UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Programa de Pós-Graduação de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos
Escola de Química

Tese de Doutorado

PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICERINA POR VIA BIOTECNOLÓGICA

Tatiana Felix Ferreira

RIO DE JANEIRO
MAIO/2014

PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICERINA POR VIA BIOTECNOLÓGICA

Tatiana Felix Ferreira

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadores:
Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
Denise Freire Guimarães Freire, D.Sc.

RIO DE JANEIRO
MAIO/2014

PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICERINA POR VIA BIOTECNOLÓGICA

Tatiana Felix Ferreira

Tese de doutorado submetida ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada por:
Orientador(es):

_____

Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

_____

Prof[a]. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc

Banca Examinadora:

_____

Cláudia Maria Soares Ribeiro, D. Sc.

_____

Érika Christina Ashton Nunes Chrisman, D.Sc.

_____

Maria Alice Gomes de Andrade Lima, D. Sc.

_____

Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Ph.D.

_____

Rodrigo Volcan Almeida, D.Sc.

RIO DE JANEIRO
MAIO/2014

FERREIRA, TATIANA FELIX

Produção de 1,3-propanediol a partir de glicerina por via biotecnológica/ Tatiana Felix Ferreira. – Rio de Janeiro, 2014.

xvii, 134 p, 29,7 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2014.

Orientador(es): Maria Alice Zarur Coelho
Denise Maria Guimarães Freire

1. Glicerina bruta. 2. 1,3-propanediol. 3. *Citrobacter freundii*. 4. Modelo Cibernético.

I. Coelho, Maria Alice Zarur e Freire, Denise Maria Guimarães.

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química.

Dedico esta tese à todos, marido, família e amigos, que me acompanharam e me apoiaram durante toda esse jornada.

"*Se você encontrar um caminho sem obstáculos,*

ele provavelmente não leva a lugar nenhum."

(Frank Clark)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que tem sido um grande companheiro durante toda essa difícil jornada.

Agradeço também aos meus pais e irmãos por todo amor e carinho. A importância da família é inquestionável.

Ao meu marido, pelo incentivo e companheirismo.

Às minhas orientadoras, pela paciência e os conhecimentos a mim transferidos. Eu admiro muito vocês!

Às professoras Maria Helena e Priscilla Amaral, que muito contribuíram para minha formação, com seus ensinamentos e conselhos. Pri, obrigada pela amizade também!

À amiga Roberta, que esteve comigo durante todos esses anos. Obrigada por me aturar, inclusive naqueles dias! Sua companhia foi fundamental para comemorar as vitórias e me fazer esquecer os momentos difíceis.

À amiga Ana Iraidy, pelo incentivo. Mesmo distante sinto sua energia positiva me impulsionando para frente. Você é um exemplo!

Ao grupo BIOSE, Gizele, Kelly, Marcelle, Luana, Patrícia, Bernardo, Roberta, Mariana, Roseli, Fernanda, Ariane, Verônica, Caê, Etel, Evelin, Tamires e todos os alunos de iniciação científica, pela ajuda e amizade. Em especial à Fernanda, que a pouco foi incorporada ao projeto PDO, mas já soma uma grande contribuição.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para o andamento do presente projeto, Diego, Vanessa, Roberto e Pedro. Em especial, ao aluno Pedro que foi mais que um companheiro nos experimentos intermináveis, foi um amigo e muitas vezes segurança ao sairmos tarde do fundão. Essa tese também é sua!

Ao Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteômica (LaMMP) do Instituto de Química da UFRJ, pelo desenvolvimento das cepas modificadas.

Ao CENPES, pelo apoio financeiro e por ceder as cepas de *Lactobacillus brevis* e *Citrobacter freundii* utilizadas nesse trabalho. Em especial à Cláudia Ribeiro, pela contribuição técnica. Agradeço também os funcionários Vanessa, Renato e Milton, que me recebem com frequência sempre disponibilizando a câmara anaeróbia.

Ao professor Carlos André, que prontamente me atendeu quando fui a sua sala tirar dúvidas sobre MATLAB.

À todos que de uma forma ou de outra contribuíram para esse trabalho.

RESUMO

FERREIRA, Tatiana Felix. **Produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerina por via biotecnológica.** Orientadoras: Maria Alice Zarur Coelho e Denise Maria Guimarães Freire. Rio de Janeiro. 2014. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

O 1,3-propanodiol (1,3-PDO) é uma molécula orgânica bifuncional que tem várias propriedades promissoras para reações de síntese, especialmente como monômero para a produção de poliésteres, poliéteres e poliuretanos. No entanto, o alto custo de produção das rotas químicas existentes aliado as exigências ambientais cada vez mais rigorosas têm estimulado empresas a desenvolveram processos biotecnológicos para a produção de 1,3-PDO a partir de matérias-primas renováveis. Neste contexto, o presente trabalho visou a produção de 1,3-PDO a partir de glicerina por via biotecnológica visto que a glicerina é um subproduto da produção de biodiesel gerada em grande quantidade e com baixo valor agregado. Inicialmente, estudou-se a capacidade de conversão de glicerina em 1-3-PDO em escala de *shaker* utilizando 5 diferentes cepas: *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Citrobacter freundii* modificada geneticamente, *Escherichia coli* pBAD e *Escherichia coli* pTRC. Todos os micro organismos foram capazes de converter glicerol em 1,3-PDO, porém a cepa *Citrobacter freundii* ATCC 8090 apresentou maior capacidade de conversão. Sendo assim, estudou-se a produção de 1,3-PDO em biorreator utilizando esta cepa. A produção de 1,3-PDO em anaerobiose por *Citrobacter freundii* ATCC 8090 em biorreator foi inferior a produção obtida em escala de *shaker*. Contudo, em condições de baixa aeração foi possível verificar a produção de 1,3-PDO em vazões de oxigênio superiores aos reportados na literatura. Na condição otimizada, 1,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), a cepa *C. freundii* ATCC 8090 atingiu a produção de 4,55 $g.L^{-1}$, quase quatro vezes maior do que a reportada na literatura para condições de baixa aeração. Utilizou-se, então, a perspectiva cibernética para modelar o metabolismo de *C. freundii* ao utilizar glicerol como substrato sob condição de baixa aeração. O modelo matemático desenvolvido foi implementado em MATLAB 7.12 e valores preditos pelo modelo para o consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e ácido orgânicos são bem próximos aos valores obtidos experimentalmente nas fermentações realizadas, indicando que o modelo desenvolvido é capaz de descrever o metabolização de glicerol por *C. freundii*.

ABSTRACT

FERREIRA, Tatiana Felix. **Production of 1,3-propanediol from glycerine by biotechonological processes.** Advisors: Maria Alice Zarur Coelho and Denise Maria Guimarães Freire. Rio de Janeiro, 2014. D.Sc. Thesis (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

The 1,3-propanediol (1,3-PDO) is a bifunctional organic molecule that has several promising properties for synthesis reactions, especially as monomer for production of polyesters, polyethers and polyurethanes. However, the high production cost of petrochemical routes and the stringent environmental requirements encouraged companies to develop biotechnology processes for 1,3-PDO production from renewable raw materials. In this context, the present work aimed 1,3-PDO production from glycerin by biotechnological routes seeing that glycerin is a byproduct of biodiesel production generated in large quantities and with low value. In the first step, the conversion of glycerol into 1,3-PDO was investigated in shaker scale using 5 different strains: *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Citrobacter freundii* genetically modified, *Escherichia coli* pBAD and *Escherichia coli* pTRC. All microorganisms were able to convert glycerol into 1,3-PDO, however *Citrobacter freundii* strain ATCC 8090 showed higher conversion capacity. Therefore, the 1,3-PDO production in a bioreactor using this strain was studied. The 1,3-PDO production in bioreactor under anaerobiosis conditions by *Citrobacter freundii* ATCC 8090 was lower than obtained in shaker scale. However, under low aeration conditions was possible to verify 1,3-PDO production in higher oxygen flows reported in the literature. In optimized conditions, 1.5 vvm (volume of air per volume of medium per minute), the *C. freundii* ATCC 8090 strain produced 4.55 $g.L^{-1}$, almost four times higher than that reported in the literature for low aeration. It was used the cybernetic perspective to model *C. freundii* metabolism using glycerol as substrate under low aeration condition. The mathematical model was implemented in MATLAB 7.12 and values predicted by the model for consumption of glycerol and organic acids and 1,3 -PDO production are very similar to the experimental values obtained at fermentations, indicating that the model can be used to describe the metabolism of glycerol by *C. freundii*.

ÍNDICE GERAL

I - INTRODUÇÃO 1

I.1 - 1,3-PROPANODIOL 3

I.1.1 - Aplicações 4

I.1.2 – Poli (tereftalato de trimetileno) (PTT) 4

I.1.2.1 – Produção comercial de PTT 6

I.1.3 – Bio-PDO 6

I.2 - PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL 9

I.2.1 – Produção de 1,3-PDO a partir de acroleína 9

I.2.2 – Produção de 1,3-PDO a partir de óxido de etileno (OE) 10

I.2.3 – Produção de 1,3-PDO a partir da fermentação da glicose 11

I.3 – GLICEROL 13

I.3.1 – Biodiesel 13

I.3.2 – Micro organismos capazes de consumir glicerol 15

I.3.2.1 – Produção enzimática de 1,3-propanodiol a partir de glicerol 16

I.4 - PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR FERMENTAÇÃO 17

I.4.1 – Micro organismos produtores de 1,3-propanodiol 18

I.4.2 – Fisiologia de formação do 1,3-propanodiol 18

I.4.3 – *Citrobacter freundii* 20

I.4.3.1 – Morfologia celular 21

I.4.3.2 – Produção de 1,3-propanodiol por *Citrobacter freundii* 21

I.4.4 – *Lactobacillus brevis* 22

I.4.4.1 – Morfologia celular 22

I.4.4.2 – Produção de 1,3-propanodiol por *Lactobacillus brevis* 23

I.4.5 – *Escherichia coli* 24

I.4.5.1 – Morfologia celular 24

I.4.5.2 – Produção de 1,3-propanodiol por *Escherichia coli* 25

I.4.6 – Micro organismos modificados geneticamente 25

I.5 - REDE METABÓLICA 26

I.5.1 - Modelos Matemáticos para descrição de redes metabólicas 27

I.5.2 - Fundamentos da rede metabólica 28

I.5.3 - A abordagem cibernética 29

I.5.3.1 - As variáveis cibernéticas 30

I.5.4 - Rede Metabólica para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol 31

II – OBJETIVO **34**

II.1 – OBJETIVOS DO TRABALHO **34**

III - METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS **36**

III.1 - MATERIAIS **36**
III.2 - EQUIPAMENTOS **36**
III.3 – MICRO ORGANISMOS **36**
III.3.1 - Preservação 37
III.3.2 - Meios de cultivo 37
III.4 – EXPERIMENTOS PRELIMINARES **37**
III.4.1 - Inóculo 37
III.4.2 - Experimentos Preliminares 38
III.4.2.1 - Experimentos com *Citrobacter freundii* ATCC 8090 38
III.4.2.2 - Experimentos com *Lactobacillus brevis* ATCC 367 39
III.4.2.3 - Experimentos com *Citrobacter freundii* modificada 40
III.4.2.4 - Experimentos com *Escherichia coli* modificadas 42
III.5 – EXPERIMENTOS COM *CITROBACTER FREUNDII* ATCC 8090 ..... **43**
III.5.1 – Otimização da concentração de L-cisteína 43
III.5.2 – Estudo da inibição da produção de 1,3-propanodiol 44
III.5.3 – Experimentos em biorreator 46
III.5.4 – Experimentos em agitador rotatório/ biorreator 48
III.5.5 – Experimentos em biorreator: novas estratégias 48
III.5.5.1 – Primeira Estratégia 48
III.5.5.2 – Segunda Estratégia 49
III.5.5.3 – Experimento em microaerofilia 50
III.5.6 – Estudo da produção de 1,3-PDO em microaerofilia 50
III.6 - ESTERILIZAÇÃO **50**
III.7 - MÉTODOS ANALÍTICOS **50**
III.7.1 - Quantificação do Crescimento Celular 51
III.7.2 – Quantificação de 1,3-PDO e co-produtos 54
III.7.3 – Quantificação dos substratos: glicose e glicerol 54
III.8 - ANÁLISE DO MERCADO DE 1,3-PROPANODIOL **54**
III.9 - MODELO CIBERNÉTICO **55**

IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES **58**

IV.1 – EXPERIMENTOS PRELIMINARES 58
IV.1.1 – Experimentos com *Citrobacter freundii* ATCC 8090 58
IV.1.2 – Experimentos com *Lactobacillus brevis* ATCC 367 64
IV.1.3 – Experimentos com cepa de *Citrobacter freundii* modificada 68
IV.1.4 – Experimentos com cepas de *Escherichia coli* modificadas 70
IV.1.5 – Comparando as cepas estudadas 73
IV.2 – EXPERIMENTOS COM *CITROBACTER FREUNDII* ATCC 8090 74
IV.2.1 – Otimização da concentração de L-cisteína 74
IV.2.2 – Estudo da inibição da produção de 1,3-propanodiol 80
IV.2.3 – Experimentos em biorreator 87
IV.2.4 – Experimentos em agitador rotatório/ biorreator 89
IV.2.5 – Experimentos em biorreator: novas estratégias 90
IV.2.5.1 – Primeira estratégia 91
IV.2.5.2 – Segunda estratégia 92
IV.2.5.3 – Experimento em baixa aeração 93
IV.2.6 – Estudo da produção de 1,3-PDO em baixas aerações 94
IV.3 – ANÁLISE DO MERCADO BRASILEIRO DE 1,3-PROPANODIOL 99
IV.4 – MODELO CIBERNÉTICO 102
IV.4.1 – Rede Metabólica 102
IV.4.1.1 – Caminhos metabólicos e suas respectivas enzimas 103
IV.4.1.2 – Taxas específicas 104
IV.4.1.3 – Variáveis cibernéticas: 107
IV.4.2 – Programação 117
IV.4.3 – Resultados 117

V - CONCLUSÕES 125

VI - PUBLICAÇÕES 127

VI.1 - ARTIGOS PUBLICADOS 127
VI.2 - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO 127
VI.3 - TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS 127
VI.4 - RESUMOS PUBLICADOS 128

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 129

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela II.1 – Propriedades físicas do 1,3-propanodiol. 3
Tabela II.2 – Propriedades principais das resinas PET, nylon e PTT (adaptada de SRI Consulting, 2000). 5
Tabela II.3 – Potencial técnico de substituição do PTT (Adaptada de PRO-BIP, 2009). 6
Tabela IV.1 – Meios de cultivo utilizados nos experimentos preliminares com *Citrobacter freundii* ATCC 8090. 39
Tabela IV.2 - Meio de cultivo utilizado nos experimentos preliminares com *Lactobacillus brevis* ATCC 367. 40
Tabela IV.3 – Meios de cultivo utilizados nos experimentos preliminares com *Lactobacillus brevis* ATCC 367. 40
Tabela IV.4 - Meio de cultivo utilizado nos experimentos preliminares com *Escherichia coli* pTrc e pBAD. 43
Tabela IV.5 – Concentrações de cisteína nos diferentes meios de cultivos testados para produção de 1,3-PDO por *Citrobacter freundii* ATCC 8090. 44
Tabela IV.6 – Concentrações de glicerina nos diferentes meios de cultivos testados para produção de 1,3-PDO por *Citrobacter freundii* ATCC 8090. 46
Tabela IV.7 – Meio de cultivo otimizado para produção de 1,3-PDO utilizando *Citrobacter freundii* ATCC 8090. 47
Tabela V.1 – Rendimentos de glicerol em biomassa e nos produtos formados para os experimentos de *C. freundii* ATCC8090 nos Meios 1 e 2. 61
Tabela V.2 – pH inicial e pH final dos experimentos de *C. freundii* ATCC 8090 nos Meios 1 e 2. 62
Tabela V.3 – Comparação entre a produção de biomassa (ΔX), rendimento de glicerol em biomassa ($Y_{biomassa/glicerol}$), concentração final de 1,3-PDO ($[1,3\text{-}PDO]_{final}$), rendimento de glicerol em 1,3-PDO ($Y_{1,3\text{-}PDO/glycerol}$) e produtividade ($Q_{1,3\text{-}PDO}$) para cepa *C. freundii* ATCC 8090 nos meios contendo glicerol P.A. e glicerina bruta. 64
Tabela V.4 – Ácidos orgânicos formados em função do tempo no experimento com *L. brevis* em Meio 4. 65
Tabela V.5 – Comparação entre a produção de biomassa (ΔX), rendimento de glicerol em biomassa ($Y_{biomassa/glicerol}$), concentração final de 1,3-PDO ($[1,3\text{-}PDO]_{final}$) e

rendimento de glicerol em 1,3-PDO ($Y_{1,3\text{-}PDO/glycerol}$) para a cepa *L brevis* ATCC 367 nos meios contendo glicerol P.A. e glicerina bruta. 67
Tabela V.6 – Comparando os valores da concentração de 1,3-PDO após 24 horas ($[1,3\text{-}PDO]_{24h}$), rendimento de glicerol em 1,3-PDO ($Y_{1,3\text{-}PDO/Glicerol}$), produtividade de 1,3-PDO ($Q_{1,3\text{-}PDO}$) e produtividade específica de 1,3-PDO ($q_{1,3\text{-}PDO}$) entre as cepas estudadas. 74
Tabela V.5 – Concentração de L-cisteína utilizada, produção de 1,3-PDO, rendimento de glicerol em 1,3-PDO e pH final dos diferentes experimentos com *Citrobacter freundii* ATCC8090. 79
Tabela V.6 – Conversão de glicerol em biomassa ($Y_{Biomassa/Glicerol}$), 1,3-PDO ($Y_{1,3\text{-}PDO/Glicerol}$), acetato ($Y_{Acetato/Glicerol}$) e o pH obtidos após 24 horas nos diferentes experimentos realizados. 84
Tabela V.7 – Razão entre o rendimento de glicerol em 1,3-PDO e o rendimento de glicerol em acetato obtida nos diferentes experimentos realizados. 85
Tabela V.8 – Rendimento de glicerol em 1,3-PDO, em acetato, em biomassa e em ácido succínico nos diferentes experimentos realizados. 98
Tabela V.9 – Metabólitos extracelulares e intracelulares da rede metabólica de *C. freundii*. 103
Tabela V.10 – Parâmetros utilizados no modelo matemático implementado em MATLAB 7.12. 118
Tabela V.11 – Valores preditos pelo modelo *versus* valores experimentais para a condição de 1,0 vvm. 121
Tabela V.12 – Valores preditos pelo modelo *versus* valores experimentais para a condição de 1,5 vvm. 124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1- Fórmula estrutural do composto 1,3-propanodiol. 3
Figura II.2 – Principais reações envolvidas na formação do PTT (modificado de SRI Consulting, 2000). 8
Figura II.3 – Rota química para produção de 1,3-PDO a partir de acroleína (adaptado de SRI *Consulting*, 2000). 10
Figura II.4 – Rota química para produção de 1,3-PDO a partir de OE (adaptado de SRI *Consulting*, 2000). 11
Figura II.5 – Rota fermentativa de produção de 1,3-PDO a partir de glicose (modificado de SRI Consulting, 2000). 12
Figura II.6 – Fórmula estrutural do glicerol. 13
Figura II.7 – Equação global de transestereficação de triglicerídeos. 14
Figura II.8 – Rota metabólica de produção de 1,3-PDO a partir de glicerol. 17
Figura II.9 – Vias bioquímicas de fermentação do glicerol (Biebl *et al*., 1999). 19
Figura II.10 – Representação esquemática de uma célula como um sistema cibernético (Dhurjati *et al.* 1985). 30
Figura II.11 – Rede metabólica para consumo do glicerol (Saxena et al., 2009). 32
Figura IV.1 - Plasmídeo pACYCA, contendo o gene *FDH1*. 42
Figura IV.2 – Biorretor Tecnal modelo TecBio 1,5 utilizado nos experimentos. 48
Figura IV.3 – Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Citrobacter freundii* ATCC 8090 através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *BELL* SP 2000UV. 51
Figura IV.4 – Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Lactobacillus brevis* ATCC 367 através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *BELL* SP 2000UV. 52
Figura IV.5 – Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Citrobacter freundii* modificada através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *BELL* SP 2000UV. 52
Figura IV.6 – Curva de peso para quantificação do crescimento celular de *Escherichia coli* pTrc através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *BELL* SP 2000UV. 53
Figura IV.7 – Curva de peso para quantificação do crescimento celular de *Escherichia coli* pBAD através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *BELL* SP 2000UV. 53

