-BD em relação aos outros experimentos devido a presença de co-produtos.

O aumento das taxas de diluição pode favorecer ou não a produção de 1,3-PD e 2,3-BD dependendo também das outras condições de operação.

O design dos reatores utilizados, sendo este o primeiro na literatura a testar *LentiKats*® com *K. pneumoniae*, necessita de melhoramento diante dos problemas operacionais constatados.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Otimização de projeto de biorreator baseado nas observações feitas neste trabalho para ter uma melhor operacionalidade

Testar reatores em série para a conversão completa de glicerol residual substrato nos produtos de interesse.

Avaliar o coeficiente de difusividade em diferentes concentrações de imobilização de *K. pneumoniae* BLh-1 em *LentiKats*®.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.N.P - Agência Nacional Do Petróleo, GEB. 2017. **Biocombustíveis**. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis> >. Acesso em: 23 mar. 2019.

A.N.P - Agência Nacional Do Petróleo, GEB. 2019a. **Biodiesel**. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel> >. Acesso em: 23 mar. 2019.

A.N.P - Agência Nacional Do Petróleo, GEB. 2019b. **Informações de mercado**. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado> >. Acesso em: 23 mar. 2019.

A.N.P - Agência Nacional Do Petróleo, GEB. 2019c. **Mapa biodiesel**. Disponível em: < http://www.anp.gov.br/images/PROD_FORN_BIOCOMBUSTIVEIS/Biodiesel/Mapa_Biodiesel-2019.jpg >. Acesso em: 23 mar. 2019.

Barbirato, F; Grivet, JP; Soucaille, P; Bories, A. 1996. 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species. *Appl Environ Microbiol.* 62 (4): 1448-51.

Barbirato, F; Himmi, EH; Conte, T; Bories, A. 1998. 1,3-Propanediol Production by Fermentation: An Interesting Way to Valorize Glycerin from the Ester and Ethanol Industries. *Industrial Crops and Products.* 7: 281-89.

Biebl, H. 2001. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* — batch and continuous culture studies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 27 (1): 18-26.

Celińska, E. 2012. *Klebsiella spp* as a 1, 3-propanediol producer – the metabolic engineering approach. *Critical Reviews in Biotechnology.* 32 (3): 274-88.

Celińska, E; Grajek, W. 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol - Current state and prospects. *Biotechnology Advances.* 27 (6): 715-25.

Chen, X; Zhang, DJ; Qi, WT; Gao, SJ; Xiu, ZL; Xu, P. 2003. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63 (2): 143-6.

Chen, Z; Liu, HJ; Liu, DH. 2009. Regulation of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in *Klebsiella pneumoniae* by overexpression of *dhaT* and *dhaD* genes. *Enzyme and Microbial Technology.* 45 (4): 305-09.

Cheng, K-K; Liu, H-J; Liu, D-H. 2005. Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation. *Biotechnology Letters*. 27 (1): 19-22.

Cheng, KK; Liu, DH; Sun, Y; Liu, WB. 2004. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. *Biotechnology Letters*. 26 (11): 911-5.

Da Cunha, MaA; Converti, A; Dos Santos, JC; Da Silva, SS. 2006. Yeast immobilization in LentiKats (R): a new strategy for xylitol bioproduction from sugarcane bagasse. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 22 (1): 65-72.

Da Silva, GP; Contiero, J; Neto, PMÁ; De Lima, CJB. 2014. 1,3-propanediol: produção, aplicações e potencial biotecnológico. *Química Nova*. 37 (3): 527-34.

Da Silva, GP; Mack, M; Contiero, J. 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. 27 (1): 30-39.

De Souza, EA. 2013. **Produção de 1,3-propanodiol em biorreatores com células imobilizadas de *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 utilizando glicerol residual proveniente da produção de biodiesel.** . Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - UFRGS, Porto Alegre.

De Souza, EA; Rossi, DM; Ayub, MaZ. 2014. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1. *Renewable Energy*. 72: 253-57.

Dolejš, I; Krasňan, V; Stloukal, R; Rosenberg, M; Rebroš, M. 2014. Butanol production by immobilised *Clostridium acetobutylicum* in repeated batch, fed-batch, and continuous modes of fermentation. *Bioresource Technology*. 169: 723-30.