Figura V.1 - Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e 2,3-BDO do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em Meio 1.....59
Figura V.2 - Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, 2,3-BDO, ácido oxálico e ácido cítrico do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em Meio 2. 60
Figura V.3 - Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, ácido acético e ácido succínico do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em contendo glicerina bruta. 63
Figura V.4 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, consumo de glicose e produção de 1,3-PDO e 2,3-BDO do experimento com *L. brevis* ATCC 367 em meio formulado. 65
Figura V.5 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, consumo de glicose e produção de 1,3-PDO e 2,3-BDO do experimento com *L. brevis* ATCC 8090 em meio contendo glicerol P.A. 67
Figura V.6 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, consumo de glicose e produção de 1,3-PDO do experimento com *L. brevis* ATCC 367 em meio contendo glicerina bruta. 68
Figura V.7 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* modificada em meio contendo glicerina bruta na ausência da antibiótico. 69
Figura V.8 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, consumo de glicose e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* modificada em meio contendo glicerina bruta e antibiótico. 70
Figura V.9 – Crescimento celular das cepas pBAD e pTrc em meio contendo 30 $g.L^{-1}$ de glicerol. 71
Figura V.10 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO do experimento com *E. coli* pBAD crescendo em anaerobiose em meio contendo 10 $g.L^{-1}$ glicerol. 72
Figura V.11 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO do experimento com *E. coli* pBAD crescendo em aerobiose em meio contendo 10 $g.L^{-1}$ glicerol. 73
Figura V.12 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 0,05 $g.L^{-1}$ de cisteína. 75

Figura V.13 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 0,10 g.L^{-1} de cisteína. 76
Figura V.14 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 0,15 g.L^{-1} de cisteína. 77
Figura V.15 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 0,20 g.L^{-1} de cisteína. 78
Figura V.16 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 0,25 g.L^{-1} de cisteína. 79
Figura V.17 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 10,0 g.L^{-1} de glicerina bruta. 81
Figura V.18 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 20,0 g.L^{-1} de glicerina bruta. 82
Figura V.19 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 30,0 g.L^{-1} de glicerina bruta. 83
Figura V.20 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 40,0 g.L^{-1} de glicerina bruta. 84
Figura V.21 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator em condições anaeróbias. 88
Figura V.22 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator com duração de 48 horas. 90
Figura V.23 – Frascos erlenmeyer utilizados nos experimentos (A) vedados com rolhas de plásticos adaptadas com mangueiras e (B) vedados com rolhas de plástico sem as mangueiras. 91
Figura V.24 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e acetato e pH no experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator. 93

Figura V.25 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e acetato e pH do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator com 1,2 vvm. 94
Figura V.26 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, acetato e ácido succínico do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator com 1,0 vvm. 95
Figura V.27 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, acetato e ácido succínico do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator com 1,5 vvm. 96
Figura V.28 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, acetato e ácido succínico do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator com 2,0 vvm. 97
Figura V.29 – Evolução da quantidade importada de PDO e os dispêndios com a importação no período de 1999 a 2012. Elaboração própria. Dados obtidos de http://aliceweb2.mdic.gov.br. 100
Figura V.30 – Rede metabólica para *C. freundii* crescendo em glicerol. 103
Figura V.31 – Valores preditos pelo modelo para a concentração de glicerol (A), biomassa (B), 1,3-PDO (C), ácido succínico (D), lactato (E) e acetato (F) para a condição de 1,0 vvm. 120
Figura V.32 – Valores preditos pelo modelo para a concentração de glicerol (A), biomassa (B), 1,3-PDO (C), ácido succínico (D), lactato (E) e acetato (F) para a condição de 1,5 vvm. 123

I- INTRODUÇÃO

O 1,3-propanodiol (1,3-PDO) é um diol contendo três átomos de carbono em sua estrutura. Por ser uma molécula orgânica bifuncional, o 1,3-PDO tem várias propriedades promissoras para reações de síntese, especialmente como monômero para a produção de poliésteres, poliéteres e poliuretanos. No entanto, devido ao alto custo de produção, o seu uso foi fortemente limitado, sendo basicamente utilizado na produção de polímeros especiais que atendem a pequenos mercados. Esta situação começou a mudar quando as empresas Shell e DuPont, anunciaram a comercialização de um novo poliéster a base de PDO, o poli (tereftalato de trimetileno) (PTT). Este copolímero é produto da condensação entre o 1,3-propanodiol e o ácido tereftálico, apresentando excelentes propriedades, sendo assim, adequado para aplicações em fibras e produtos têxteis. Além disso, é um plástico muito promissor, tendo capacidade de substituir o tradicional poli (tereftalato de etileno) (PET) e poli (tereftalato de butileno) (PBT) (Zeng & Biebl, 2002). O 1,3-PDO possui também uma série de outras aplicações (Barbirato *et al.*, 1998).

Sendo assim, a produção mundial de 1,3-PDO vem crescendo muito nos últimos anos. Atualmente, existem três rotas comerciais para produção de 1,3-propanodiol: a hidratação de acroleína seguido por hidrogenação; a hidroformilação e hidrogenação do óxido de etileno; e um bioprocesso a partir de glicose. O primeiro processo, utilizado pela DuPont, usa o método convencional de preparação partindo da acroleína, que é obtida por oxidação catalítica do propileno. A acroleína é hidratada a temperatura moderada e pressão até 3-hidroxipropionaldeído, que, na segunda reação, é hidrogenado a 1,3-propanodiol por um catalisador de rubídio sob alta pressão (90 bar). O segundo processo, utilizado pela Shell, inicia-se com o óxido de etileno, que é preparado através da oxidação do etileno. O óxido de etileno é transformado juntamente com gás de síntese em 3-hidroxipropionaldeído através de um processo de hidroformilação, mas para esta reação é necessária elevada pressão (150 bar). O 3-hidroxipropionaldeído é extraído da fase orgânica com água e hidrogenado utilizando níquel como catalisador, novamente sob alta pressão (Zeng & Biebl, 2002).

No primeiro caso, o rendimento não excede 40% e no segundo caso, é de cerca de 80%. Os principais problemas envolvidos nestes processos convencionais são a elevada pressão aplicada na hidroformilação e hidrogenação, juntamente com a alta temperatura, o uso de catalisador de elevado custo e a liberação de intermediários tóxicos. Sendo assim,

muita atenção tem sido dada a rota microbiana de obtenção de 1,3-PDO, seja a partir de glicose ou de glicerol (Saxena *et al.*, 2009)

O processo biotecnológico desenvolvido pela DuPont começou a operar em 2006 e consiste na produção de 1,3-PDO a partir de glicose de milho utilizando uma cepa de *Escherichia coli* modificada geneticamente. Esse novo processo não só produz 1,3-PDO a partir de matéria-prima renovável como também consome 40% menos energia que o processo inicialmente utilizado pela empresa DuPont que utilizava acroleína, um intermediário extremamente tóxico.

Portanto, é importante olhar para todos os aspectos envolvidos na produção biotecnológica de 1,3-PDO. Há muitas questões essenciais como barreiras técnológicas e desafios econômicos que precisam ser abordados na produção de intermediários de base biológica. O maior obstáculo é o baixo rendimento e produtividade, principalmente porque os bioprocessos são realizados a temperatura fisiológica, pressão atmosférica e normalmente operados em batelada. Um modelo mais viável economicamente, no entanto, deve considerar o uso de subprodutos ou resíduos gerados durante a produção dos biocombustíveis, como as correntes ricas em glicerol, visto que o glicerol bruto obtido como subproduto possui baixíssimo valor de mercado (Saxena *et al.*, 2009).

Aliado a este cenário, a demanda por fontes de energia está aumentando juntamente com o aumento da população mundial. O mercado de biodiesel global está estimado a atingir 140 bilhões de litros em 2016. Sendo assim, a bioconversão do glicerol bruto obtido na produção de biodiesel parece ser realmente uma alternativa interessante. Um exemplo de aplicação para a conversão biológica do glicerol é a produção de 1,3-PDO, que em seguida, é utilizado para produzir poli(tereftalato de trimetileno) (PTT). Em primeiro lugar, porque gera matéria-prima para a produção de polímeros biodegradáveis e deste modo beneficia diretamente o meio ambiente. Além disso, a ampla aplicação de polímeros biodegradáveis promove o uso de biodiesel e reduz a dependência de petróleo (Drozdzynska *et al.*, 2011).

Dentro deste contexto, o presente trabalho visou o estudo da produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerina, proveniente da produção de biodiesel, por via biotecnológica a partir de alguns microrganismos produtores. Dentre os microrganismos estudados a cepa de *Citrobacter freundii* foi escolhida para o aprofundamento deste estudo e o desenvolvimento de um modelo matemático para descrever a sua rede metabólica. Esta escolha baseou-se na sua excelente capacidade de metabolização da glicerina bruta e escassez na literatura do uso desta mesma espécie utilizando um resíduo como substrato para produção de 1,3-PDO.

Revisão Bibliográfica

I.1- 1,3-Propanodiol

O 1,3-propandiol, também conhecido como trimetilenoglicol ou 1,3-di-hidroxipropano, é um diol contendo três átomos de carbono em sua estrutura como mostra a Figura II.1.

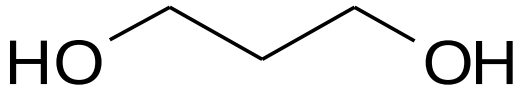

Figura I.1- Fórmula estrutural do composto 1,3-propanodiol.

Em condições normais de temperatura e pressão, o 1,3-propandiol é um líquido viscoso, transparente e incolor, miscível com água e com etanol. Suas principais propriedades físicas se encontram na Tabela II.1.

Tabela I.1 – Propriedades físicas do 1,3-propanodiol.

Fórmula Molecular	$C_3H_8O_2$
Massa Molar	76,10 g/mol
Ponto de fusão	26,7 °C
Ponto de ebulição	214,4°C
Índice de refração, 25°C	1,4386
Densidade, 20°C	1,0526 g/cm^3
Calor Específico	0,53 ca/g.°C
Viscosidade, 20°C	52 mPa.s
Tensão superficial, 20°C	46,2 dinas/cm
Ponto de fulgor	129°C
Temperatura de auto-ignição	405°C
Pressão de vapor	0,08 mmHg

Fonte: SRI *Consulting* (2000) e *DuPont Tate & Lyle BioProducts*.

I.1.1 - Aplicações

Por ser uma molécula orgânica bifuncional, 1,3-propanodiol (1,3-PDO) tem várias propriedades promissoras para utilização em reações de síntese, especialmente como monômero para a produção de poliésteres, poliéteres e poliuretanos. No entanto, devido ao alto custo de produção, o seu uso foi fortemente limitado. Por muito tempo, o 1,3-PDO só encontrou aplicações como solvente e para a produção de dioxanos e polímeros especiais que atendiam a pequenos mercados. Esta situação começou a mudar por volta de 1995-1996, quando as empresas Shell e DuPont, anunciaram a comercialização de um novo poliéster a base de 1,3-PDO, o poli (tereftalato de trimetileno), denominado PTT (Shell) ou 3GT (DuPont). Este copolímero é produto da condensação entre o 1,3-propanodiol e o ácido tereftálico, apresentando excelentes propriedades, tais como boa elasticidade, elevada resistência, baixa geração de eletricidade estática, etc, e é particularmente adequado para aplicações em fibras e produtos têxteis.

Neste contexto, o 1,3-PDO que é tradicionalmente conhecido como uma especialidade química encontra-se passando por um momento de transição para uma *commodity* (Saxena *et al.*, 2009), já que para o crescimento da produção de PTT está associado a ampliação da escala de produção de 1,3-PDO aliada a redução do seu custo de produção.

O 1,3-PDO possui também uma série de outras aplicações interessantes, como por exemplo, aditivos para solvente (melhoria de propriedades), adesivos, laminados, resinas (viscosidade intrínseca baixa, menos solvente para o revestimento), detergentes (prevenir separação de fases e perda de atividade enzimática) e cosméticos (de longa duração e resíduos não aderentes). Aplicações mais incomuns para o diol em questão incluem produção de biocidas para desinfecção industrial e tratamento de água de circulação industrial, entre outros (Zeng & Biebl, 2002).

I.1.2 – Poli (tereftalato de trimetileno) (PTT)

. É um poliéster aromático linear, formado por meio de reações de condensação entre o 1,3-propanodiol e o ácido tereftálico ou dimetil tereftalado. O PTT é um copolímero termoplástico que

combina a rigidez, força e resistência térmica das resinas poli(tereftalado de etileno) (PET) com a boa processabilidade das resinas poli(tereftalato de butileno) (PBT).

Atualmente, a fibra de tapete de nylon é conhecida por sua resistência, mas ela não aceita uma grande variedade de corantes, limitando as cores que podem ser fornecidas. Além disso, tende a gerar cargas elétricas estáticas. A fibra de tapete de PET pode ser facilmente tingida, mas não tem a durabilidade nem a resistência do nylon. Por sua vez, as fibras de PTT têm a receptividade à corantes da resina PET e também é resistente à geração de cargas elétricas estáticas. Além disso, as fibras de PTT apresentam resistência e durabilidade equivalentes às do nylon (SRI *Consulting*, 2000). A Tabela II.2 resume as propriedades principais das resinas PET, nylon e PTT.

Tabela I.2 – Propriedades principais das resinas PET, nylon e PTT (adaptada de SRI Consulting, 2000).

Propriedades	PET	Nylon	PTT
Elasticidade	Razoável	Excelente	Excelente
Tingimento	Bom	Ruim*	Muito Bom
Resistência a sujar/manchar	Excelente	Ruim	Excelente
Cargas estáticas	Baixa	Alta	Baixa
Resistência a abrasão	Excelente	Excelente	Excelente

* O nylon apresenta excelente tingimento, mas com um número muito limitado de cores, não podendo ser tingido com dispersões mais elaboradas.

Um estudo realizado em 2009 (PRO-BIP) visando uma análise de projeção do mercado dos plásticos de base biotecnológica, aponta o potencial técnico de substituição do PTT.

Com base nas comparações das propriedades do PTT com as propriedades dos outros polímeros, pode-se concluir que o potencial de substituição do PTT (Tabela II.3) é muito elevada para o nylon e para o PBT, e moderadamente elevada para o PET, PC (policarbonato) e PP (polipropileno). É importante notar que, se a lista de materiais estende-se também para polímeros de base biotecnológica, o PTT poderia substituir em parte o PLA (poli (ácido láctico)) em alguns mercados (especialmente em aplicações de fibra), e possivelmente também o PHA (polihidroxialcanoatos), filmes de celofane e acetato de celulose, dependendo dos requisitos de biodegradabilidade requeridos. Teoricamente, o potencial de substituição do PTT de base biotecnológica para o PTT de base petroquímica é 100%, uma vez que o produto deve ser idêntico partindo do princípio que as qualidades da matéria-prima e os processos de polimerização são equivalentes. Na prática, de modo

similar a outras substituições em tecnologia de polímeros, o preço irá determinar até que ponto a substituição pode ocorrer.

Tabela I.3 – Potencial técnico de substituição do PTT (Adaptada de PRO-BIP, 2009).

	PVC	PEAD	PEBD	PP	PS	PMMA	PA	PET	PBT	PC	POM	PU	PSAI	ABS	MNP
PTT	-	-	-	+	-	-	++	+	++	+	-		-	-	-

++ substituição total, + substituição parcial, - sem substituição
PVC: poli(cloreto de vinila), PEAD: polietileno de alta densidade, PEBD: polietileno de baixa densidade, PS: poliestireno, PMMA: polimetil-metacrilato, PA: poliamida, POM: polioximetileno, PU: poliuretano, PSAI: poliestireno de alto impacto, ABS: acrilonitrila-butadieno-estireno, MNP: materiais não poliméricos.

I.1.2.1– Produção comercial de PTT

A produção comercial de PTT iniciou-se por volta de 1995 com as empresas Shell e DuPont. Contudo, a capacidade de produção das fibras PTT depende da disponibilidade do monômero 1,3-PDO, já que o outro monômero, o ácido tereftálico, é já comercializado em grandes escalas há muitos anos.

Um ponto crítico para tornar o PTT competitivo com o nylon é o preço do 1,3-PDO, visto que o gasto com matéria-prima responde por cerca de 60% do valor do produto final (SRI *Consulting*, 2000), sendo grande parte desse gasto devido ao monômero 1,3-PDO, já que o ácido tereftálico é considerado uma *pseudocomodity*, possuindo, assim, preços bastante acessíveis.

Inicialmente a DuPont produzia 1,3-PDO a partir da hidratação da acroleína e a Shell a partir da hidroformilação do óxido de etileno (OE). O processo a partir da acroleína apresenta menor custo de capital, mas um custo muito alto com matéria-prima. Embora ambos os processos sejam comerciais, a via OE gera um produto final mais competitivo (SRI *Consulting*, 2000).

Em 2006, a DuPont iniciou a produção de 1,3-propanodiol por uma nova rota, um bioprocesso utilizando uma cepa de *Escherichia coli* modificada geneticamente capaz de converter açúcar de milho no diol de interesse, sendo chamado de Bio-PDO.

I.1.3– Bio-PDO

A unidade de produção do Bio-PDO foi instalada em Loudon, uma cidade do estado norte americano do Tennessee, e apresentava capacidade de 45.000 toneladas por ano. Em maio de 2010, a DuPont anunciou a ampliação de sua unidade de Bio-PDO, que hoje apresenta a capacidade de 63.500 toneladas por ano. A expansão foi impulsionada pela forte demanda, segundo a DuPont. Seu produto é utilizado como um ingrediente em aplicações que vão desde cosméticos até formulações de fluidos de perfuração e polímeros, incluindo o polímero de fontes renováveis Sorona DuPont®. O Bio-PDO® é vendido através das marcas Zemea® e Susterra® (ICIS Green Chemicals, 2010).

O propanodiol Zemea® é utilizado em produtos para cuidados pessoais como desodorantes em bastão, *sprays* e *roll-on* para homens, mulheres, adolescentes e esportistas. Esses produtos oferecem excelente eliminação de odores, ótima textura e um resíduo não aderente. São produtos que não contêm químicos derivados do petróleo, agentes conservantes sintéticos nem alumínio; usam apenas ingredientes derivados de plantas.

O propanodiol Susterra® é um glicol especial que oferece uma alternativa não-petrolífera para utilizações finais que desejam um produto de base biológica, sem afetar o desempenho ou qualidade, podendo ser usado em aplicações como o degelo, fluidos de transferência de calor e como base para a refrigeração de motor, onde a estabilidade ao longo de um intervalo de temperaturas é importante. Os benefícios incluem: produto com 100% de fontes renováveis, baixa toxicidade e biodegradabilidade para aplicações de degelo; excelente ponto de congelamento para aplicações de solução aquosa que exigem proteção contra congelamento; melhor estabilidade térmica e menor corrosão do que outras formulações a base de propilenoglicol e etilenoglicol para aplicações de anti-congelante, resultando em maior durabilidade para os motores atuais de alto desempenho.

Sorona®, também chamado PTT ou 3GT, é o poli (tereftalato de trimetileno), um copolímero proveniente da condensação entre o 1,3-propanodiol (Bio-PDO®) e o ácido tereftálico ou dimetil tereftalato. Sorona® foi criado pela DuPont e começou a ser comercializado em 2000 (DuPont).

Sorona® contém 37% em peso de fontes renováveis em sua composição. A Figura II.2 apresenta as principais reações químicas envolvidas na preparação do PTT.

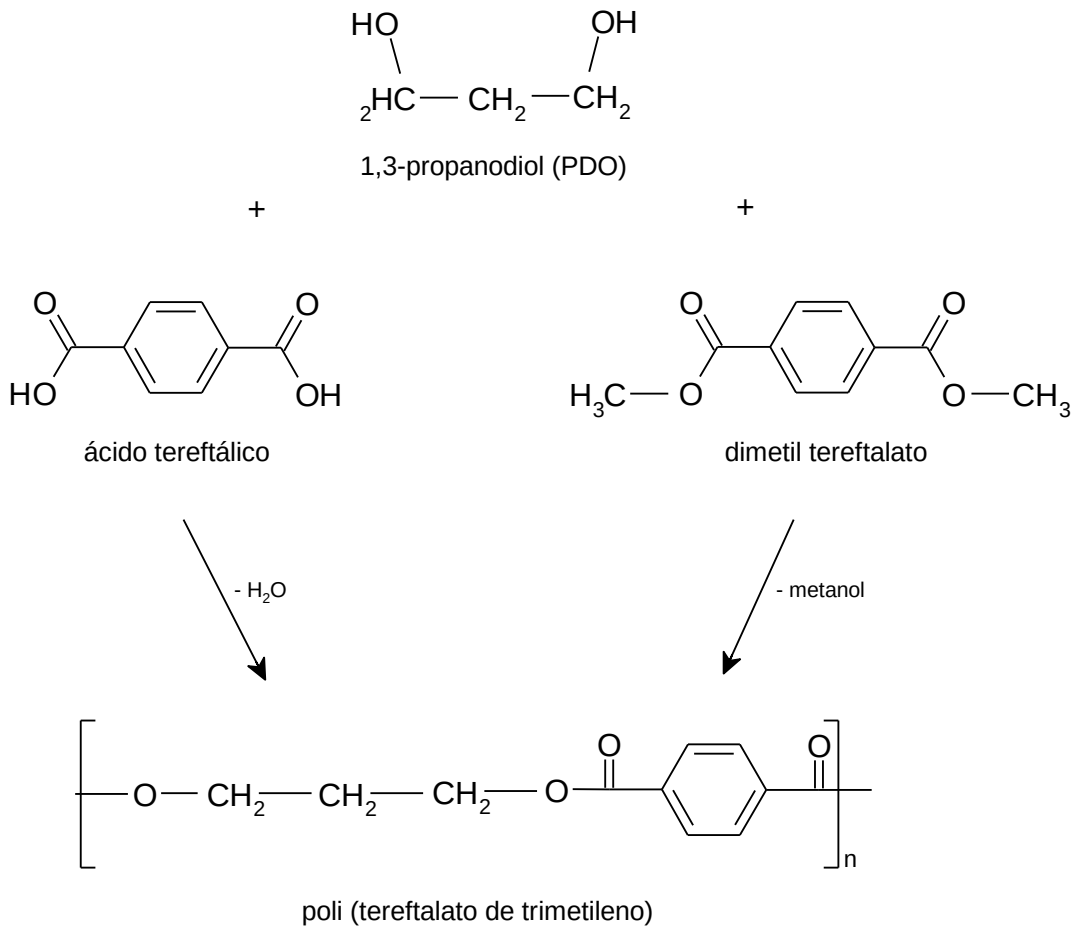

Figura I.2 – Principais reações envolvidas na formação do PTT (modificado de SRI Consulting, 2000).

A produção de Sorona® utiliza 40% menos energia e reduz as emissões de gases de efeito estufa em 63%. O polímero fornece uma combinação de benefícios para uma ampla variedade de usos finais. Além de fibras e tecidos, pode ser usado em filmes, componentes de engenharia, resinas e outras aplicações, com todas as vantagens de desempenho além dos benefícios ambientais (DuPont).

A DuPont é a única empresa que produz comercialmente o Bio-PDO embora a empresa francesa METabolic Explorer tenha desenvolvido em parceria com a Bio-XCell Malaysia um processo de produção de 1,3-PDO a partir de glicerina. A METabolic Explorer está construindo uma planta com capacidade de 50.000 toneladas por ano para produção de Bio-PDO na Malásia. A empresa Glory Biomaterial também está instalando na China uma unidade piloto para produção de Bio-PDO a partir de glicerina com capacidade para 20.000 toneladas por ano.

I.2 - Produção de 1,3-propanodiol

O 1,3-PDO é produzido comercialmente por três diferentes vias:

- Hidratação de acroleína seguido por hidrogenação;
- Hidroformilação e hidrogenação de óxido de etileno;
- Um processo fermentativo a partir de glicose.

I.2.1– Produção de 1,3-PDO a partir de acroleína

Essa rota foi inicialmente explorada pela Shell quando era produtora de acroleína e desenvolvido em um processo comercial pela Degussa. A tecnologia Degussa foi licenciada para DuPont.

O processo de produção de 1,3-PDO a partir da acroleína é dividido em três seções. Na primeira seção, a acroleína (18%) reage com água a 45°C na presença de resina trocadora de íons (piridil). A conversão é de 51% em mol com uma seletividade de 83% em mol do intermediário 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), principal produto. A acroleína que não reagiu é removida em uma coluna de extração e reciclada (Haasa *et al.*, 2005).

Uma solução aquosa de 3-HPA 16% é, então, hidrogenada a 1,3-PDO na segunda seção. A hidrogenação é realizada em um reator de leito fixo a 2.200 psi. A primeira zona é a 55°C e a segunda a 125°C. O rendimento desta etapa é praticamente 100%. A água é retirada em uma coluna de desidratação na seção de purificação (Haasa *et al*., 2005).

Uma corrente menos expressiva, contendo o diéter do 1,3-PDO (3,3-oxidipropionaldeído), um subproduto da hidratação da acroleína, é purificada por destilação. O fluxo inferior de éter da coluna é utilizado para combustível, e o fluxo de éter purificado alimenta um reator de hidrólise. No reator de hidrólise, o éter e água reagem a 725 psi e 240°C para produzir 1,3-PDO, que é retornado para a coluna de desidratação para a recuperação do produto (Haasa *et al*., 2005). A rota química descrita está representada na Figura II.3.

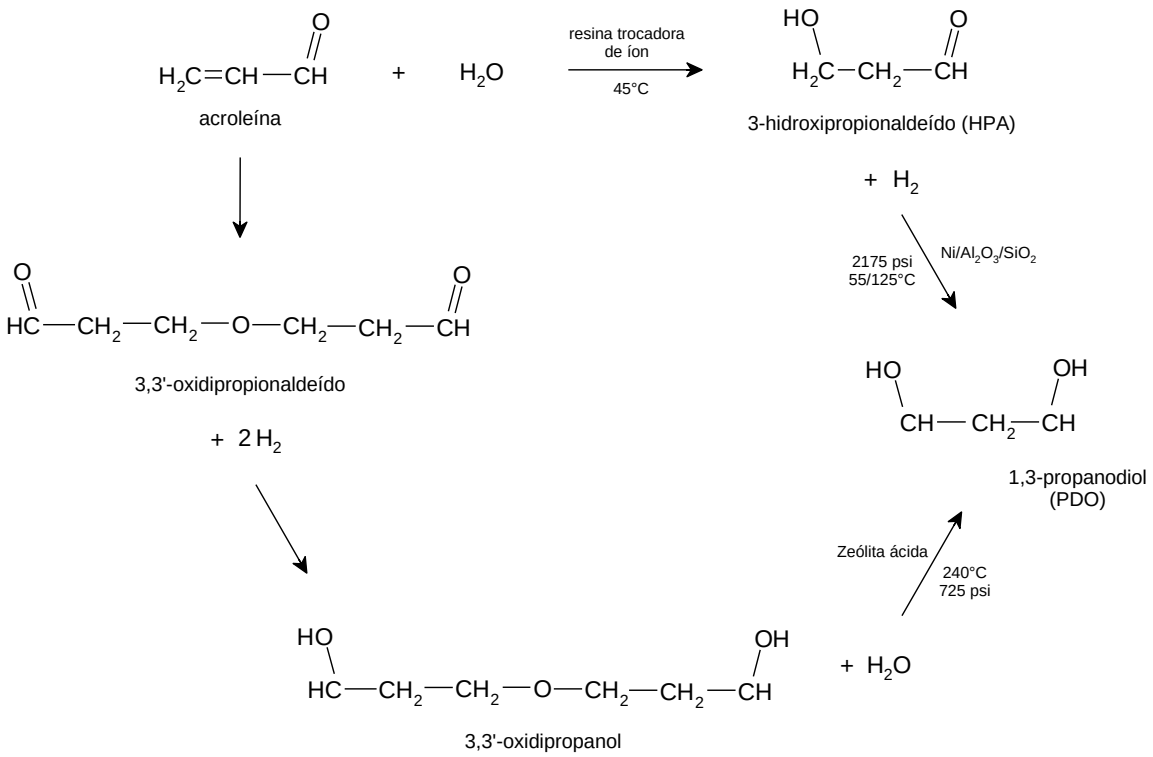

Figura I.3 – Rota química para produção de 1,3-PDO a partir de acroleína (adaptado de SRI *Consulting*, 2000).

I.2.2– Produção de 1,3-PDO a partir de óxido de etileno (OE)

O processo de produção de 1,3-PDO a partir de óxido de etileno (OE) também é dividido em três seções. Na primeira seção, OE reage com gás de síntese (H_2/CO com razão molar de 1). Cinco reatores em batelada com agitação são escalonados em um ciclo de 170 minutos. Neste ciclo, a reação ocorre em 80 minutos a 1.500 psi e 80°C. Para esta etapa, a concentração de óxido de etileno é de 10%. O catalisador a base de cobalto é gerado no local, a partir de $Co(OH)_2$ e CO. Dimetildodecilamina é adicionado como um promotor. Tanto o catalisador quanto o promotor são insolúveis em água, que é usado para extrair o 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) em uma série de duas colunas. A conversão de OE em 3-HPA é de 85%. Na segunda seção, 3-HPA é hidrogenado a 1,3-PDO em uma série de três reatores, operando a 2.200 psi e em temperaturas progressivamente elevadas de 60°C, 85°C e 120°C. O catalisador de hidrogenação é granular e à base de níquel em um suporte Al_2O_3/SiO_2. O rendimento de 1,3-PDO baseado em 3-HPA é essencialmente 100%. A solução aquosa passa por uma seção de purificação (Haasa *et al*., 2005).

Na seção de purificação, o fluxo de 1,3-PDO passa pela primeira coluna. O 1,3-PDO pré-purificado é encaminhado para segunda coluna. O fluxo de resíduo é utilizado para combustível. O rendimento global, baseado no consumo de óxido de etileno é de 85% em mol (Haasa *et al*., 2005). A Figura II.4 detalha essa rota química.

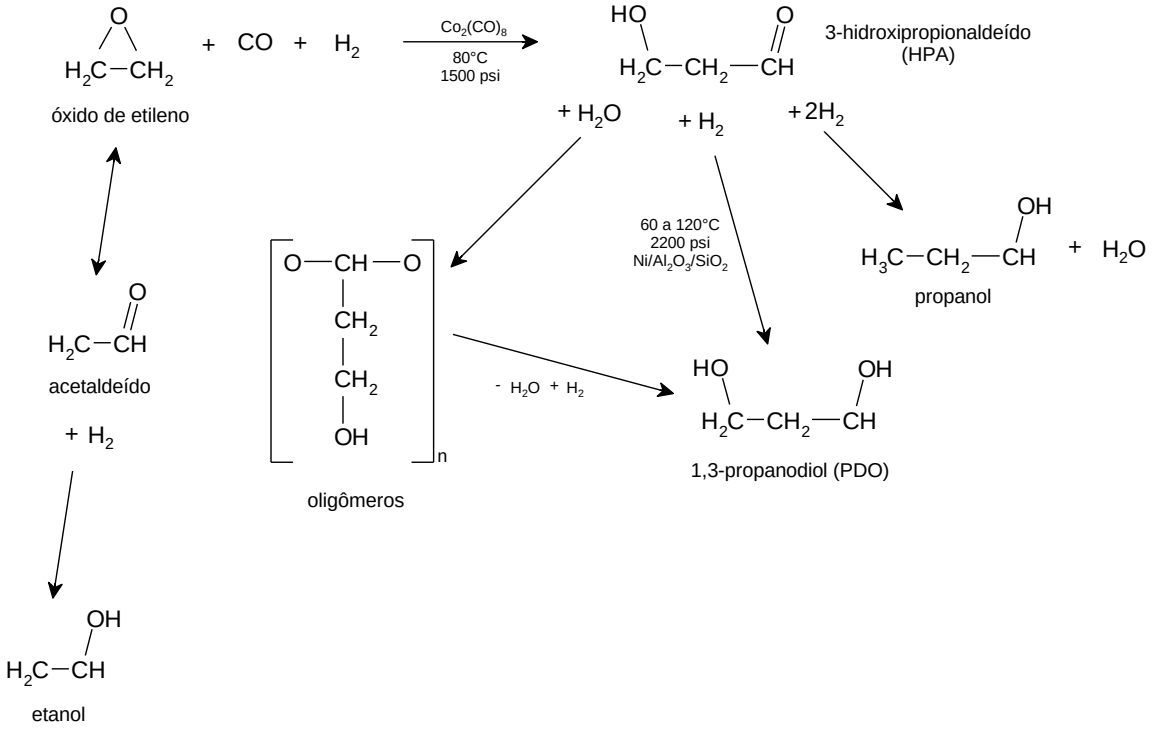

Figura I.4 – Rota química para produção de 1,3-PDO a partir de OE (adaptado de SRI *Consulting*, 2000).

I.2.3– Produção de 1,3-PDO a partir da fermentação da glicose

A glicose é convertida em 1,3-PDO sob condições anaeróbicas em uma série contínua de fermentadores de leito fluidizado tipo *gas-lift*. Um micro-organismo recombinante, *Escherichia coli*, é imobilizado em um suporte de esferas poliméricas. As esferas poliméricas permanecem no interior dos fermentadores enquanto que o fermentado é filtrado para remover as células em suspensão e outros sólidos. O filtrado segue para um evaporador-cristalizador de dois estágios onde o filtrado é concentrado na primeira etapa e alguns sais, principalmente acetato de sódio e bicarbonato de sódio, precipitados na segunda etapa e recuperados como sólidos. O vapor obtido na segunda fase do evaporador contendo 1,3-PDO e água é condensado e alimenta uma coluna de remoção de água. O 1,3-PDO bruto obtido no fundo da coluna de remoção de água é bombeado para uma coluna de

purificação, sendo o 1,3-PDO recuperado como um produto destilado (SRI *Consulting*, 2000). A rota fermentativa está representada na Figura II.5.

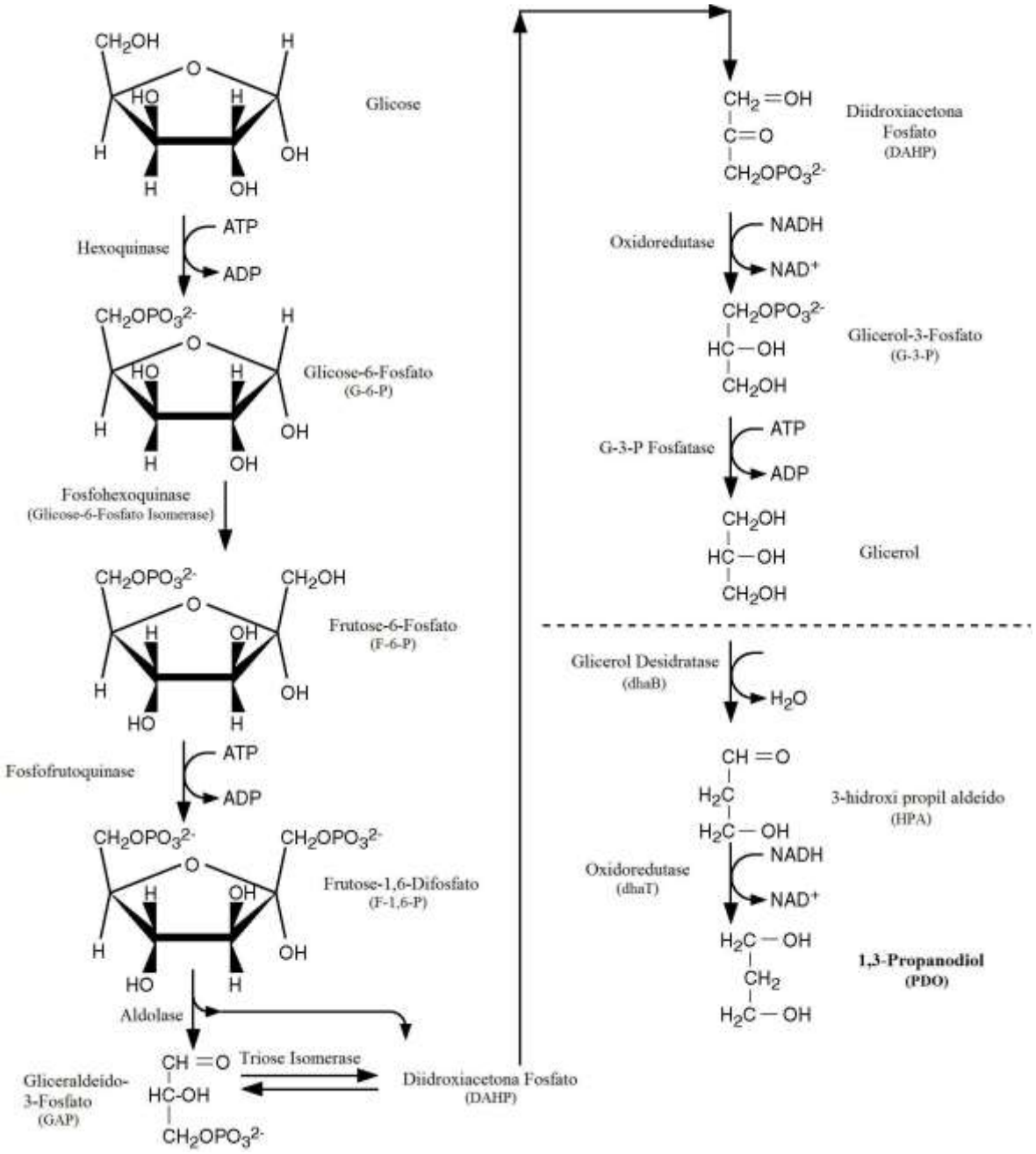

Figura I.5 – Rota fermentativa de produção de 1,3-PDO a partir de glicose (modificado de SRI Consulting, 2000).

I.3 – Glicerol

Glicerol, também conhecido como propano-1,2,3-triol, é um composto orgânico pertencente à função álcool. É líquido à temperatura ambiente, higroscópico, inodoro e viscoso. O termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados, normalmente, contendo pelo menos 95% de glicerol. Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas (Mota *et al.*, 2009). A Figura II.6 apresenta a estrutura do glicerol.

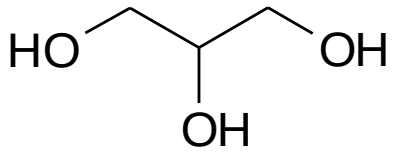

Figura I.6 – Fórmula estrutural do glicerol.

A chamada glicerina loira é normalmente utilizada para designar a glicerina oriunda dos processos de produção do biodiesel, onde a fase glicerinosa 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 *et al.*, 2009).

I.3.1– Biodiesel

A produção de biodiesel tem crescido muito nos últimos anos. A rápida expansão da capacidade de produção está sendo observada não só nos países desenvolvidos como Alemanha, Itália, França, e os Estados Unidos, mas também em países em desenvolvimento como o Brasil, Argentina, Indonésia e Malásia (Amaral *et al.*, 2009).

O biodiesel é produzido a partir da transesterificação de triglicerídeos com um álcool monofuncional (metanol, etanol, etc) que gera alquil ésteres de ácidos graxos e glicerol, como mostra a Figura II.7.

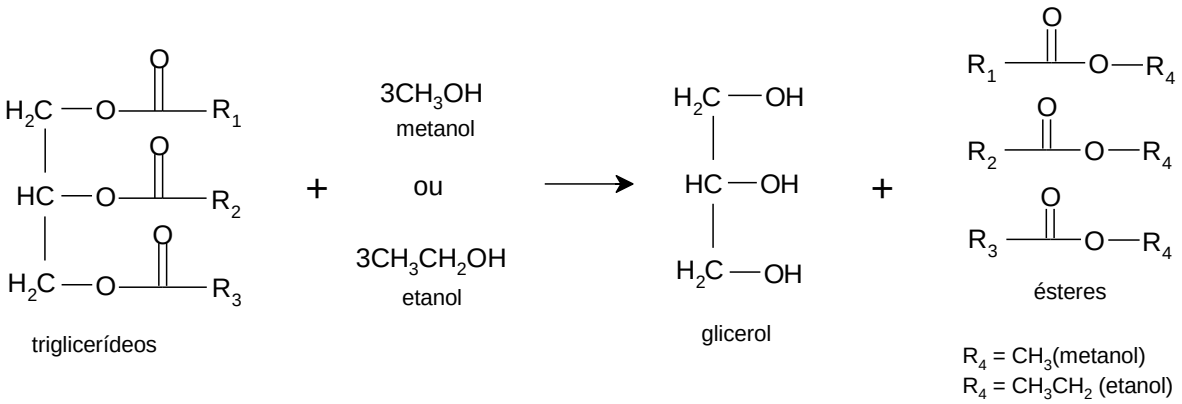

Figura I.7 – Equação global de transestereficação de triglicerídeos.