Doran, P. 1998. **Principios de ingeniería de los bioprocesos**, ACRIBIA S.A. Zaragoza. p. ISBN 84-200-0853-2.

Dupont Tate & Lyle Bio Products Company, L. 2018. Disponível em: < <http://duponttateandlyle.com/zemea> >. Acesso em: 23 mar. 2019.

Durieux, A; Nicolay, X; Simon, JP. 2000. Continuous malolactic fermentation by *Oenococcus Oeni* entrapped in LentiKats. *Biotechnology Letters*. 22 (21): 1679-84.

Forage, RG; Lin, EC. 1982. DHA system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *Journal of Bacteriology*. 151 (2): 591.

Gabardo, S; Pereira, GF; Klein, MP; Rech, R; Hertz, PF; Ayub, MaZ. 2016. Dynamics of yeast immobilized-cell fluidized-bed bioreactors systems in ethanol fermentation from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39 (1): 141-50.

Gabardo, S; Pereira, GF; Rech, R; Ayub, MaZ. 2015. The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 42 (9): 1243-53.

Gabardo, S; Rech, R; Rosa, CA; Ayub, MaZ. 2014. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renewable Energy*. 69: 89-96.

Gonçalves, BRL; Perez, L; Ângelo, ACD. 2009. Glicerol: uma inovadora fonte de energia proveniente da produção de biodiesel. 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo - Brasil, may 20th-22nd 2009.

Gonzalez-Pajuelo, M; Andrade, JC; Vasconcelos, I. 2004. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 31 (9): 442-6.

González-Pajuelo, M; Andrade, JC; Vasconcelos, I. 2005. Production of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32 (9): 391-96.

Guisan, JM. 2006. **Methods in Biotechnology**, 2, Humana Press Inc. Nova Jersey. p. ISBN 1-59745-053-7.

Holt, JGEA. 2000. **Bergeys's Manual of Determinative Bacteriology**, 9th, Lippincott Williams&Wilkins Philadelphia. 787 p.

Huang, H; Gong, CS; Tsao, GT. 2002. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98: 687-98.

I.U.P.A.C. 2014. **Compendium of chemical terminology**, 2nd, Blackwell Scientific Publications 1622 p.

Jahnz, U; Wittlich, P; Prüsse, U; Vorlop, K-D. 2001. New matrices and Bioencapsulation process. In: HOFMAN, M , THONART, P (Eds.). **Engineering and Manufacturing for Biotechnology**. Kluwer Academic Netherlands. v.4 p.293-307. (Focus on Biotechnology). ISBN 978-0-306-46889-1.

Ji, X; Huang, H; Ouyang, P. 2011. Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. *Biotechnol Adv.* 29: 351-64.

Ji, XJ; Huang, H; Zhu, JG; Hu, N; Li, S. 2009. Efficient 1,3-propanediol production by fed-batch culture of *Klebsiella pneumoniae*: the role of pH fluctuation. *Appl Biochem Biotechnol.* 159 (3): 605-13.

Jun, S-A; Moon, C; Kang, C-H; Kong, SW; Sang, B-I; Um, Y. 2010. Microbial Fed-batch Production of 1,3-Propanediol Using Raw Glycerol with Suspended and Immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 161 (1): 491-501.

Kim, C; Ainala, SK; Oh, YK; Jeon, BH; Park, S; Kim, JR. 2016. Metabolic flux change in *Klebsiella pneumoniae* L17 by anaerobic respiration in microbial fuel cell. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 21 (2): 250-60.

Kim, MY; Kim, C; Ainala, SK; Bae, H; Jeon, BH; Park, S; Kim, JR. 2019. Metabolic shift of *Klebsiella pneumoniae* L17 by electrode-based electron transfer using glycerol in a microbial fuel cell. *Bioelectrochemistry.* 125: 1-7.

Kosseva, MR; Panesar, PS; Kaur, G; Kennedy, JF. 2009. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules.* 45 (5): 437-47.