É possível calcular que, estequiometricamente, 10% em peso de glicerol é formado por esta reação. No entanto, esse valor é para o glicerol puro. A glicerina bruta, proveniente da síntese de biodiesel apresenta geralmente 55-90% de pureza. O resto da glicerina bruta é composto por triglicerídeos e metanol não convertidos, biodiesel, sabões e contaminantes (Amaral *et al.*, 2009). Portanto, muitos contaminantes tornam esse subproduto da produção de biodiesel impróprio para aplicações na indústria química e farmacêutica sem a realização de um tratamento prévio. Contudo, a purificação da glicerina torna muitas vezes a sua utilização inviável do ponto de vista econômico.

O mercado brasileiro absorve anualmente de 30 a 40 toneladas de glicerina. Contudo, a produção brasileira de biodiesel em 2013 foi de aproximadamente 2,7 bilhões de litros (ANP), gerando aproximadamente 320 mil litros de glicerina bruta, bem mais do que o mercado é capaz de absorver. Sendo assim, grande parte dessa glicerina tem sido exportada principalmente para China, responsável por absorver 83% das exportações realizadas em 2013, quando o Brasil exportou cerca de 178 mil toneladas de glicerina bruta a um valor de aproximadamente US$ 350,00/tonelada.

Dentro deste contexto, novas aplicações para a glicerina precisam ser desenvolvidas e/ou as vias existentes precisam ser expandidas. Isto deve ser possível, pois muitas aplicações para a glicerina podem ser identificadas, dentre elas, uso em tabaco, comésticos, indústria alimentícia e farmacêutica, etc.

Uma aplicação para este excedente de glicerina que vem ganhando destaque é sua utilização em bioprocessos, como matéria-prima para produção de alguns produtos comercialmente importantes, tais como biossurfactantes, ácidos orgânicos, visando redução dos custos de produção (Amaral *et al.*, 2009).

I.3.2 – Micro organismos capazes de consumir glicerol

O gênero *Clostridium* e enterobactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter* são capazes de fermentar o glicerol produzindo 1,3-PDO como principal produto (Barbirato *et al.*, 1998). O 1,3-PDO apresenta uma vasta gama de aplicações como já foi citado no item II.1.1.

A conversão da glicerina em dihidroxiacetona é outro exemplo de um potencial bioprocesso para o glicerol. A dihidroxiacetona pode ser transformada em dihidroxiacetona fostato pela ação da dihidroxiacetona quinase, que serve como um substrato essencial para algumas aldolases produzirem diversos derivados de açúcar opticamente ativos (Itoh *et al.*, 1995). A literatura relata a conversão do glicerol em dihidroxiacetona por *Acetobacter* (Nabe *et al.*, 1979) e *Gluconobacter* (Claret *et al.*, 1994).

O glicerol pode ser usado como fonte de carbono por *Propionibacterium* para produzir ácido propiônico (Bories *et al.*, 2004) e por *Anaerobiospirillum* para produzir ácido succínico (Lee *et al.*, 2001).

O produto de interesse pode ser obtido através da modificação das condições do processo. Por exemplo, butanol foi encontrado como principal produto da fermentação do glicerol por *Clostridium pasteurianum* sob certas condições de cultivo (Biebl, 2001). Em outro trabalho, o etanol e o formiato foram os dois principais produtos da fermentação de glicerol por uma estirpe de *Klebsiella planticola* isolada do rúmen de veados (Jarvis *et al.*, 1997). A co-produção de etanol e hidrogênio a partir de resíduos contendo glicerol por *Enterobacter aerogenes* mutante também foi relatada (Ito *et al.*, 2005).

Um desenvolvimento mais recente na fermentação microbiana de glicerol é a capacidade de *Escherichia coli* em fermentar tal substrato por via anaeróbia (Dharmadi *et al.*, 2006). Através de estratégias de processo é possível obter diversas melhorias na produção de etanol-formiato, hidrogênio-etanol, ácido succínico, e outros produtos.

O glicerol pode ser assimilado através da via glicerol-3-fosfato ou dihidroxiacetona por leveduras. Em *Saccharomyces cerevisiae*, o glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato pela ação da glicerol quinase (Wang *et al.*, 2001). O produto formado pode ser usado como precursor para a biossíntese de lipídios ou pode ser convertido em dihidroxiacetona fosfato. O último intermediário pode ser transformado em gliceraldeído-3-fosfato pela triose fosfato isomerase na via metabólica ou servir como substrato para a síntese de outros metabólitos (Grauslund *et al.*, 1999). Esta rota de assimilação de glicerol tem sido observada também

em uma série de outras leveduras, como *Debaryomyces hansenii* (Adler *et al*., 1985), *Zygosaccharomyces rouxii* (van Zyl *et al.*, 1991), *Candida glycerinogenes* (Wang *et al.*, 2000a) e *Saccharomyces pombe* (Gancedo *et al*., 1986)

Muitos micro organismos são capazes de metabolizar o glicerol. Entretanto, o metabolismo fermentativo do glicerol tem sido mais amplamente estudado com diversas bactérias, como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Clostridium*. A assimilação de glicerol por esses micro-organismos está estritamente ligada à sua capacidade de sintetizar o 1,3-PDO. No entanto, alguns estudos têm relatado metabolismo fermentativo de glicerol na ausência de síntese de 1,3-PDO (Amaral *et al.*, 2009).

I.3.2.1– Produção enzimática de 1,3-propanodiol a partir de glicerol

O glicerol é convertido em 1,3-PDO através de duas etapas como mostra a Figura II.8. Na primeira etapa, a enzima glicerol desidratase (dhaB) catalisa a remoção de uma molécula de água do glicerol, produzindo 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA). Na segunda etapa, a enzima 1,3-propanodiol oxidoredutase (dhaT) reduz o 3-HPA a 1,3-PDO simultaneamente a oxidação da forma reduzida do co-fator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) para sua forma oxidada, NAD^+ (Nakamura & Whitedy, 2003).

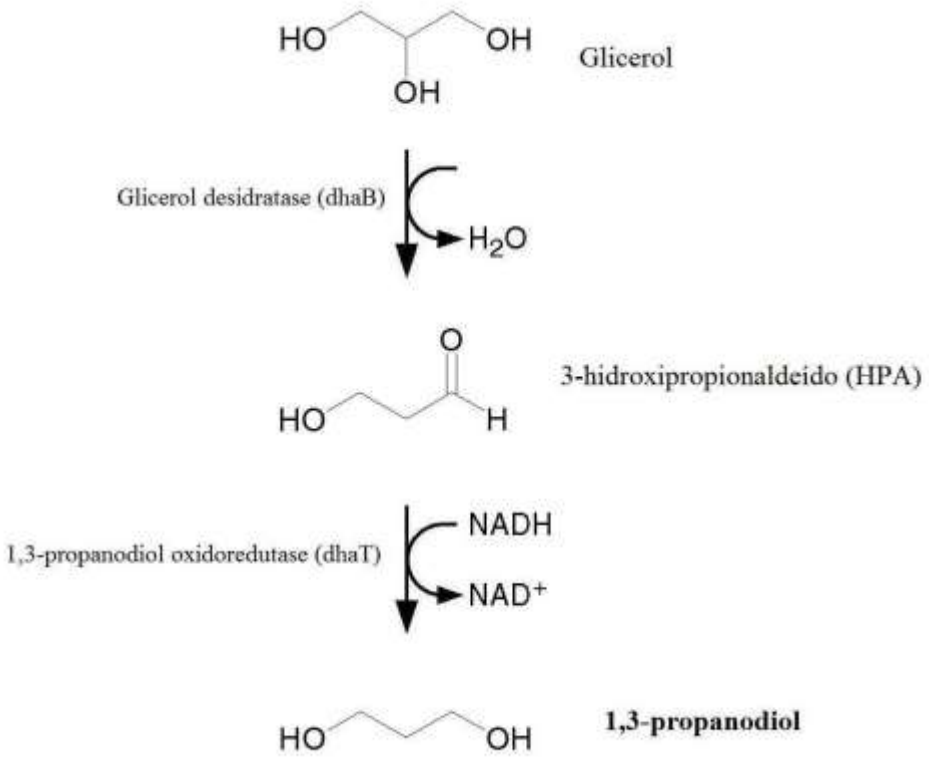

Figura I.8 – Rota metabólica de produção de 1,3-PDO a partir de glicerol.

I.4 - Produção de 1,3-propanodiol por fermentação

1,3-PDO é um dos mais antigos dentre os produtos de fermentação conhecidos. Foi inicialmente identificado em 1881 por August Freund em uma fermentação de glicerol contendo uma cultura mista onde foi identificado *Clostridium pasteurianum* (Saxena *et al.*, 2009).

Em seguida, a capacidade de micro organismos converterem glicerol em 1,3-PDO foi observada por Noyes e Watkin em 1895. Esses pesquisadores verificaram a presença de uma impureza em glicerol estocado. A presença de mais de 1% dessa impureza tornou o glicerol inadequado para determinadas aplicações. O início da Primeira Guerra Mundial e a exigência de glicerol de alta pureza para a fabricação de explosivos levou a necessidade de identificação desta impureza de particular importância. Voisenet identificou o composto como 1,3-propanodiol em 1914, que foi determinado como um produto da fermentação

anaeróbica de glicerol. Ainda hoje, as especificações de glicerol incluem um teor máximo de 0,5% de 1,3-PDO (Zeng & Biebl, 2002).

Em 1928, *Microbiology School of Delft* começou a investigar a produção de 1,3-PDO por diferentes micro organismos da família Enterobacteriaceae. Essa pesquisa foi posteriormente continuada em Ames, Iowa, nos Estados Unidos. Contudo, a primeira espécie de *Clostridium* produtora de 1,3-PDO foi somente descrita em 1983 (Drozdzynska *et al.*, 2011).

I.4.1– Micro organismos produtores de 1,3-propanodiol

Muitos micro organismos são capazes de converter glicerol em 1,3-PDO. Dentre estes se encontram os do gênero *Klebsiella*: *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* e *K. planticola*; do gênero *Citrobacter*: *Citrobacter freundii*, *Cit. intermedium* e *Cit. amalonaticus*; do gênero *Lactobacillus*: *Lactobacillus reuteri*, *L. buchneri* e *L. brevis*, e do gênero *Clostridium*: *Clostridium acetobutylicum*, *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. beijerinckii* e *Cl. kainantoi*. Além destes, outros microorganismos também apresentam tal capacidade: *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomeras*; *Acetobacterium carbinolicum*, *A. woodii*; *Bacillus sp*; *Pelobacter venetianus* e *Ilybacter polytropus*. Porém os micro organismos mais estudados para a conversão de glicerol em 1,3-PDO são *K. pneumoniae*, *Cit. freundii* e *Cl. butyricum* (SRI Consulting, 2000).

I.4.2 – Fisiologia de formação do 1,3-propanodiol

A análise dos produtos da fermentação mostra que parte do glicerol é convertido nos mesmos produtos da fermentação do açúcar. Essa conversão fornece a energia necessária para o crescimento, mas para muitos produtos, são liberados equivalentes redutores, que são oxidados em uma conversão redutora de glicerol, levando à formação de 1,3-PDO (Biebl *et al.*, 1999).

As reações metabólicas envolvidas na fermentação do glicerol são diversas, mas, em princípio, a fermentação do glicerol pode ser dividida em duas vias. Na via redutora, o glicerol é desidratado a 3-hidroxipropionaldeído, que é, então, reduzido a 1,3-PDO com consumo de poder redutor ($NADH.H^+$). O poder redutor é gerado no metabolismo

oxidativo do glicerol, que faz uso das reações da glicólise e resulta na formação de subprodutos (Biebl, 2001).

A Figura II.9 mostra as vias bioquímicas de fermentação do glicerol. A utilização de piruvato é diferente entre os microrganismos. Butirato e n-butanol são produzidos pela classe Clostridia, enquanto que o 2,3-butanodiol é apenas formado por enterobactérias. Acetato e etanol são produzidos pelos dois grupos de bactérias (Biebl *et al.*, 1999).

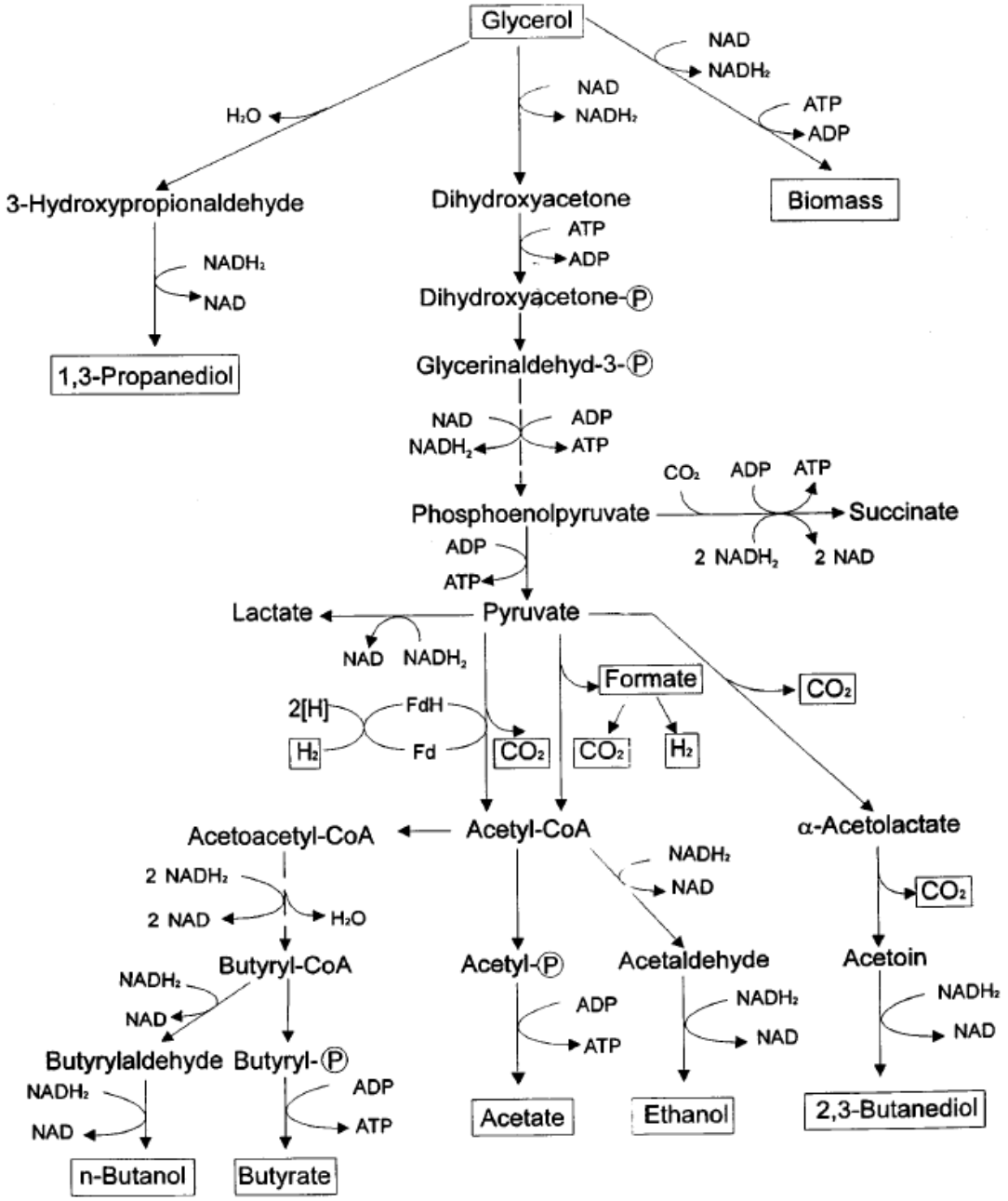

Figura I.9 – Vias bioquímicas de fermentação do glicerol (Biebl *et al*., 1999).

O rendimento de 1,3-PDO depende da combinação e estequiometria das vias redutora e oxidativa. Tem sido demonstrado que a formação de 1,3-PDO com ácido acético como único subproduto da via oxidativa resulta no rendimento máximo de 1,3-PDO (Biebl, 2001). Isso pode ser explicado pelo fato do acetato ser o único subproduto que não utiliza poder redutor ($NADH.H^+$) para sua formação a partir do piruvato, gerando um saldo maior de $NADH.H^+$ para ser utilizado na conversão de 3-hidroxipropionaldeído em 1,3-propanodiol.

Na realidade, uma série de outros subprodutos são formados na fermentação, como etanol, ácido lático, ácido succínico e 2,3-butanodiol por enterobatérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Citrabacter freundii* e *Enterobacter agglomerans*, ácido butírico por *Clostridium butyricum* e butanol por *Clostridium pasterianum*. Todos estes subprodutos estão associados a uma redução do rendimento de 1,3-PDO, em particular etanol, butanol, butirato e succinato, que não contribuem para o pool de $NADH.H^+$, como pode ser observado na Figura II.9.

I.4.3 – *Citrobacter freundii*

Citrobacter é um gênero de bactérias gram-negativas da família Enterobacteriaceae. Como os demais membros da ordem Enterobacteriales, são bastonetes gram-negativos, anaeróbicos facultativos. Pertencem a um importante grupo de bactérias comumente chamado de entéricos. O nome reflete o fato de que habitam o trato intestinal de humanos e outros animais (Tortora *et al.*, 2005).

O gênero *Citrobacter* engloba 11 espécies de bactérias, entre elas *Citrobacter freundii*, que foi utilizada nesse trabalho. O gênero *Citrobacter* foi descoberto em 1932 por Werkman e Gillen. Culturas de *C. freundii* foram isoladas e identificadas no mesmo ano, a partir de extratos de solos (Wang *et al.*, 2000b).

Como um patógeno oportunista, *C. freundii* é responsável por um número significativo de infecções oportunistas. É conhecida por ser a causa de uma variedade de infecções hospitalares do trato respiratório, urinário, sangue, entre outros (Whalen & Mully, 2007).

Surpreendentemente, este micro organismo infeccioso em humanos desempenha um papel positivo no meio ambiente. *C. freundii* é responsável pela redução de nitrato a nitrito, sendo esta conversão uma etapa fundamental no ciclo do nitrogênio (Puchenkova, 1996).

I.4.3.1– Morfologia celular

Citrobacter freundii são bactérias longas e em forma de bastonetes, normalmente com 1-5 µm de comprimento. A maioria das células *C. freundii* estão rodeados por muitos flagelos usados para locomoção, mas algumas são imóveis (Wang *et al.*, 2000b).

Como *C. freundii* é uma bactéria gram-negativa contém duas membranas (interna e externa), o espaço periplásmico encontra-se entre as duas membranas. A membrana externa não contém uma fonte de energia, mas contém porinas que auxiliam o organismo na absorção de íons importantes (Wang *et al.*, 2000b). Ao contrário das bactérias gram-positivas, células de *C. freundii* não possuem uma parede celular espessa composta de peptidoglicano.

I.4.3.2– Produção de 1,3-propanodiol por *Citrobacter freundii*

Homann *et al.* (1990) cultivaram cepas de *C. freundii* (DSM 30039 e DSM 30040) em fermentadores de 1 L com controle de pH (pH = 7,0) em meio contendo 2% de glicerol e obtiveram o rendimento teórico máximo de conversão de glicerol em 1,3-propanodiol (Y_{PS} = 0,65 mol/mol).

A conversão de glicerol em 1,3-propanodiol por *C. freundii* DSM 30040 também foi estudada por Boenigk *et al.* (1993). Os autores otimizaram a produção de 1,3-PDO em fermentadores de 1 L para cultivos contínuos de uma fase e de duas fases. A produtividade máxima para o cultivo de uma fase de 1,3-PDO (3,7 $g.L^{-1}.h^{-1}$) foi obtida sob condições limitantes de glicerol. As condições otimizadas para o processo de fermentação em duas fases foram: primeiro, a limitação de glicerol (250 mM), pH 7,2, D = 0,1 h^{-1}, 31 °C, segunda etapa, o glicerol adicionado, pH 6,6, D = 0,05 h^{-1}, 28 °C. Nessas condições foram consumidos 875 mM de glicerol, a concentração média final de 1,3-PDO foi 545 mM e a produtividade, 1,38 $g.L^{-1}.h^{-1}$.