Krasnan, V; Plz, M; Marr, AC; Markosova, K; Rosenberg, M; Rebros, M. 2018. Intensified crude glycerol conversion to butanol by immobilized *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical Engineering Journal.* 134: 114-19.

Krasnan, V; Stloukal, R; Rosenberg, M; Rebros, M. 2016. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats (R). *Applied Microbiology and Biotechnology.* 100 (6): 2535-53.

Kumar, V; Park, S. 2018. Potential and limitations of *Klebsiella pneumoniae* as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source. *Biotechnology Advances.* 36 (1): 150-67.

Lentikat's Biotechnologies. **Lentikat's a.s. Company information.** Disponível em: < http://advancedproductlabs.com/pdf/LentiKats_Company.pps >. Acesso em: 10.03.2019.

Lilly, MD. 1992. The design and operation of biotransformation process. In: VARDAR-SUKAN, F , SUKAN, SS (Eds.). **Recent Advances in Biotechnology.** Kluwer Academic Publisher p.47-68. (E - Applied Sciences). ISBN 978-94-010-5089-0.

Lôbo, IP; Ferreira, SLC; Da Cruz, RS. 2009. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. . Química Nova. 32 (6): 1596-608.

Loureiro-Pinto, M; Coca, M; Gonzalez-Benito, G; Lucas, S; Garcia-Cubero, MT. 2017. Continuous Bioproduction of 1,3-propanediol from biodiesel raw glycerol: operation with free and immobilized cells of *Clostridium butyricum* DSM 10702. Canadian Journal of Chemical Engineering. 95 (5): 819-26.

Ma, BB; Xu, XL; Zhang, GL; Wang, LW; Wu, M; Li, CJaB; Biotechnology. 2009. Microbial Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li under Different Aeration Strategies. 152 (1): 127-34.

Ma, CQ; Wang, AL; Qin, JY; Li, LX; Ai, XL; Jiang, TY; Tang, HZ; Xu, P. 2009. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. Applied Microbiology and Biotechnology. 82 (1): 49-57.

Mathew, AK; Crook, M; Chaney, K; Humphries, AC. 2013. Comparison of entrapment and biofilm mode of immobilisation for bioethanol production from oilseed rape straw using *Saccharomyces cerevisiae* cells. Biomass and Bioenergy. 52: 1-7.

Mathew, AK; Crook, M; Chaney, K; Humphries, AC. 2014. Continuous bioethanol production from oilseed rape straw hydrolysate using immobilised *Saccharomyces cerevisiae* cells. Bioresource Technology. 154: 248-53.

Morcelli, A; Rech, R; Klafke, A; Pelegri, R; Ayub, MaZ. 2018. Exponential Fed-Batch Cultures of *Klebsiella pneumoniae* under Anaerobiosis Using Raw Glycerol as a Substrate to Obtain Value-Added Bioproducts. Journal of the Brazilian Chemical Society. 29: 2278-86.

Mota, CJA; Da Silva, CXA; Gonçalves, VLC. 2009. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da Glicerina de produção de biodiesel. Química Nova. 32 (3): 639-48.

Nedovic, VA; Obradovic, B; Leskosek-Cukalovic, I; Vunjak-Novakovic, G. 2001. Immobilized yeast bioreactor systems for brewing -Recent Achievements. In: HOFMAN, M , THONART, P (Eds.). **Engineering and Manufacturing for Biotechnology**. Kluwer Academic Publishers Netherlands. v.4 p.277-92. (Focus on Biotechnology). ISBN 0-30646889-1.

Obradovic, B; Nedovic, V; Branko, B; Willaert, R; Vunjak-Novakovic, G. 2004. Immobilised Cell Bioreactors. In: NEDOVIC, V , WILLAERT, R (Eds.). **Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology**. Kluwer Academic Publisher 8A p.411-36. (Focus on Biotechnology).

Pan, D-T; Wang, X-D; Shi, H-Y; Yuan, D-C; Xiu, Z-LJB; Engineering, B. 2018. Dynamic flux balance analysis for microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. 41 (12): 1793-805.

Papanikolaou, S; Fakas, S; Fick, M; Chevalot, I; Galiotou-Panayotou, M; Komaitis, M; Marc, I; Aggelis, G. 2008. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. Biomass and Bioenergy. 32 (1): 60-71.

Park, JM; Rathnasingh, C; Song, H. 2017. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* based on in silico analysis and its pilot-scale application for 1,3-propanediol and 2,3-butanediol co-production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 44 (3): 431-41.

Rathnasingh, C; Park, JM; Kim, DK; Song, H; Chang, YK. 2016. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* and in silico investigation for enhanced 2,3-butanediol production. Biotechnology Letters. 38 (6): 975-82.

Rebroš, M; Dolejš, I; Stloukal, R; Rosenberg, M. 2016. Butyric acid production with *Clostridium tyrobutyricum* immobilised to PVA gel. Process Biochemistry. 51 (6): 704-08.

Rebroš, M; Rosenberg, M; Mlichová, Z; Křištofiková, LU; Paluch, M. 2006. A simple entrapment of glucoamylase into LentiKats® as an efficient catalyst for maltodextrin hydrolysis. Enzyme and Microbial Technology. 39 (4): 800-04.

Ripoll, V; De Vicente, G; Moran, B; Rojas, A; Segarra, S; Montesinos, A; Tortajada, M; Ramon, D; Ladero, M; Santos, VE. 2016. Novel biocatalysts for glycerol conversion into 2,3-butanediol. Process Biochemistry. 51 (6): 740-48.

Rivaldi, J; Sarrouh, B; Fiorilo, R; Silva, S. 2009. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. (37): 44-51.

Rosenberg, M; Rebroš, M; Křištofiková, L; Malátová, K. 2005. High Temperature Lactic Acid Production by *Bacillus coagulans* Immobilized in LentiKats. Biotechnology Letters. 27 (23): 1943-47.

Rossi, DM; Da Costa, JB; De Souza, EA; Peralba, MDCR; Ayub, MaZ. 2012. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. Renewable Energy. 39 (1): 223-27.

Rossi, DM; Da Costa, JB; De Souza, EA; Peralba, MDCR; Samios, D; Ayub, MaZ. 2011. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36 (8): 4814-19.

Rossi, DM; De Souza, EA; Ayub, MaZ. 2013. 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*. 169 (6): 1952-64.

Rossi, DM; De Souza, EA; Flôres, SH; Ayub, MaZ. 2013. Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Renewable Energy*. 55: 404-09.

Schenk Mayerová, A; Bučko, M; Gemeiner, P; Treľová, D; Lacík, I; Chorvát, D; Ačaj, P; Polakovič, M; Lipták, L; Rebroš, M; Rosenberg, M; Štefuca, V; Neděla, V; Tihlaříková, E. 2014. Physical and Bioengineering Properties of Polyvinyl Alcohol Lens-Shaped Particles Versus Spherical Polyelectrolyte Complex Microcapsules as Immobilisation Matrices for a Whole-Cell Baeyer–Villiger Monooxygenase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 174 (5): 1834-49.

Schmidell, W; Lima, UDA; Aquarone, E; Borzani, W. 2001. **Biotechnologia Industrial**, Edgard Blücher LTDA São Paulo. p.

Sun, Y-Q; Shen, J-T; Yan, L; Zhou, J-J; Jiang, L-L; Chen, Y; Yuan, J-L; Feng, E; Xiu, Z-L. 2018. Advances in bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol: Prospects and challenges. *Process Biochemistry*. 71: 134-46.

Varrone, C; Floriotis, G; Heggset, TMB; Le, SB; Markussen, S; Skiadas, IV; Gavala, HN. 2017. Continuous fermentation and kinetic experiments for the conversion of crude glycerol derived from second-generation biodiesel into 1,3 propanediol and butyric acid. *Biochemical Engineering Journal*. 128: 149-61.

Verbelen, PJ; De Schutter, DP; Delvaux, F; Verstrepen, KJ; Delvaux, FR. 2006. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*. 28 (19): 1515-25.

Wang, Y; Teng, H; Xiu, ZJJOIM; *Biotechnology*. 2011. Effect of aeration strategy on the metabolic flux of *Klebsiella pneumoniae* producing 1,3-propanediol in continuous cultures at different glycerol concentrations. 38 (6): 705-15.