Pflugmacher & Gottschalk (1994) imobilizaram células de *C. freundii* DSM 30040 em espuma de poliuretano num reator de leito fixo. Em comparação com os resultados obtidos por Boenigk *et al.* (1993), a produtividade de 1,3-PDO dobrou, atingindo 8,2 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Essa produtividade foi obtida para um alimentação de 400 mM de glicerol, pH 6,9, 36°C e D = 0,5 h^{-1}.

Mais recentemente, Metsoviti *et al.* (2013) estudaram a produção de 1,3-PDO a partir de glicerina proveniente da produção de biodiesel utilizando uma nova cepa isolada

de *Citrobacter freundii*. A cepa *C. freundii* FMCC-B 294 (VK-19) foi capaz de crescer em meio contendo mais 170 $g.L^{-1}$ de glicerol, porém a maior produção de 1,3-PDO (45,9 $g.L^{-1}$) foi obtida quando utilizou concentrações iniciais próximas de 100 $g.L^{-1}$ de glicerol nas bateladas realizadas. Em seguida, Metsoviti *et al.* (2013) realizaram bateladas alimentadas com esterilização prévia da glicerina, obtendo 68,1 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO com rendimento de 0,40 $g.g^{-1}$ de glicerol consumido e a produtividade de 0,79 $g.L^{-1}.h^{-1}$; e sem esterilização da glicerina, obtendo 66,3 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO com rendimento de 0,37 $g.g^{-1}$ de glicerol consumido.

I.4.4– *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus é um gênero de bactérias gram-positivas e anaeróbia facultativa da família Lactobacillaceae. São bactérias bastante conhecidas por converterem lactose e outros açúcares em ácido láctico. Nos humanos, se localizam na vagina, trato intestinal e na cavidade oral (Tortora *et al*., 2005).

O gênero *Lactobacillus* engloba mais de 125 espécies, entre elas a espécie *Lactobacillus brevis*, que foi utilizada neste trabalho. Os lactobacilos são usados comercialmente na produção de repolho azedo, picles, leitelho e iogurte (Tortora *et al*., 2005). Também é uma das causas mais comuns de deterioração da cerveja. Sua ingestão mostrou ser capaz de melhorar a função imunológica humana.

L. brevis é uma das principais espécies de *Lactobacillus* encontrada em grãos de tibicos[1] e tem sido identificada como a espécie responsável pela produção do polissacarídeo (dextrano) que forma os grãos (Pidoux, 1989). Os principais metabólitos produzidos por *L. brevis* incluem o ácido lático e etanol.

I.4.4.1– Morfologia celular

Lactobacillus brevis são bactérias gram-positivas, de forma cilíndrica e não produzem esporos. Isto implica em uma parede celular espessa e uma membrana interna, apresentando-se na forma de bastonete. Embora o genoma sequenciado de *L. brevis* seja relativamente pequeno, as bactérias produtoras de ácido láctico são capazes de codificar um grande número de transportadores diferentes para atender as necessidades tanto de

[1]É um alimento natural conhecido também pelo nome de *cogumelo chinês* ou *kefir de água.*

linhagens prototróficas quanto de linhagens auxotróficas. *L. brevis* são bactérias móveis e consideradas probióticas (*Integrated Microbial Genomes*).

L. brevis não é um patógeno e não há casos relatados deste micro organismo ter causado doença em seres humanos. Na verdade, esta bactéria tem a capacidade de melhorar o sistema imunológico humano (Gilbert, 2006).

I.4.4.2 – Produção de 1,3-propanodiol por *Lactobacillus brevis*

Radler & Schutz (1984) cresceram três cepas de *Lactobacillus brevis* e uma cepa de *Lactobacillus buchneri* em meio anaeróbio contendo glicerol e glicose e verificaram um crescimento muito mais expressivo do que quando estas cepas foram crescidas somente em glicose. Foi observado que a glicose foi fermentada a acetato ou lactato, etanol e CO_2, enquanto que o glicerol foi desidratado a 3-hidroxipropionaldeído e posteriormente reduzido a 1,3-propanodiol. O glicerol não foi metabolizado, quando utilizado como único substrato. A cofermentação de frutose e glicerol também produziu 1,3-propanodiol.

Cunha & Foster (1992b) também observaram que a fermentação simultânea de glicerol e açúcar por *Lactobacillus brevis* B22 e *Lactobacillus buchneri* B190 aumentou tanto a taxa de crescimento como o crescimento total desses microrganismos. Além disso, verificaram que a redução de glicerol a 1,3-propanodiol por *Lactobacillus* influencia o metabolismo de cofermentação de açúcar canalizando alguns dos metabólitos intermediários (por exemplo, o piruvato) para a produção de $NADH.H^+$ ao invés de reações que consomem $NADH.H^+$. A necessidade de $NADH.H^+$ para que se evite o acúmulo do intermediário 3-hidroxipropionaldeído induz a cofermentação de lactato-glicerol. Como resultado, ATP adicional pode ser gerado não somente pela conversão de piruvato em acetato, através da via acetil fosfato em vez da produção de etanol e, pela oxidação de parte do intermediário piruvato para acetato em vez da redução para o lactato como de costume, mas também pela reoxidação do lactato acumulado a acetato via piruvato. A conversão de lactato a piruvato é provavelmente catalisada por lactato desidrogenases NAD-independente que são encontrados apenas nas culturas que oxidam lactato e produzem 1,3-propanodiol, sugerindo uma correlação entre a expressão dessas enzimas e a relação intracelular NAD/NADH.

I.4.5– *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bastonete gram-negativo anaeróbio facultativo, não formador de esporos. Fermenta lactose e outros açúcares, produzindo indol e triptofano. Pertence à família *Enterobacteriacea*, que inclui outros gêneros de importância médica como *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Yersinia* spp (Almeida, 2009).

E. coli é o bastonete gram-negativo mais prevalente na microbiota fecal humana. Este microrganismo, tipicamente, coloniza o cólon como um germe comensal e inócuo a partir de poucos minutos após o nascimento, coexistindo com benefício mútuo por décadas. O nicho de *E. coli* comensal é a membrana mucosa do colón dos mamíferos. Esta bactéria é capaz de competir com sucesso com outros germes em ambientes super populosos. Uma hipótese para explicar esta bem sucedida simbiose é a habilidade inerente a *E. coli* de utilizar o gluconato existente no cólon de forma mais eficientemente que as demais espécies residentes, o que lhe permitiria ocupar um nicho metabólico superior (Almeida, 2009).

Apesar de viverem habitualmente no trato gastrointestinal baixo, alguns membros importantes da família Enterobactereacea, como *E. coli* podem viver no ambiente, no solo e água, ou colonizar a orofaringe, como ocorre entre os diabéticos, bem como entre pacientes hospitalizados, independentemente do uso de antibióticos (Almeida, 2009).

Há várias linhagens de *E. coli*, altamente especializadas, que adquiriram atributos específicos que as tornaram virulentas, ou seja, tornaram-se capazes de adaptar-se a novos nichos, causando assim um largo espectro de doenças. Combinações específicas de atributos ou fatores de virulência que se estabelecem entre as linhagens evolutivas de *E. coli* definem grupos patogênicos dentro da espécie (patotipos), podendo causar doenças no trato intestinal ou acometer outros sítios (Almeida, 2009).

I.4.5.1– Morfologia celular

Escherichia coli geralmente mede entre 1 a 3µm de largura por 0,5µm de diâmetro. Apresenta apêndices de superfície, incluindo *pili* e flagelos, que podem ser numerosos.

O citoplasma das enterobactérias, como o de outras bactérias, não contém organelas delimitadas por membrana e seu genoma, usualmente, consiste de um cromossomo circular e pode incluir múltiplos plasmídeos de diferentes tamanhos, dispersos pelo citoplasma. As

enterobactérias possuem uma membrana interna (ou citoplasmática) e uma membrana externa composta por fosfolipídeos, entre elas há um espaço periplasmático que contém a parede celular de peptideoglicanas (Almeida, 2009).

I.4.5.2– Produção de 1,3-propanodiol por *Escherichia coli*

Escherichia coli não é capaz de produzir 1,3-propanodiol. Contudo, alguns trabalhos utilizam cepas de *E. coli* modificadas geneticamente para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol.

Tong & Cameron (1992) expressaram os genes da via bioquímica responsável pela produção de 1,3-PDO, operon regulatório *dha* de *Klebsiella pneumonia*, em *Escherichia coli*. Os autores verificaram que o rendimento de 1,3-PDO a partir de glicerol foi melhorado com a cofermentação de açúcares. O rendimento foi de 0,46 mol/mol em glicerol puro, 0,63 mol/mol na cofermentação com glicose e 0,55 mol/mol na cofermentação com xilose.

Tang *et al.* (2009) construíram um operon termosensível e o expressaram em *Escherichia coli* K-12 ER2925. Os genes para a produção de 1,3-propanodiol de *Clostridium butyricum*, *dhaB1* e *dhaB2*, codificam as enzimas glicerol desidratase B_{12}-independente e 1,3-propanodiol oxidoredutase, respectivamente. A conversão microbiana de 1,3-PDO a partir de glicerol por esta cepa de *E. coli* recombinante foi estudada em um processo de fermentação com dois estágios. Durante a primeira fase, ocorreu uma etapa para produção de alta densidade celular, houve crescimento significativo de células e a maioria dos metabólitos produzidos foram ácidos orgânicos, principalmente acetato. Durante a segunda fase, glicerol foi rapidamente convertido em 1,3-PDO após uma mudança da temperatura de 30°C para 42°C. Os subprodutos foram principalmente piruvato e acetato. Durante este processo de dois estágios, o rendimento de 1,3-PDO e a produtividade atingiram 104,4 $g.L^{-1}$ e 2,61 $gL^{-1}.h^{-1}$, respectivamente, e a taxa de conversão do glicerol em 1,3-PDO alcançou 90,2% ($g.g^{-1}$). O tempo de fermentação global foi de 40h.

I.4.6– Micro organismos modificados geneticamente

A engenharia genética é a manipulação dos genes. É também chamada de tecnologia do DNA recombinante. Na engenharia genética, pedaços de DNA (genes) são

introduzidos em um hospedeiro através de um transportador (vetor). O DNA estrangeiro torna-se uma característica permanente do hospedeiro, sendo replicada e transmitida para as células filhas juntamente com o resto do seu DNA.

A biotecnologia tem utilizado cepas bioengenheiradas, ou seja, modificadas geneticamente, para produção de produtos comercialmente importantes como insulina, fatores de crescimento e anticorpos (Walsh, 2005; Graumann & Premstaller, 2006).

O metabolismo pode ser chamado de "motor de química", que impulsiona o processo da vida, enquanto a engenharia metabólica pode ser definida como uma modificação dirigida do metabolismo e propriedades das células através da introdução e modificação dos caminhos metabólicos usando técnicas de DNA recombinante. O advento da técnica do DNA recombinante permitiu modificar vias metabólicas, através de alterações genéticas de alvos específicos ao invés de tratar a célula como uma caixa preta, como era anteriormente. A abordagem clássica da engenharia metabólica requer o conhecimento detalhado da cinética enzimática, a rede de reações do sistema e os intermediários envolvidos, e sobre tais bases, a manipulação genética é proposta para alguns supostos benefícios (Malik & Roy, 2005).

Escherichia coli é um micro-organismo bem caracterizado, com um conjunto de ferramentas prontamente disponíveis para a manipulação genética. Além disso, sua regulação fisiológica também já é bastante conhecida. Com isso, *E. coli* tem sido um hospedeiro adequado, sendo utilizada para a produção de valiosos metabólitos (Atsumi *et al.*, 2008). *Citrobacter freundii*, por sua vez, também é um micro-organismo passível de manipulação genética visto que os genes das bactérias são bem definidos e existe uma biblioteca genômica disponível para consultas e eventuais e estudos (Badger *et al.*, 1999).

I.5- Rede Metabólica

Redes metabólicas são grandes sistemas de reações químicas que servem a dois propósitos principais. A primeira é a de converter fontes de energia presentes no ambiente em formas de energia útil para um organismo. A segunda é a de sintetizar pequenas moléculas necessárias para o crescimento das células a partir de nutrientes presentes no ambiente. Estas pequenas moléculas são normalmente formadas por cerca de 20 aminoácidos encontrados nas proteínas, nucleótidos do DNA, nucleótidos de RNA,

lípidios, e vários co-fatores de enzimas. Para cumprir o duplo propósito do metabolismo, a rede metabólica de um organismo livre requer centenas de reações ou mais, dependendo da complexidade do meio em que este se encontra. A maioria destas reações é catalisada por enzimas, que são codificados por genes. Juntos, eles realizam o complexo de transformações químicas necessárias para sustentar a vida (Wagner, 2012).

A estrutura, função e evolução das redes metabólicas têm atraído um grande quantidade de pesquisas interessantes por muitas décadas. Trabalhos mais antigos se concentram principalmente em pequenas redes, que compreende uma pequena quantidade de reações, ou uma seqüência linear de reações. Análise experimental de tais sistemas de pequena escala envolve bioquímica clássica, incluindo as medições das concentrações das enzimas, atividades enzimáticas, constantes de velocidade de reação, ou fluxos metabólicos - taxas em que as enzimas convertem substratos em produtos. Modelos quantitativos de tais sistemas são normalmente modelos cinéticos que usam equações diferenciais ordinárias para estudar as mudanças nas concentrações dos metabólitos ao longo do tempo. Os parâmetros destas equações incluem quantidades bioquimicamente mensuráveis, tais como as citadas anteriomente (Wagner, 2012).

I.5.1- Modelos Matemáticos para descrição de redes metabólicas

O crescimento microbiano é um processo extremamente complexo envolvendo inúmeras reações metabólicas e mecanismos regulatórios. Sendo assim, qualquer modelo de crescimento microbiano requer algum nível de abstração (Narang, 1998).

Os modelos de crescimento não estruturados assumem que a taxa específica de crescimento segue a cinética de Monod para cada substrato e a interação dos susbtratos é mutuamente inibitória. Como esses modelos são privados de variáveis fisiológicas ou assumem que estas não afetam a taxa específica de crescimento, eles não permitem explorar as bases fisiológicas do crescimento celular. Um modelo estruturado, pioneiro da abordagem cibernética, baseia-se na premissa que a descrição dos mecanismos regulatórios pode ser substituída por princípios de otimalidade que, assume-se, são seguidos por micro-organismos. Os benefícios da abordagem cibernética estão na descrição suscinta do crescimento à custa de informações sobre os mecanismos regulatórios (Narang, 1998).

I.5.2- Fundamentos da rede metabólica

Os fundamentos da Rede Metabólica baseiam-se nos seguintes pontos (Varner e Ramkrishna, 1999):

1. A rede metabólica tem objetivos fisiológicos, com *pools* limitados de recursos celulares. O microrganismo direciona a síntese e a atividade das enzimas para mediar o funcionamento da rede de tal forma que seus objetivos fisiológicos são atingidos de modo otimizado com respeito a falta destes recursos (pressão evolucionária);
2. Tanto a expressão como a atividade das enzimas que catalisam a funcionalidade da rede são reguladas pelas variáveis de controle cibernéticas que direcionam a operação da rede através dos objetivos fisiológicos de forma otimizada;
3. A estrutura geométrica da rede metabólica permite "enxergar" a natureza da configuração regulatória que governa o processo evolutivo. Existe uma relação entre a função da via metabólica e sua *forma topológica* (a realização topológica da rede metabólica é definida como um conjunto de vias elementares, que juntas criam a estrutura da rede, isto é , as realizações topológicas não são únicas);
4. A regulação da via elementar não é necessariamente única. Isto será uma consequência da propriedade diversificada da realização topológica;
5. A estrutura regulatória da rede metabólica é uma consequência da realização topológica. Os elementos isolados de uma rede metabólica têm objetivos locais que estão sujeitos às restrições dadas pelos recursos disponíveis ao microrganismo para operar a *via elementar* (uma via elementar, por definição, é considerada isolada, ou seja, é um elemento local do mapa metabólico global). A única influência sentida pela via elementar da porção restante da rede é através das conexões de fluxo (entrada e saída de material).

Ou seja, um mapa metabólico não é um grupo isolado de vias elementares que atuam de forma independente uma das outras em termos regulatórios, sendo possível admitir que os elementos isolados de uma via formam uma rede coesa coordenada, onde as unidades individuais se comunicam entre si. Deste modo, existe uma estrutura hierárquica de controle que possui como base o conceito da via elementar.

I.5.3- A abordagem cibernética

A abordagem cibernética simula mecanismos de regulação celular e as mudanças no uso de substrato baseado em alterações ambientais. A premissa é que uma célula regula a expressão e a atividade das suas enzimas para atingir objetivos. Assim, ao quantificar estes processos regulatórios, definem-se funções objetivo para síntese de produto e utilização de substrato pelas enzimas envolvidas. A partir destas funções objetivo, fatores cibernéticos são deduzidos e aplicados nas taxas de reação e a expressão das enzimas para descrever a competição enzimática que otimiza o consumo de substrato e a síntese de produtos (Varner e Ramkrishna, 1999). Utiliza-se cinética de Monod para as taxas específicas de reação e as taxas específicas de expressão enzimática.

Quando ocorre a competição entre duas enzimas, a enzima com maior velocidade tem tanto a sua atividade quanto sua expressão elevadas, à custa dos competidores mais lentos, otimizando o processo celular.

A maquinária regulatória realiza as funções cibernéticas, alocando continuamente os recursos necessários aos sistemas de síntese de proteínas da maquinária adaptativa. Uma vez sintetizadas as proteínas-chave, a maquinária permanente executa as reações necessárias a replicação do material celular e a maquinária adaptativa controla as mudanças metabólicas ocasionadas como respostas às variações no ambiente extracelular, controlando a síntese de proteínas-chave (Figura II.10).

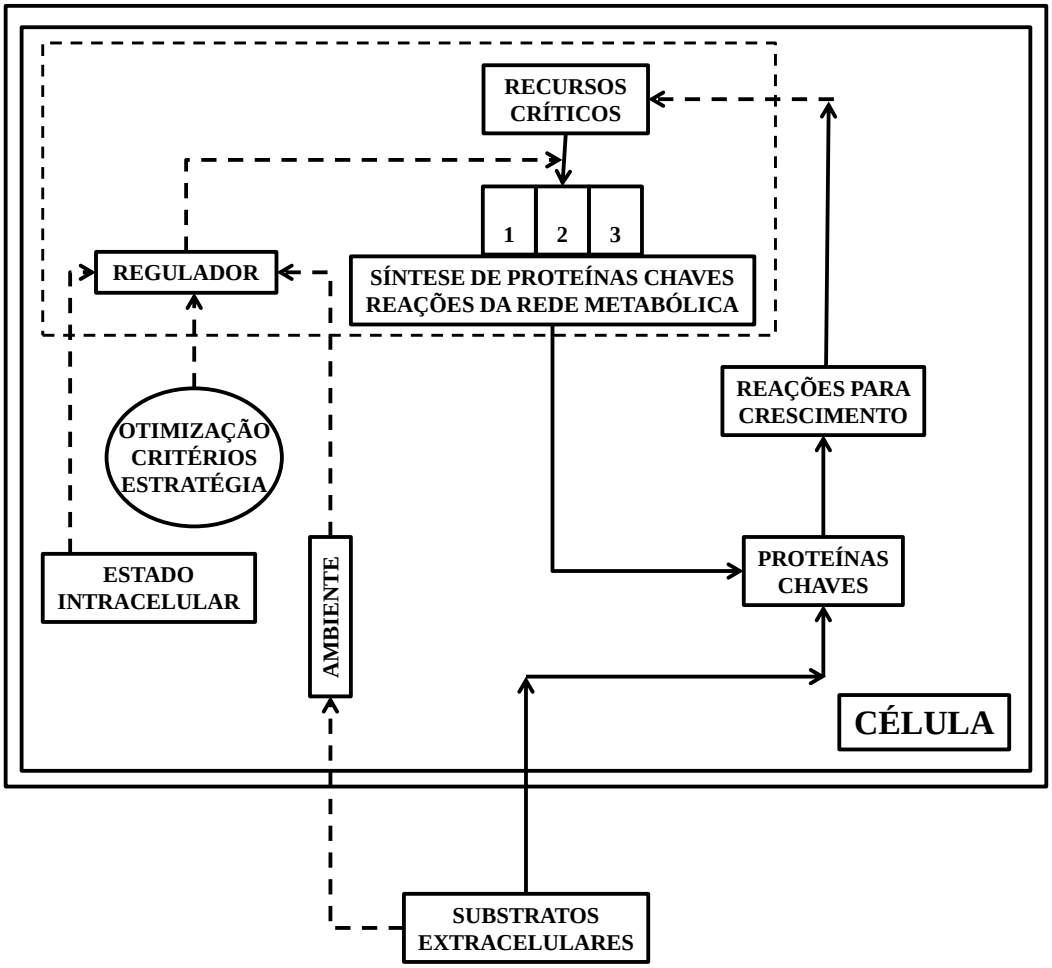

Figura I.10 – Representação esquemática de uma célula como um sistema cibernético (Adaptado de Dhurjati *et al.* 1985).