Yang, X; Choi, HS; Lee, JH; Lee, SK; Han, SO; Park, C; Kim, SW. 2018. Improved production of 1,3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* in fed-batch fermentation. *Chemical Engineering Journal*. 349: 25-36.

Yu, EKC; Saddler, JN. 1983. Fed-batch approach to production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate concentrations. Applied and Environmental Microbiology. 46 (3): 630-35.

Zeng, AP; Ross, A; Biebl, H; Tag, C; Gunzel, B; Deckwer, WD. 1994. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. Biotechnol Bioeng. 44 (8): 902-11.

Zhang, G; Ma, B; Xu, X; Li, C; Wang, L. 2007. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. Biochemical Engineering Journal. 37 (3): 256-60.

Zhang, Y; Li, Y; Du, C; Liu, M; Cao, ZA. 2006. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: A key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. Metab Eng. 8 (6): 578-86.

Zhao, Y-N; Chen, G; Yao, S-J. 2006. **Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae***, 93-99 p.

Zong, H; Liu, X; Chen, W; Zhuge, B; Sun, J. 2017. Construction of glycerol synthesis pathway in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion of glucose into 1,3-propanediol. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 22 (5): 549-55.

10. APÊNDICES

Este apêndice abrange resultados não apresentados no restante do trabalho que compreende a uma parte experimental preliminar que se fez necessária, mas que não era um dos objetivos do projeto.

Primeiramente para este estudo foi necessário a recuperação do microrganismo. Dentre as tentativas um contaminante cresceu junto a placa com o microrganismo de interesse. Uma repicagem por esgotamento foi realizada afim de separar a *K. pneumoniae* BLh-1 do contaminante. Para certificação foi realizado testes bioquímicos, cujo os resultados se encontram na Tabela 13 e também para se ter confirmação da espécie, foi realizado o teste de identificação por Maldi-TOF-MS para a linhagem *K. pneumoniae* BLh-1 recuperada do estoque em Glicerol e Liofilizada.

Tabela 13: Resultados dos Testes bioquímicos

	SIM			VM	VP	Citrato	TSI	Ureia
	H ₂ S	Indol	Motilidade					
Estoque	-	-	-	-	+	-	AC/AC+GAS	+
Liofilizado	-	-	-	-	+	+	AC/AC-GAS	+

- negativo
 + positivo
 AC produção de ácido
 +GAS produção de gás
 -GAS sem produção de gás

O teste de identificação por Maldi-TOF-MS foi realizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS. Uma placa de LB contendo o recuperado com 24 horas de crescimento a 37 °C foi usada para esta análise. O equipamento utilizado foi o Maldi-TOF-MS 4.0 *Microflex Biotyper* (Bruker). O método utilizado foi o de inserção direta da colônia e a análise foi realizada pela técnica responsável pelo equipamento conforme protocolo descrito no procedimento operacional padrão. A identificação por este método se dá pela comparação de proteínas ribossomais, que são altamente preservadas entre as espécies, da amostra com as do banco de dados do equipamento gerando um *score value* que diz a similaridade com gêneros e espécies de microrganismos. Os significados dos valores de pontuação seguem no anexo em “*Meaning of Score Values (Standard Sample)*” assim como os valores

obtidos de similaridade em “*Result overview*” que apresentou alta probabilidade para a espécie de *Klebsiella pneumoniae*.

11. ANEXOS

Em anexo a este trabalho se encontram o projeto do biorreator utilizado e os laudos com os resultados obtidos pela análise de Maldi-TOF-MS.