I.5.3.1- As variáveis cibernéticas

Os componentes de controle do processo biológico são definidos através de variáveis cibernéticas em três níveis:

- Componente Base: componente regulatório elementar cuja regulação encontra-se associada as *vias elementares* que constituem a realização topológica da rede metabólica;
- Componente Regulatório Local: construído a partir dos componentes elementares e governa a interação entre eles;

- Componente Global: ação regulatória que consiste de sinais de controle nutricionais e topológicos, coordenando a atividade de todas as redes metabólicas locais.

I.5.4- Rede Metabólica para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol

Desde meados de 1980, as vias metabólicas e a cinética enzimática de produção de 1,3-PDO têm sido estudadas. Estes estudos têm sido realizados devido aos avanços da bioquímica e têm melhorado nossa compreensão sobre a rede metabólica. Com base nestes estudos, a bioquímica de produção de 1,3-PDO foi elucidada em detalhes.

As enzimas do metabolismo de glicerol são glicerol desidratase (GDHt), 1,3-propanodiol oxidoredutase (PDOR), glicerol desidrogenase (GDH) e dihidroxiacetona fosfato quinase (DHAK). A assimilação do glicerol envolve duas vias paralelas: a via redutora e a via oxidativa. A via redutora é realizada em duas etapas enzimáticas. A primeira enzima GDHt, vitamina B_{12} dependente, remove uma molécula de água do glicerol, formando 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), que, em seguida, é reduzido a 1,3-propanodiol (1,3-PDO) por uma segunda enzima, PDOR, ligada a $NADH.H^+$. Por outro lado, na via oxidativa, o glicerol é desidrogenado a dihidroxiacetona (DHA) através da enzima GDH, ligada a NAD^+. Este por sua vez, é convertido a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) pela enzima DHAK, dependente de ATP (Saxena *et al.*, 2009). A rede metabólica de consumo de glicerol está descrita na Figura II.11.

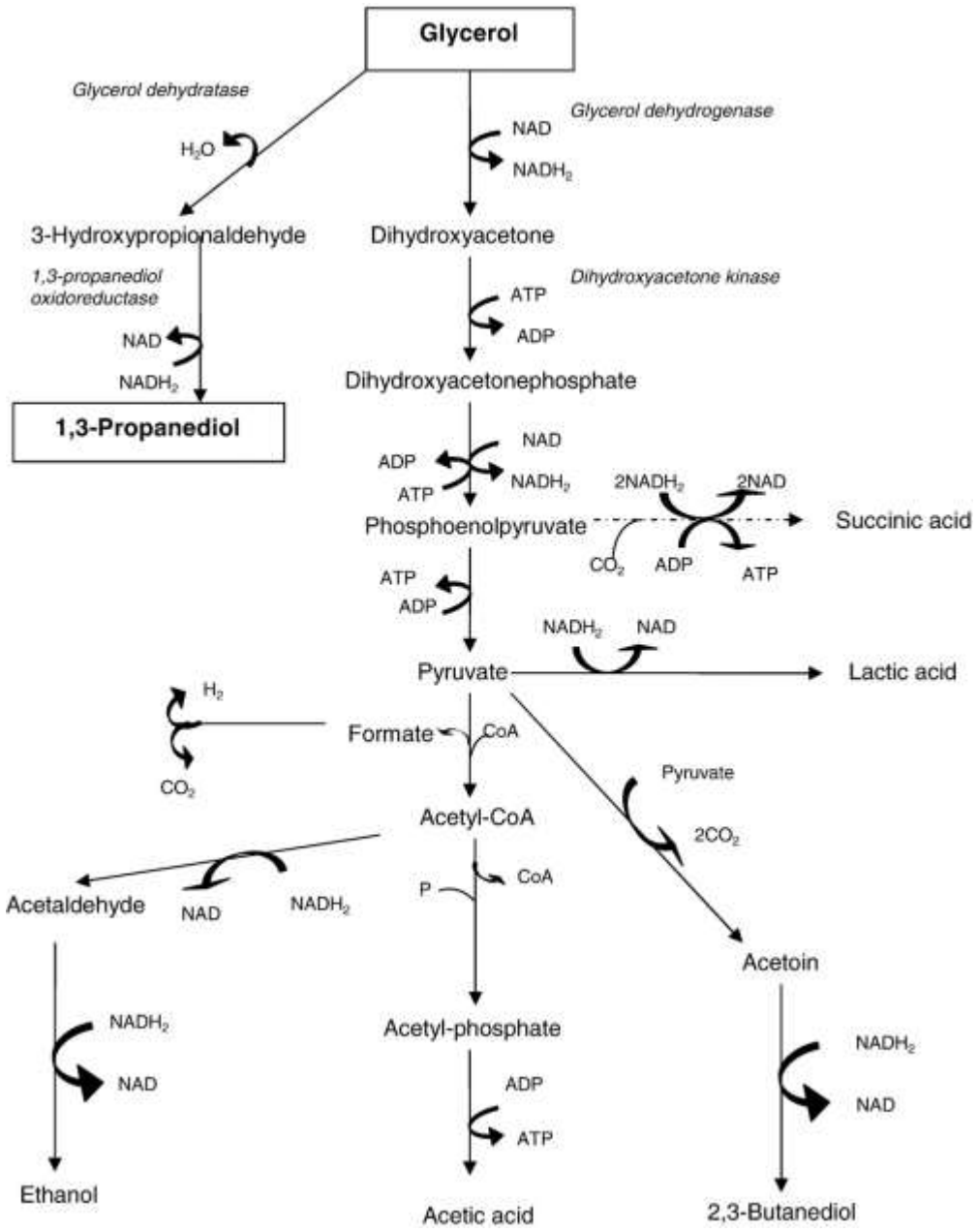

Figura I.11 – Rede metabólica para consumo do glicerol (Saxena et al., 2009).

A primeira enzima da fermentação de glicerol, GDHt requer adenosilcobalamina que remove uma molécula de água do glicerol para formar 3-HPA, por um mecanismo de radicais. GDHt sofre um mecanismo de inativação pelo glicerol durante a catálise. A inativação por glicerol foi demonstrada e descrita através da clivagem irreversível da ligação Co-C da coenzima B_{12}, formando 5'-desoxiadenosina e uma espécie de cobalamina. A inativação irreversível da enzima se dá devido a sua forte ligação com a coenzima

modificada. Holoenzima de GDHt também sofre inativação por O_2, na ausência de substrato . A formação de OH-Cbl após inativação indica que esta é causada pela reação da ligação ativa Co-C da coenzima com O_2. GDHt em células permeabilizadas (*in situ*) de *K. pneumoniae* sofre reativação rápida por troca da coenzima modificada para adenosilcobalamina intacta na presença de ATP e de Mg^{2+} (ou Mn^{2+}) (Saxena *et al.*, 2009).

A segunda enzima de metabolismo de glicerol, PDOR, catalisa a transferência de equivalente redutor do NADH para o 3-HPA, aumento o rendimento em 1,3-PDO. PDOR foi purificada a partir de *L. brevis* e *L. buchneri*. Esta enzima é sintetizada durante a co-fermentação de glicerol com açúcar e necessita de Mn^{2+}, sendo um octâmero com uma massa molecular de 350 kDa. As enzimas isoladas de ambas as cepas apresentam propriedades muito semelhantes as relatadas para *K. pneumoniae*. Porém, quando a mesma enzima de *L. reuteri* foi comparada com a de outros lactobacilos, verificou-se ser diferente. No entanto, todas as cepas de lactobacilos testadas fermentam glicose com glicerol e produzem 1,3-PDO de modo semelhante. PDOR também foi purificado a partir de *E. agglomerans* CNCM1210 por Barbirato *et al.* (1996). A atividade ótima da enzima era em pH 7-8 e a enzima é inibida de forma competitiva por NAD^+ (Ki = 0,29 mM). PDOR purificado a partir de *C. freundii* é um octâmero de um polipeptídeo com 43,4 KDa. Quando testado como uma desidrogenase, o substrato preferido foi o 3-HPA. Os valores de K_m aparentes da enzima para o 3-HPA e o NADH foram 140 µM e 33 µM, respectivamente. A enzima sofre inibição por agentes quelantes contendo cátions divalentes. PDOR foi purificado a partir de *C. butyricum* E5. A enzima nativa tem massa molecular de 384,2 ± 31,1 KDa e existe como um octâmero ou um decâmero de subunidades com massas moleculares idênticas. O valor de K_m aparente da enzima para o 3-HPA e para o NADH é 0,17 mM e 0,06 mM, respectivamente. Esta enzima requer apenas Mn^{2+} para sua atividade e tem propriedades semelhantes a da *K. pneumoniae* (Saxena *et al.*, 2009).

II– OBJETIVO

Com base na importância do 1,3-PDO discutidas no Capítulo II e as inúmeras aplicações existentes para o produto em questão, neste trabalho visou-se produzir 1,3-PDO a partir de glicerina por via biotecnológica. Embora o 1,3-PDO já seja produzido industrialmente por um processo fermentativo, a matéria-prima utilizada neste trabalho está disponível em grande quantidade e baixo custo em nosso país, e o entendimento das vias metabólicas do microrganismo produtor , assim como, dos parâmetros envolvidos no processo direcionará os controles mais importantes do processo e os subprodutos que serão formados.

Primeiramente, foram testadas algumas linhagens selvagens capazes de converter glicerol em 1,3-PDO, além de uma cepa de *Escherichia coli* modificada geneticamente e uma cepa de *Citrobacter freundii* também modificada geneticamente, ambas obtidas em cooperação com o LAMMP (Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteômica do Instituto de Química da UFRJ. A cepa selvagem de *Citrobacter freundii* apresentou maior capacidade de conversão e maior produtividade nessa etapa preliminar. Sendo assim, essa cepa foi escolhida para ser estudada em maior escala (biorreator de 1 L).

A fim de gerar uma ferramenta para simulação e otimização da produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol utilizando *Citrobacter freundii*, realizou-se a modelagem matemática da rede metabólica envolvida em tal conversão utilizando-se a abordagem cibernética.

II.1 – Objetivos do Trabalho

O objetivo principal deste projeto consistiu em produzir 1,3-propanodiol a partir de glicerol por via microbiológica, estudando mais a fundo a rota utilizada por *Citrobacter freundii* a fim de desenvolver um modelo metabólico para descrever tal bioconversão.

Para alcançar este objetivo principal foram realizadas as seguintes etapas:

1. Seleção da melhor linhagem produtora de 1,3-PDO dentre as linhagens disponíveis para o estudo (cepas selvagens e cepas recombinantes bacterianas, de manuseio

seguro, obtidas no Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteômica do Instituto de Química da UFRJ).

2. Caracterização das condições de cultivo desta linhagem, incluindo composição do meio de cultivo e diferentes estratégias operacionais.
3. Análise quantitativa do consumo de glicerol e da produção de 1,3-PDO e principais subprodutos por HPLC.
4. Desenvolvimento de um modelo cibernético visando à simulação e otimização do sistema.
5. Dimensionar o mercado brasileiro de 1,3-propanediol.

III- METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS

III.1- Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram: peptona bacteriológica (*Oxoid* - Hampshire, UK), extrato de lêvedo (*Oxoid* - Hampshire, UK), glicose P.A. (*Vetec* - RJ, Brasil), glicerina P.A. (*Vetec* - RJ, Brasil) e agar (*Vetec* - RJ, Brasil). Foram utilizados também dois meios de cultivo formulados industrialmente: *Lactobacilli MRS Broth* (Acumedia) e *LB Broth Base* (Invitrogen).

A glicerina utilizada foi gentilmente cedida pelo CENPES sendo proveniente de uma planta piloto de produção de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol via catálise básica. Segundo o CENPES, o pré-tratamento da glicerina foi apenas um processo de adequação do teor de água, porém uma pré-caracterização desta glicerina foi realizada e indicou que esta possui cerca de 82,5 % de glicerol e pH próximo do neutro (pH=6,7), ou seja, possivelmente essa glicerina foi submetida a uma etapa de neutralização.

III.2 - Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises foram:

1) Centrífuga Eppendorf 5804R
2) Espectrofotômetro Bell SP 2000 UV;
3) Capela de fluxo laminar BioFlux II 90A;
4) Incubador com agitação (*shaker*) Tecnal TE-420;
5) pHmetro Digimed DM-22;
6) Autoclave vertical Prismatec modelo CS;
7) Biorreator Tecnal TEC-Bio-1,5;
8) HPLC Waters 1525;
9) Detector IR Waters 2414.

III.3 – Micro organismos

As bactérias utilizadas no presente trabalho foram:

- *Citrobacter freundii* ATCC 8090, gentilmente cedida pelo CENPES;
- *Lactobacillus brevis* ATCC 367, gentilmente cedida pelo CENPES;
- *Escherichia coli* pBAD, obtida no LaMMP / IQ / UFRJ;
- *Escherichia coli* pTrc, obtida no LaMMP / IQ / UFRJ;
- *Citrobacter freundii modificada*, obtida no LaMMP / IQ / UFRJ.

III.3.1 - Preservação

As células foram conservadas a 4ºC após 48 horas de crescimento em tubos de ensaio contendo Meio LB Agar para as cepas de *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli* e Meio MRS Agar para a cepa de *Lactobacillus brevis*. Sendo que para a cepa de *L. brevis* foi necessário purgar nitrogênio no tubo de ensaio para retirar o excesso de oxigênio, e em seguida, vedá-lo.

III.3.2- Meios de cultivo

Os meios de cultivo utilizados nos repiques e pré-inóculo foram:

- Meio LB Agar - composição (em p/v): peptona 1%, extrato de levedo 0,5%, NaCl 0,5% e 1,2% agar-agar.
- Meio LB *Broth* Base (Invitrogen) – obtido comercialmente.
- Meio *Lactobacilli* MRS *Broth* (Acumedia) – obtido comercialmente.
- Meio *Lactobacilli* MRS *Broth* Agar (Oxoid) – obtido comercialmente.

III.4 – Experimentos preliminares

III.4.1- Inóculo

O inóculo dos experimentos preliminares foi obtido a partir dos tubos contendo as células preservadas em gelose inclinada (descritas no item III.3.1). Estas eram transferidas, de forma estéril, com uma alça de platina para erlenmeyers contendo o respectivo meio de cultivo. Após cerca de 24 horas (esse tempo foi reduzido para aproximadamente 16 horas para as cepas de *E. coli*) em um incubador rotatório a 30ºC e 200 rpm, em seguida as células eram centrifugadas de forma estéril a 6000 rpm por 15 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio de cultivo com concentração celular especifica para inocular os meios de cultivo que serão descritos a seguir. O volume centrifugado deste pré-inóculo era suficiente para se obter a concentração inicial de células desejada nos meios de cultivo.

III.4.2 - Experimentos Preliminares

Os experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de estudar o consumo de glicerina e a produção de 1,3-PDO nas linhagens disponíveis para este trabalho. Esses experimentos foram realizados utilizando-se uma relação volume de frasco: volume de meio de 2:5 a 30ºC em incubador rotatório (*shaker*) com agitação de 200 rpm por 30 horas de cultivo. Foram feitas amostragens para análise de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e co-produtos. O pH foi também analisado ao final de cada experimento.

III.4.2.1 - Experimentos com *Citrobacter freundii* ATCC 8090

Os primeiros experimentos foram realizados com intuito de avaliar a capacidade da cepa *C. freundii* ATCC 8090 em assimilar o glicerol, assim como produzir o 1,3-PDO. Para tal, foram realizados dois experimentos utilizando meios de cultivo elaborados a partir Boenigk *et al.* (1993). Os meios encontram-se descritos na Tabela IV.1.

Tabela III.1 – Meios de cultivo utilizados nos experimentos preliminares com *Citrobacter freundii* ATCC 8090.

Meio 1	Meio 2
20g/L glicerol P.A.	20g/L glicerol P.A.
14 g/L K_2HPO_4	14 g/L K_2HPO_4
6 g/L KH_2PO_4	6 g/L KH_2PO_4
3 g/L $(NH_4)_2SO_4$	3 g/L $(NH_4)_2SO_4$
0,2 g/L $MgSO_4.7H_2O$	0,2 g/L $MgSO_4.7H_2O$
12 mg/L $CoCl_2.6H_2O$	12 mg/L $CoCl_2.6H_2O$
0,2 g/L extrato de levedo	0,05 g/L $CaCl_2.2H_2O$
1 ml/L solução traço	0,01 g/L $FeSO_4.7H_2O$
0,2 g/L cisteína-HCl	0,01 g/L $MnCl_2.4H_2O$
pH = 7,0	1 ml/L solução traço
	0,2 g/L cisteína-HCl
	pH = 7,0

A solução traço utilizada foi SL4[2] (Pfennig & Lippert, 1966).

Uma vez que a cepa mostrou-se capaz de consumir glicerol e produzir 1,3-PDO, foi realizado outro experimento utilizando o Meio 1, o qual apresentou melhor resultado, porém substituindo 20 $g.L^{-1}$ de glicerol por 20 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta. Este experimento teve o objetivo de avaliar a capacidade da cepa *C. freundii* ATCC 8090 em converter glicerina bruta em 1,3-PDO.

III.4.2.2- Experimentos com *Lactobacillus brevis* ATCC 367

O primeiro experimento foi realizado com intuito de avaliar a capacidade da cepa em assimilar o glicerol e produzir 1,3-PDO. Para tal, formulou-se um meio mínimo para o crescimento de *Lactobacillus brevis*, baseado no estudo dos nutrientes essenciais para o micro organismo em questão. O meio encontra-se descrito na Tabela IV.2.

[2] 0,2 $g.L^{-1}$ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 $g.L^{-1}$ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,003 $g.L^{-1}$ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,03 $g.L^{-1}$ H_3BO_3, 0,02$g.L^{-1}$ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,001 $g.L^{-1}$ $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,002 $g.L^{-1}$ $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,003 $g.L^{-1}$ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$.

Tabela III.2 - Meio de cultivo utilizado nos experimentos preliminares com *Lactobacillus brevis* ATCC 367.

5 g/L extrato de levedo
5 g/L CH_3COONa
2,3 g/L Na_2HPO_4
2,5 g/L $(NH_4)_2Cl$
0,2 g/L $MgSO_4.7H_2O$
56 mg/L $MnSO_4.XH_2O$
20g/L glicerol P.A.
20g/L glicose
pH = 6,5

Os experimentos seguintes foram realizados com intuito de avaliar a capacidade da cepa em converter glicerina bruta em 1,3-PDO. Para tal, foram realizados dois experimentos em meio *Lactobacilli MRS Broth*: um contendo glicerol P.A. (controle) e outro contendo glicerina bruta como mostra a Tabela IV.3.

Tabela III.3 – Meios de cultivo utilizados nos experimentos preliminares com *Lactobacillus brevis* ATCC 367.

Meio 1	Meio 2
20 g/L glicerol P.A.	20 g/L glicerina bruta
55 g/L MRS Broth	55 g/L MRS Broth

III.4.2.3 - Experimentos com *Citrobacter freundii* modificada

Como pode ser observado no esquema metabólico apresentado na Figura II.11, existe um balanço finamente controlado da utilização de NAD^+ e $NADH.H^+$ no metabolismo de glicerol por *Citrobacter freundii*. Tendo em vista que a via metabólica de conversão de glicerol a 1,3-PDO expressa em *C. freundii* leva ao consumo de $NADH.H^+$, um aumento do *pool* desse poder redutor poderia beneficiar a produção de 1,3-PDO.