ANEXO 1

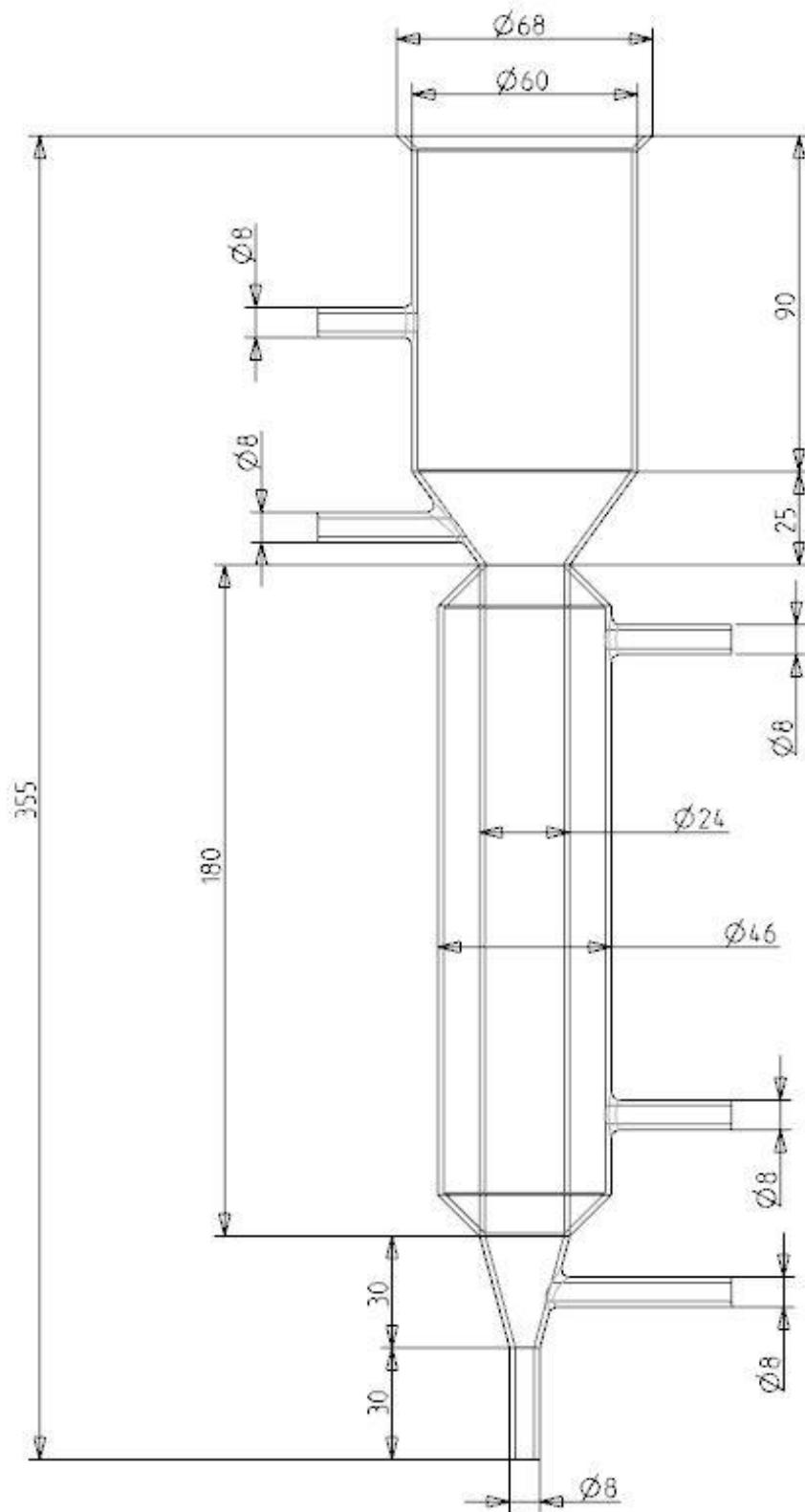


Figura 28: Projeto biorreator de coluna de vidro



MALDI Biotyper Classification Results

Project Info:

Project Name: **171031-1046-1012111**
 Project Description:
 Project Owner: Admin@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2017-10-31T10:51:52.055
 Project Analyte Count: 4
 Project Type: Development
 QC: not present
 QC Position:

Result Overview

[Organism names which are in blue and underlined are linked to the matching hint table below.](#)

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>D11</u> (+++)(B)	L	Klebsiella pneumoniae	<u>2.387</u>	Klebsiella pneumoniae	<u>2.386</u>
<u>D12</u> (+++)(B)	L	Klebsiella pneumoniae	<u>2.503</u>	Klebsiella pneumoniae	<u>2.472</u>
<u>E1</u> (+++)(B)	E	Klebsiella pneumoniae	<u>2.364</u>	Klebsiella pneumoniae	<u>2.345</u>
<u>E2</u> (+++)(B)	E	Klebsiella pneumoniae	<u>2.383</u>	Klebsiella pneumoniae	<u>2.358</u>

Matching Hints

Matched Pattern	Comment
------------------------	----------------

Meaning of Score Values (Standard Sample)

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

Analyte1

Analyte Name: D11
 Analyte Description:
 Analyte ID: L
 Analyte Creation Date/Time: 2017-10-31T10:51:52.075
 Analyte Type: Standard sample
 Applied MSP Library(ies):
 Applied Taxonomy Tree: Projects, Bruker Taxonomy, Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Klebsiella pneumoniae 37585 PFM	2.387	573
2 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 9295_1 CHB	2.386	72407
3 (+++)	Klebsiella pneumoniae RV_BA_03_B LBK	2.373	573
4 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM 30104T HAM	2.352	72407
5 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T DSM	2.34	574
6 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM 30104T_QC DSM	2.313	72407
7 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T HAM	2.312	574
8 (++)	Klebsiella pneumoniae 37595 PFM	2.241	573
9 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis DSM 16231T HAM	2.164	39831
10 (++)	Klebsiella variicola 150416_01 BRUS	2.09	244366

Analyte2

Analyte Name: D12
 Analyte Description:
 Analyte ID: L
 Analyte Creation Date/Time: 2017-10-31T10:51:52.078
 Analyte Type: Standard sample
 Applied MSP Library(ies):
 Applied Taxonomy Tree: Projects, Bruker Taxonomy, Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T DSM	2.503	574
2 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 9295_1 CHB	2.472	72407
3 (+++)	Klebsiella pneumoniae 37585 PFM	2.446	573
4 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM 30104T_QC DSM	2.407	72407
5 (+++)	Klebsiella pneumoniae RV_BA_03_B LBK	2.37	573
6 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM 30104T HAM	2.367	72407
7 (+++)	Klebsiella pneumoniae 37595 PFM	2.311	573
8 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T HAM	2.309	574
9 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis DSM 16231T HAM	2.159	39831
10 (++)	Klebsiella variicola 150519_03 SAH	2.102	244366

Analyte3

Analyte Name: E1
 Analyte Description:
 Analyte ID: E
 Analyte Creation Date/Time: 2017-10-31T10:51:52.080
 Analyte Type: Standard sample
 Applied MSP Library(ies):
 Applied Taxonomy Tree: Projects, Bruker Taxonomy, Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 9295_1 CHB	2.364	72407
2 (+++)	Klebsiella pneumoniae RV_BA_03_B LBK	2.345	573
3 (+++)	Klebsiella pneumoniae 37585 PFM	2.337	573
4 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM 30104T HAM	2.305	72407
5 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T HAM	2.292	574
6 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM 30104T_QC DSM	2.274	72407
7 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T DSM	2.265	574
8 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis DSM 16231T HAM	2.224	39831
9 (++)	Klebsiella pneumoniae 37595 PFM	2.189	573
10 (++)	Klebsiella variicola TC_4131 MCW	2.014	244366

Analyte4

Analyte Name: E2
 Analyte Description:
 Analyte ID: E
 Analyte Creation Date/Time: 2017-10-31T10:51:52.082
 Analyte Type: Standard sample
 Applied MSP Library(ies):
 Applied Taxonomy Tree: Projects, Bruker Taxonomy, Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T DSM	2.383	574
2 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 9295_1 CHB	2.358	72407
3 (+++)	Klebsiella pneumoniae RV_BA_03_B LBK	2.346	573
4 (+++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM 30104T_QC DSM	2.325	72407
5 (+++)	Klebsiella pneumoniae 37585 PFM	2.323	573
6 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM 30104T HAM	2.287	72407
7 (++)	Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T HAM	2.274	574
8 (++)	Klebsiella variicola 150416_01 BRUS	2.159	244366
9 (++)	Klebsiella pneumoniae 37595 PFM	2.139	573
10 (++)	Klebsiella variicola CC_2053 MCW	2.084	244366