A enzima formiato desidrogenase de *Citrobacter freundii* é responsável pela reação de conversão de formiato a gás carbônico, reduzindo a molécula mediante a liberação de hidrogênio (H_2). A levedura *Candida boidinii* possui uma proteína análoga, Fdh1p, que também converte formiato a gás carbônico; no entanto esta enzima utiliza o NAD^+ como receptor de elétrons e produz $NADH.H^+$ ao invés de hidrogênio (Berrios-Rivera *et al.*,

2002). Sendo assim, uma inserção da Fdh1p de *C. boidinii* em *C. freundii* aumentaria a geração de $NADH.H^+$ e, conseqüentemente, a síntese de 1,3-PDO.

Para tal, o gene *FDH1* foi clonado no vetor comercial pACYC tendo sua expressão constitutiva regulada pelo promotor cat, que confere resistência ao cloranfenicol e encontra-se presente naturalmente no vetor. A Figura IV.1 apresenta um esquema do plasmídeo pACYCA, contendo o gene *FDH1*, que foi inserido na *Citrobacter freundii* ATCC 8090. Esse procedimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteômica (LaMMP) do Instituto de Química da UFRJ.

Com o intuito de verificar a capacidade da nova cepa construída de *C. freundii* em converter glicerina bruta em 1,3-PDO, realizou-se o mesmo experimento realizado com a *C. freundii* selvagem (ATCC 8090) descrito no item IV.4.2.1. A cepa foi crescida no Meio 1 (Tabela IV.1) porém substituiu-se glicerol por glicerina bruta. Foram realizados dois experimentos: um na presença de antibiótico (34 $\mu g.L^{-1}$ de clorofenicol) e um na ausência de antibiótico a fim de investigar a estabilidade da cepa construída, ou seja, se o antibiótico é necessário também na etapa de produção ou basta somente sua adição no pré-inóculo.

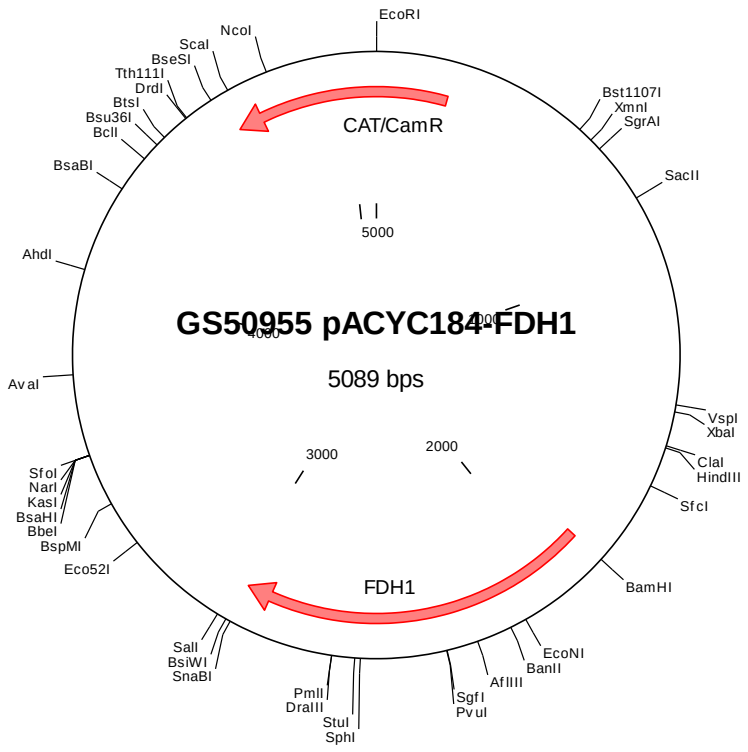

Figura III.1 - Plasmídeo pACYCA, contendo o gene *FDH1*.

III.4.2.4- Experimentos com *Escherichia coli* modificadas

Como já descrito no item II.3.2, existem vários micro organismos capazes de produzir 1,3-PDO a partir de glicerol, como por exemplo, *Lactobacillus brevis*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*; porém a grande maioria se utiliza de uma via metabólica dependente de vitamina B12, o que encarece a produção industrial do 1,3-PDO. A bactéria *Clostridium butyricum*, no entanto, possui uma via metabólica independente de vitamina B12 cujos genes já foram completamente seqüenciados (Raynaud *et al.*, 2003).

Sendo assim, clonou-se os genes responsáveis pela produção de 1,3-PDO a partir de glicerol de *C. butyricum* em *Escherichia coli*, um organismo que possui sistemas de expressão plenamente elucidados e de fácil manipulação genética.

Os vetores de expressão escolhidos foram dois vetores comerciais: o pTrc99A, que possui sua expressão regulada pela adição de IPTG (isopropil-b-D-tiogalactopiranosideo) e o pBAD, que possui sua expressão regulada pela adição de arabinose. Ambas apresentam resistência a ampicilina. O procedimento de obtenção das cepas de *E. coli* modificadas, denominadas de pTrc e pBAD, respectivamente, foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteômica (LaMMP) do Instituto de Química da UFRJ.

Os experimentos com as cepas pTrc e pBAD foram realizados em duas etapas: a primeira etapa ocorreu em aerobiose para geração de biomassa e a segunda etapa ocorreu em anaerobiose com o intuito de produzir 1,3-PDO. Inicialmente inoculou-se em Meio LB 2% contendo 100 µg/mL de ampicilina. Após 16 horas, as células foram centrifugadas e suspensas em um meio obtido de Tang *et al.*(2009) para produção de 1,3-PDO. Em seguida, purgou-se nitrogênio para tornar o ambiente anaeróbio e após 30 minutos de adaptação, adicionou-se 20 mL de solução de lactose 10 % para a cepa pTrc e 2 mL de solução de arabinose 20 % para a cepa pBAD, ambas com o intuito de induzir a produção de 1,3-PDO. O meio utilizado na etapa anaeróbia encontra-se descrito na Tabela IV.4.

Tabela III.4 - Meio de cultivo utilizado nos experimentos preliminares com *Escherichia coli* pTrc e pBAD.

9 g/L extrato de levedo
20 mM KH_2PO_4
25 mM K_2HPO_4
4 mM $MgSO_4$
28 mM $(NH_4)_2SO_4$
30 g/L glicerol P.A.
pH = 6,8

III.5– Experimentos com *Citrobacter freundii* ATCC 8090

III.5.1– Otimização da concentração de L-cisteína

Como já foi explicado no capítulo II, o glicerol é convertido em 1,3-PDO através de duas etapas. Na primeira etapa, a enzima glicerol desidratase catalisa a remoção de uma molécula de água do glicerol, produzindo 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA). Na segunda etapa, a enzima 1,3-propanodiol oxidoredutase reduz o 3-HPA a 1,3-PDO simultaneamente

a oxidação da forma reduzida do co-fator nicotinamida adenina dinucleotídeo ($NADH.H^+$) para sua forma oxidada, NAD^+ (Nakamura & Whitedy, 2003). Sendo assim, é necessário a adição de um agente redutor ao meio de cultivo a fim de aumentar a capacidade de reduzir o NAD^+ a $NADH.H^+$, aumentando assim o pool de $NADH.H^+$ para produção de 1,3-PDO.

Devido ao baixo p*Ka* da cisteína esta se oxida de forma seletiva (Rhee *et al*., 2000). Assim, a cisteína reduz NAD^+ a $NADH.H^+$, aumentando a disponibilidade da forma reduzida de NAD. Contudo, este aminoácido não é um agente redutor barato, sendo necessário a otimização da sua concentração no meio de cultivo.

Os experimentos foram realizados em condições anaeróbias em Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio líquido a 30 ºC em incubador rotatório (*shaker*) com agitação de 200 rpm e inóculo de aproximadamente 1,0 $mg.mL^{-1}$ de células. Esses experimentos foram realizados por 48 horas com amostragem para análise de crescimento celular, medida de pH, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e coprodutos.

O meio de cultivo utilizado foi o descrito como Meio 1 na Tabela IV.1, adaptado de Barbirato *et al.* (1998) e Boenigk *et al.* (1993), porém variou-se a concentração de cisteína como mostra a Tabela IV.5.

Tabela III.5 – Concentrações de cisteína nos diferentes meios de cultivos testados para produção de 1,3-PDO por *Citrobacter freundii* ATCC 8090.

Meio	[L-cisteína] ($g.L^{-1}$)
1	0,05
2	0,10
3	0,15
4	0,20
5	0,25

III.5.2– Estudo da inibição da produção de 1,3-propanodiol

A inibição da produção de 1,3-PDO em fermentações a partir de glicerol tem sido estudada (Barbirato *et al.*, 1996; Colin *et al.*, 2000). O responsável pela inibição parece ser o 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), que é um intermediário intracelular que normalmente não se acumula. Portanto, em condições de elevado excesso de glicerol esse intermediário pode ser excretado no meio. Barbirato *et al.* (1996) verificaram que *Enterobacter agglomerans* CNCM1210, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 e *Citrobacter freundii*

ATCC 8090 eram totalmente inibidas quando a concentração de 3-HPA atingia 2,2 $g.L^{-1}$, cessando, assim, o crescimento celular e o consumo de glicerol. A cepa *E. agglomerans* CNCM1210 foi crescida em quatro diferentes concentrações de glicerol (22,0; 34,0; 44,2 e 76,4 $g.L^{-1}$) e verificou-se o completo consumo de glicerol e a ausência de 3-HPA nas duas concentrações inferiores. Já nas concentrações superiores, o glicerol não foi totalmente consumido, nos dois experimentos a atividade microbiana foi totalmente inibida após o consumo de 39,5 $g.L^{-1}$ de glicerol. As cepas *K. pneumoniae* ATCC 25955 e *C. freundii* ATCC 8090 foram crescidas em duas diferentes concentrações de glicerol (22,0 e 68,0 g.L-1) e verificou-se o completo consumo do glicerol nas duas condições, sendo que na concentração inferior não houve presença de 3-HPA no meio. Porém, na concentração superior o intermediário 3-HPA atingiu a concentração de 1,78 $g.L^{-1}$ e 1,26 $g.L^{-1}$ no meio para as cepas *K. pneumoniae* ATCC 25955 e *C. freundii* ATCC 8090, respectivamente. Contudo, em seguida este foi convertido em 1,3-PDO.

Esta etapa teve como objetivo estudar a inibição da produção de 1,3-PDO a partir de glicerina proveniente da produção de biodiesel utilizando-se a cepa *C. freundii* ATCC 8090. A inibição da produção de 1,3-PDO nesta cepa já foi estudada, porém utilizando-se glicerol puro. A glicerina bruta, proveniente da síntese de biodiesel apresenta geralmente 55-90% de pureza. O resto da glicerina bruta é composto por triglicerídeos e metanol não convertidos, biodiesel, sabões e contaminantes (Amaral *et al.*, 2009), o que também pode causar inibição do metabolismo microbiano.

Os experimentos foram realizados em condições anaeróbias em Erlenmeyer adaptados (Volume de frasco: Volume de meio = 2:5) a 30 ºC em incubador rotatório (shaker) com agitação de 200 rpm e inóculo de aproximadamente 1,0 $mg.mL^{-1}$. Esses experimentos foram realizados por 24 horas com amostragem para análise de crescimento celular, medida de pH, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e coprodutos.

O meio de cultivo utilizado foi o descrito como Meio 1 na Tabela IV.1, adaptado de Barbirato *et al.* (1998) e Boenigk *et al.* (1993), porém variou-se a concentração de glicerina bruta como mostra a Tabela IV.6.

Tabela III.6 – Concentrações de glicerina nos diferentes meios de cultivos testados para produção de 1,3-PDO por *Citrobacter freundii* ATCC 8090.

Meio	$[glicerina]_{inicial}$ ($g.L^{-1}$)
1	10,0
2	20,0
3	30,0
4	40,0

III.5.3 – Experimentos em biorreator

Após o processo de otimização da concentração de L-cisteína e da concentração inicial de glicerol do meio de produção foi, então, realizado um planejamento experimental antes de iniciar os experimentos em biorreator. Esse planejamento teve como objetivo diminuir a concentração de alguns sais presentes no meio de cultivo.

A estratégia utilizada foi o delineamento composto central rotacional (DCCR) para 4 variáveis. O planejamento experimental consistiu em DCCR 2^4, mais 8 pontos axiais e 3 repetições no pontos centrais, totalizando 27 ensaios. As variáveis estudadas foram a concentração dos sais KH_2PO_4, K_2HPO_4, $(NH_4)_2SO_4$ e $CoCl_2.2H_2O$. A concentração de glicerina foi fixada em 20,0 $g.L^{-1}$, a de L-cisteína em 0,2 $g.L^{-1}$, a de $MgSO_4.7H_2O$ em 0,2 $g.L^{-1}$ e a concentração de extrato de levedo também foi fixada em 0,2 $g.L^{-1}$ visto que foi realizado um experimento com ausência desse componente (dados não apresentados) e o mesmo se mostrou essencial para o metabolismo da cepa em questão.

Com o planejamento realizado foi possível reduzir consideravelmente a concentração de alguns componentes do meio, sendo assim, o meio utilizado para a produção de 1,3-PDO nos experimentos que serão descritos a seguir utilizou a composição descrita na Tabela IV.7.

Tabela III.7 – Meio de cultivo otimizado para produção de 1,3-PDO utilizando *Citrobacter freundii* ATCC 8090.

20g/L glicerina
5,7 g/L K_2HPO_4
1,5 g/L KH_2PO_4
2,0 g/L $(NH_4)_2SO_4$
0,2 g/L $MgSO_4.7H_2O$
0,2 g/L $CoCl_2.6H_2O$
0,2 g/L extrato de levedo
1 ml/L solução traço*
0,2 g/L cisteína-HCl
pH = 7,0

*Solução traço utilizada foi a mesma descrita na Tabela IV.1, porém sem adição de $CoCl_2.6H_2O$, que já encontra-se presente no meio de cultivo em concentrações significativas.

Em seguida, iniciou-se os experimentos em biorreator. Para proliferação celular, células do meio estoque foram inoculadas em condições aeróbias em Erlenmeyer de 200 mL contendo 50 mL do meio de cultivo apresentado na Tabela IV.7 e incubadas a 30 ºC em agitador rotatório mantido a 250 rpm. Após 12 horas, o meio com as células crescidas foi inoculado no biorreator.

Os experimentos foram realizados em Biorreator Tecnal modelo TecBio 1,5 (Figura IV.2) em duas etapas. A primeira etapa foi realizada sob condições aeróbias visando somente a proliferação celular. Aproximadamente 50 mL de células crescidas, como descrito anteriormente, foram adicionados ao biorreator contendo 700 mL do meio descrito na Tabela IV.7. Após 8 horas de proliferação celular, desligou-se a aeração do sistema e iniciou-se a etapa anaeróbica alimentando o biorreator com meio mineral contendo glicerol e L-cisteína de modo que a concentração final destes fossem as concentrações otimizadas. A alimentação foi realizada purgando nitrogênio. A segunda etapa (anaeróbia) teve duração de 24 horas, com amostragem para análise de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e coprodutos.

Figura III.2 – Biorretor Tecnal modelo TecBio 1,5 utilizado nos experimentos.

III.5.4– Experimentos em agitador rotatório/ biorreator

Visto que a estratégia de realizar em biorreator a etapa aeróbia, para crescimento celular, e depois a etapa anaeróbia, para produção de 1,3-PDO, não obteve sucesso, optou-se por realizar a etapa aeróbia em agitador rotatório e a etapa anaeróbia em biorreator.

Uma alça de células conservadas em gelose foi inoculada em 4 erlenmeyers de 1.000 mL contendo 350 mL do meio descrito na Tabela IV.7. Esse erlenmeyers foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm e 30 ºC. Após 24 horas, todo o volume de meio (1,5 L) foi centrifugado e as células foram suspensas em 500 mL de meio e adicionado ao biorreator contendo também 500 mL de meio. O meio utilizado na etapa anaeróbia foi o mesmo utilizado na etapa aeróbia descrito na Tabela IV.7. A segunda etapa (anaeróbia) ocorreu a 30º C e 200 rpm com duração de 24 horas, com amostragem para análise de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e coprodutos.

III.5.5– Experimentos em biorreator: novas estratégias

III.5.5.1– Primeira Estratégia

A primeira estratégia consistiu em realizar as duas etapas em biorreator, tanto a etapa de geração de biomassa como a etapa de produção de 1,3-PDO, porém as duas em

anaerobiose. Contudo, essa estratégia não se mostrou viável, pois não houve crescimento celular em biorreator nas condições anaeróbias.

A ausência de crescimento celular em meio anaeróbio em biorreator foi um fato estranho, que levou ao questionamento dos experimentos realizados em agitador rotatório. É possível que estes não tenham sido realizados em condições anaeróbias, e sim em condições de microaerofilia.

III.5.5.2– Segunda Estratégia

A seguinte estratégia consistiu em realizar as duas etapas em biorreator, tanto a etapa de geração de biomassa como a etapa de produção de 1,3-PDO, porém a primeiro em microaerofilia e segunda em anaerobiose. A alimentação foi realizada, porém com uma concentração de glicerina menor para evitar a inibição devido ao acúmulo do intermediário, o 3-hidroxipropionaldeído.

Experimentos realizados anteriormente mostraram que a cepa *C. freundii* ATCC 8090 não apresentou inibição metabólica quando crescida em meio contendo glicerina bruta mesmo esta contendo muitas impurezas como triglicerídeos e metanol não convertidos, biodiesel, sabões e contaminantes como, por exemplo, vestígios de catalisador. Porém houve inibição da produção de 1,3-PDO em concentrações acima de 20 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta, que corresponde a aproximadamente 17 $g.L^{-1}$ de glicerol. Sendo assim, a alimentação foi realizada de maneira que a concentração de glicerol não fosse suficientemente elevada para causar a inibição da produção de 1,3-propanodiol.

Vale ressaltar que o estudo da produção de 1,3-PDO em diferentes concentrações de glicerol a fim de investigar a possível inibição causada pelo substrato foi também realizado para a cepa de *C. freundii* modificada. Contudo, os resultados obtidos foram similares aos apresentados para *C. freundii* ATCC 8090.

O pré-inóculo foi realizado em condições aeróbias em Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL do meio descrito na Tabela IV.7 a 30 ºC em incubador rotatório com agitação de 200 rpm. Após 24 horas, esses 100 mL foram adicionados ao biorreator contendo 900 mL do mesmo meio de cultivo para realização da etapa de crescimento em microaerofilia. Após certo tempo, desligou-se a aeração e entrou-se em estágio anaeróbio, alimentando o sistema com 100 mL meio contendo glicerol, extrato de levedo e L-cisteína. O experimento total foi realizado ao longo de 100 horas com amostragem para análise de crescimento celular,

consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e coprodutos. O controle do pH foi feito com adição de solução 20 % de NH_4OH.

III.5.5.3– Experimento em microaerofilia

Uma alça de células conservadas em gelose foi inoculada em 4 erlenmeyers de 1.000 mL contendo 350 mL de Meio LB 2%. Esse erlenmeyers foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm e 30 ºC. Após 24 horas, todo o volume de meio (1,5 L) foi centrifugado e as células foram suspensas em 500 mL de meio e adicionado ao biorreator contendo também 500 mL de meio. O meio utilizado na etapa anaeróbia foi o meio descrito na Tabela IV.7, porém com ausência de L-cisteína. A segunda etapa (anaeróbia) ocorreu a 30º C, 200 rpm e 1,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) com duração de 24 horas, com amostragem para análise de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e coprodutos.

III.5.6 – Estudo da produção de 1,3-PDO em microaerofilia

Com intuito de se estudar a produção de 1,3-PDO em baixas concentrações de oxigênio dissolvido realizou-se novos experimentos como o descrito no item IV.5.5.3, porém variando-se o volume de ar por volume de meio por minuto (vvm). Foram testadas as condições de 1,0, 1,5 e 2,0 vvm.

III.6 - Esterilização

Todos os componentes do meio de cultivo foram autoclavados a 0,5 atm por 15 minutos. As pipetas, os tubos de centrífuga, os filtros, o biorreator e outros instrumentos utilizados no manuseio do meio de cultivo foram autoclavados a 1 atm por 20 minutos.

III.7 - Métodos Analíticos

III.7.1 - Quantificação do Crescimento Celular

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de densidade óptica a 580 nm para *C. freundii* e 600 nm para *E. coli* e *L. brevis*, e esses valores foram convertidos para mg de peso seco de células por mL (p.s.células/mL) utilizando-se o fator de conversão obtido pelas curvas de peso seco, que estão apresentadas na Figuras IV.3, IV.4, IV.5, IV.6 e IV.7.

A curva de peso seco é obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% de NaCl). Desta suspensão, retira-se uma amostra (15 mL), que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,22 μm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições, de modo a obterem-se concentrações celulares distintas e, então, mede-se a absorvância em espectrofotômetro no devido comprimento de onda, obtendo-se a curva de peso seco.

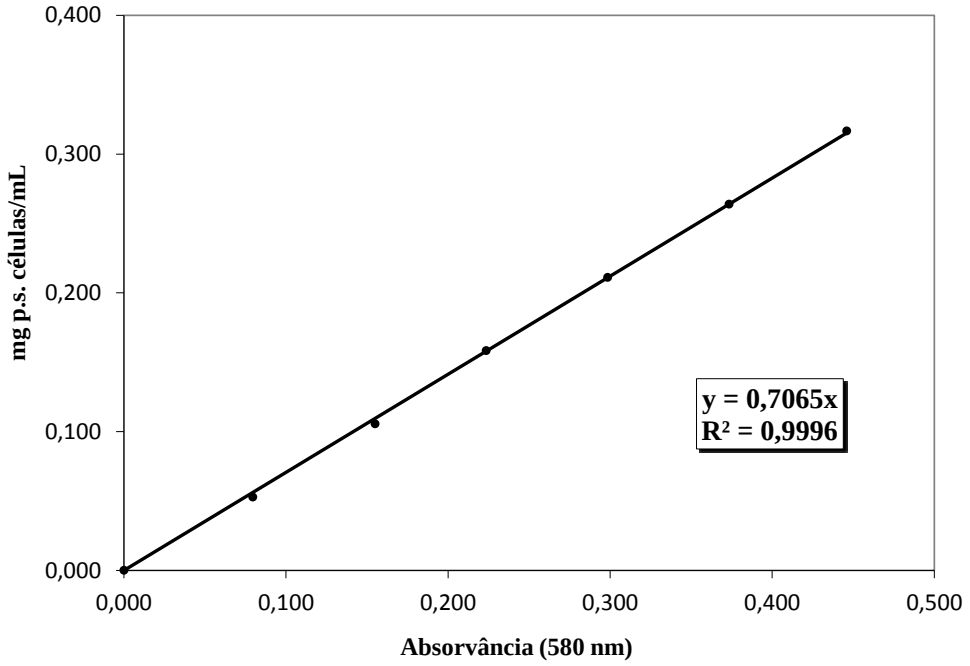

Figura III.3 – Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Citrobacter freundii* ATCC 8090 através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *BELL* SP 2000UV.

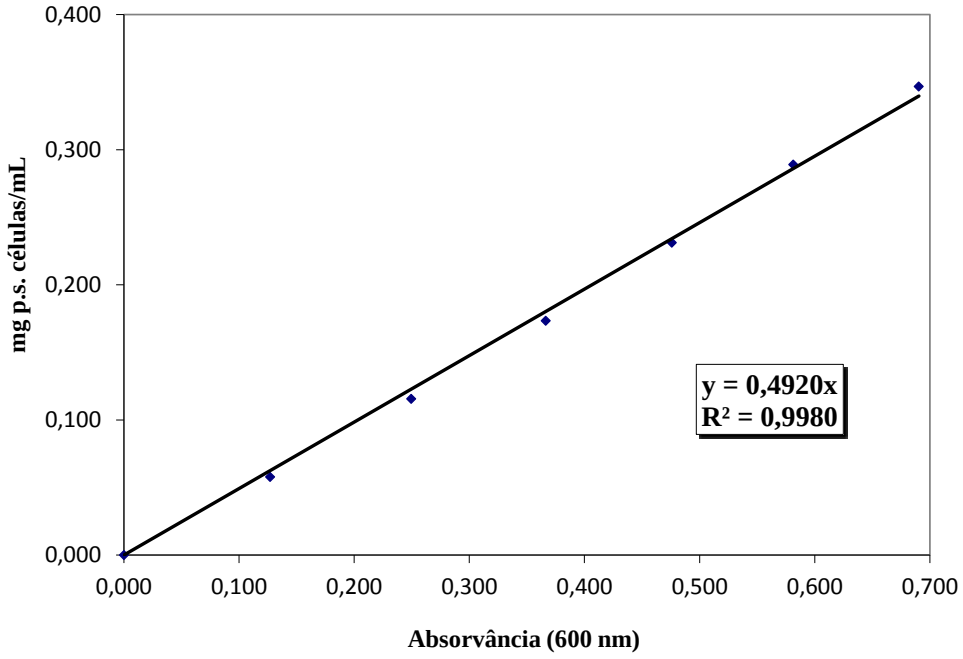

Figura III.4 – Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Lactobacillus brevis* ATCC 367 através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *BELL* SP 2000UV.

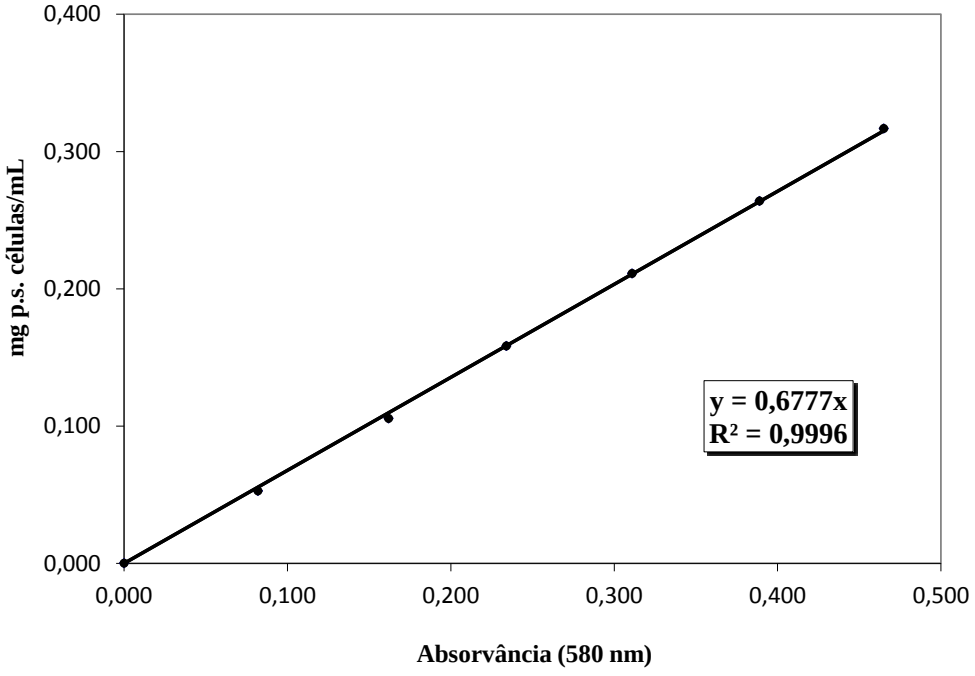

Figura III.5 – Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Citrobacter freundii* modificada através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *BELL* SP 2000UV.

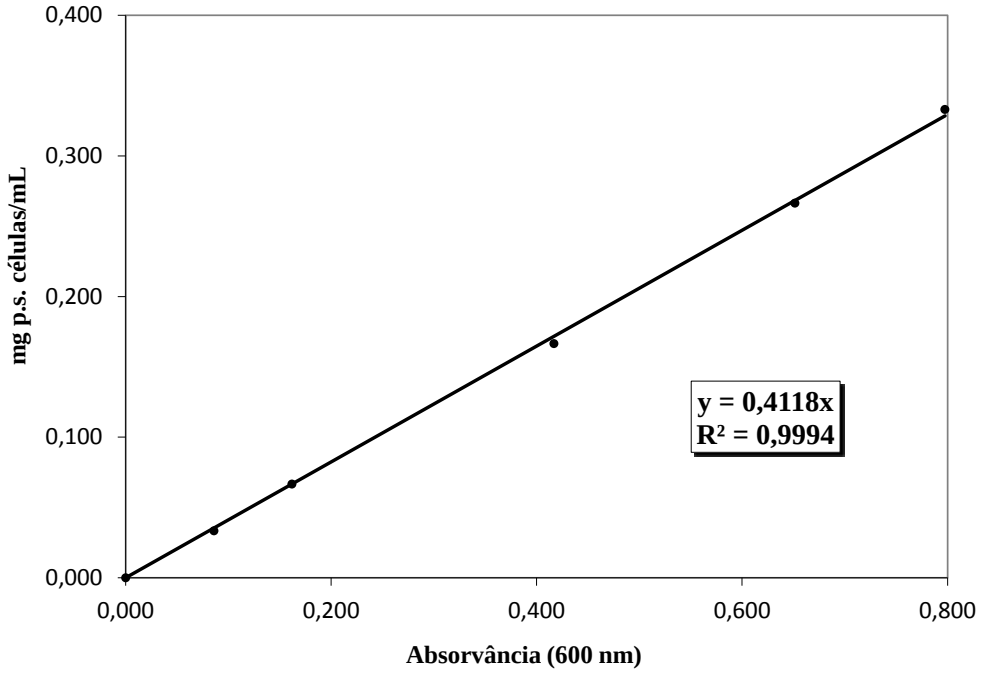

Figura III.6 – Curva de peso para quantificação do crescimento celular de *Escherichia coli* pTrc através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *BELL* SP 2000UV.

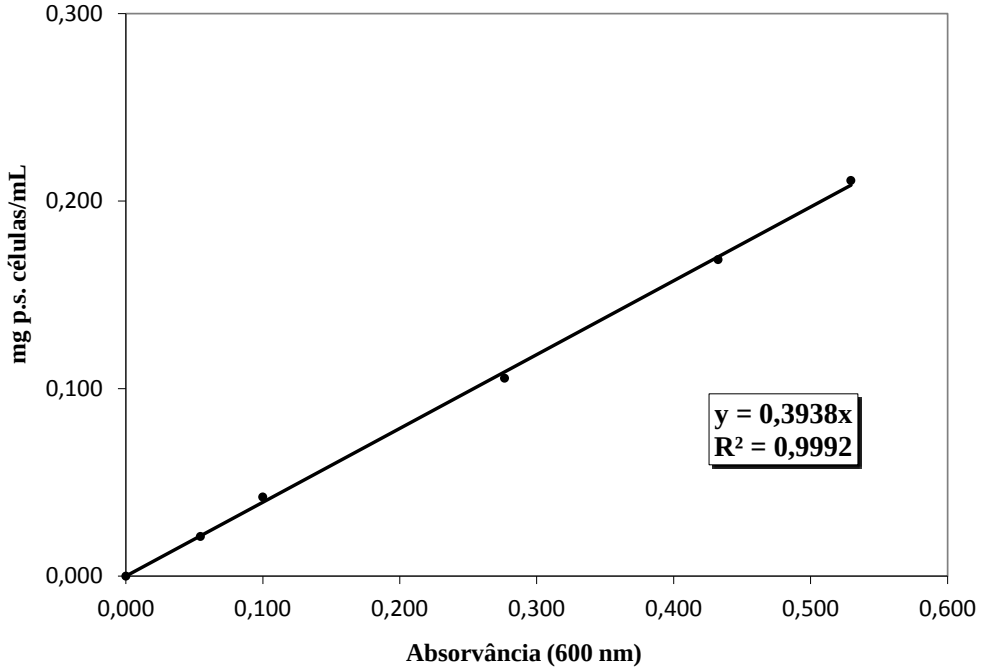

Figura III.7 – Curva de peso para quantificação do crescimento celular de *Escherichia coli* pBAD através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *BELL* SP 2000UV.

III.7.2 – Quantificação de 1,3-PDO e co-produtos

As análises para quantificar a produção de 1,3-PDO e alguns possíveis co-produtos como 2,3-butanodiol e os ácidos oxálico, succínico, cítrico, pirúvico, lático e acético foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters®). Para realização de tais análises utilizou-se coluna Aminex® HPX- 87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad Laboratories Ltd) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (Bio-Rad Laboratories Ltd), detector de IR (Waters 2414), bomba binária (Waters 1525), forno e módulo controlador de temperatura (Waters), software cromatográfico: Breeze. A fase móvel utilizada foi H_2SO_4 5mM com vazão de 0,8 mL/min, o volume de injeção foi 20 µL e a temperatura da corrida foi 60°C. Os padrões de todos os analitos (Sigma chemical Co., St. Louis, Missouri) foram diluídos em água Milli-Q e injetados em triplicata para a preparação da curva padrão, que relaciona a área obtida no cromatograma com a concentração do composto.

As amostras obtidas nos experimentos foram filtradas em membrana (Waters) com diâmetro de 0,45 µm e injetadas em duplicata para a quantificação através do uso da curvas padrão.

III.7.3 – Quantificação dos substratos: glicose e glicerol

As análises para quantificar o consumo de glicose e glicerol também foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters®). A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item IV.5.2.

É importante salientar que foi injetada uma amostra contendo os padrões de todos os analitos (1,3-PDO, glicose, glicerol, 2,3-butanodiol e os ácidos oxálico, succínico, cítrico, pirúvico, lático e acético) para verificar se o cromatograma seria prejudicado devido a algum tipo de interação entre esses compostos, gerando, por exemplo, superposição de picos ou deslocamento significativo do tempo de retenção de algum componente.

III.8- Análise do Mercado de 1,3-propanodiol

Esta etapa teve como objetivo mapear e dimensionar o mercado brasileiro de 1,3-propanediol a fim de estudar a possibilidade de instalação de uma unidade de produção de 1,3-propanodiol no Brasil.

Para o reconhecimento de preços praticados nos últimos anos no mercado internacional foi utilizado o site ALICEWEB, disponível em http://aliceweb2.mdic.gov.br, que mostra a quantidade importada pelo mercado brasileiro e fornece ainda um panorama da demanda interna do país, uma vez que não há registro de produção do BioPDO internamente.

Outra importante fonte de informação para este presente estudo foi o site ICIS, disponível em www.icis.com, que através de periódicas notícias a respeito do mercado americano e relatos do balanço comercial da principal produtora de PDO (Dupont) foi capaz de elucidar atualmente a principal aplicação de tal molécula e seus concorrentes diretos no mercado internacional, indicando ainda possíveis projeções de crescimento de demanda.

Com a finalidade de entender a dinâmica de substituição de polímeros originados exclusivamente de derivados do petróleo por polímeros que possuam parcialmente ou integralmente origem renovável e estimar uma possível demanda para o PDO, foi consultado o artigo científico *Product overview and market projection of emerging bio-based plastics* (PRO-BIP 2009). Este estudo mostra, entre outras coisas, a potencial fatia de mercado que os biopolímeros são capazes de conquistar em relação aos de origem exclusivamente petroquímica. O poli(tereftalado de trimetileno) (PTT), principal aplicação do PDO, possui uma potencial substituição técnica de 20% no mercado de poli(tereftalado de etileno) (PET), 100% de substituição do poli(tereftalado de Butila) (PBT) e 30% de ocupação do mercado de poliamidas (PA). Para uma análise mais conservadora desses dados foram adotados a metade dos valores projetados. Esta projeção baseia-se nas semelhanças entre as propriedades físico-químicas dos polímeros originados de derivados de petróleo e dos biopolímeros, na disponibilidade de biomassa. Vale ressaltar, que tal projeção realizada apresenta forte dependência em relação aos preços do barril de petróleo comercializado no mercado internacional.

III.9- Modelo Cibernético

O objetivo desta etapa consistiu na descrição do modelo matemático que envolva a rede metabólica para o crescimento de *Citrobacter freundii* em glicerol e a produção de 1,3-propanodiol e co-produtos possíveis: 2,3-butanodiol, acetato, etanol, lactato e succinato (Figura II.11). Para confecção do modelo em questão optou-se por uma perspectiva cibernética que traduz a ideia de que as células regulam sua atividade metabólica através do controle das taxas de síntese e atividade das enzimas, coordenando as mesmas de forma ótima para alcançar um objetivo requerido, síntese dos produtos almejados pelo micro organismo (Bremeermann, 1967). Para manter as equações resultantes suficientemente simples, detalhes dos mecanismos de regulação são absorvidos no critério de otimalidade.

A primeira etapa para modelagem foi a identificação da rede metabólica a ser usada em função das enzimas chave do metabolismo celular para determinado fim, no caso, produção de 1,3-PDO. Baseada nas premissas dos fundamentos da Rede Metabólica (Malik & Roy, 2005), detalhou-se a rede metabólica em questão. Inicialmente a via metabólica que descreve o consumo de glicerol por *Citrobacter freundii* em condições anaeróbias foi obtida da literatura (Saxena *et al.*, 2009). A espécie em questão, além de produzir 1,3-PDO, é capaz de produzir ácido succínico, lactato, formiato, 2,3-butanodiol, etanol e acetato a partir de glicerol.

A abordagem cibernética simula mecanismos de regulação celular e as mudanças no uso de substrato baseado em mudanças ambientais. A premissa é que uma célula regula a expressão e atividade das suas enzimas. Assim, ao quantificar estes processos regulatórios, definem-se funções objetivo para síntese de produto e utilização de substrato para as enzimas envolvidas. A partir destas funções objetivo, fatores cibernéticos são deduzidos e aplicados nas taxas de reação e a expressão das enzimas para descrever a competição enzimática que otimiza o consumo de substrato e a síntese de produtos. Utiliza-se a cinética de Monod para as taxas específicas de reação e as taxas específicas de expressão enzimática, que encontram-se descritas nas equações 1 e 2 respectivamente.

$$r_i = \mu_{i\,máx} \bullet \left(\frac{e_i}{e_{i\,máx}} \right) \bullet \left(\frac{S}{K_i + S} \right) \tag{1}$$

$$r_{e_i} = \alpha_{e_i} \bullet \left(\frac{S}{K_{e_i} + S} \right) \tag{2}$$

Onde:

i = 1, 2, 3, ..., 9 (nº de caminhos metabólicos);

α = taxa de síntese enzimática;

K_i = constante de saturação que governa o consumo de substrato;

K_{ei} = constante de saturação que governa a síntese enzimática;

$e_{máx}$ = especificidade máxima da enzima;

$\mu_{máx}$ = taxa específica máxima.

Quando ocorre a competição entre duas enzimas, a enzima com maior velocidade tem tanto a sua atividade quanto sua expressão elevadas, à custa dos competidores mais lentos, otimizando o processo celular.

Para a descrição dos caminhos metabólicos e suas respectivas enzimas foram consideradas as seguintes hipóteses:

- O balanço redox e de ATP estão completos;
- A produção de 1,3-propanodiol é inibida em altas concentrações de glicerol em função do acúmulo do intermediário, o 3-hidroxipropionaldeído;
- As produções de lactato e ácido succínico são inibidas pelo aumento da concentração de oxigênio;
- A produção de lactato é favorecida pela redução do pH;
- As produções de 1,3-propanodiol, ácido succínico e lactato são desfavorecidas pela redução da concentração de $NADH.H^+$;
- A produção de acetato é favorecidas pela redução da concentração de $NADH.H^+$;
- A célula não acumula internamente os produtos.

A maioria das hipóteses foi formulada baseada em dados experimentais obtidos nas fermentações realizadas.

IV- RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1– Experimentos preliminares

IV.1.1 – Experimentos com *Citrobacter freundii* ATCC 8090

Para avaliar a capacidade da cepa *C. freundii* ATCC 8090 em assimilar glicerol e produzir 1,3-PDO foram realizados os crescimentos nos Meios 1 e 2 como descritos no item IV.4.2.1.

A Figura V.1 apresenta o crescimento de *Citrobacter freundii* ATCC 8090 em Meio 1, assim como, o consumo de glicerol, e a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e 2,3-butanodiol (2,3-BDO). Neste experimento não houve produção de ácidos orgânicos.

É possível verificar que o crescimento celular não foi muito expressivo, atingindo uma concentração final de aproximadamente 0,9 $g.L^{-1}$. Contudo houve considerável consumo de glicerol e expressiva produção de 1,3-propanodiol nas primeiras 8 horas de experimento. A concentração do produto de interesse atingiu 3,0 $g.L^{-1}$ e o consumo de glicerol foi de 8,8 $g.L^{-1}$, gerando uma conversão de glicerol em 1,3-PDO de aproximadamente 35% ($g.g^{-1}$). O 2,3-BDO também foi produzido, porém em menor concentração, 0,7 $g.L^{-1}$.

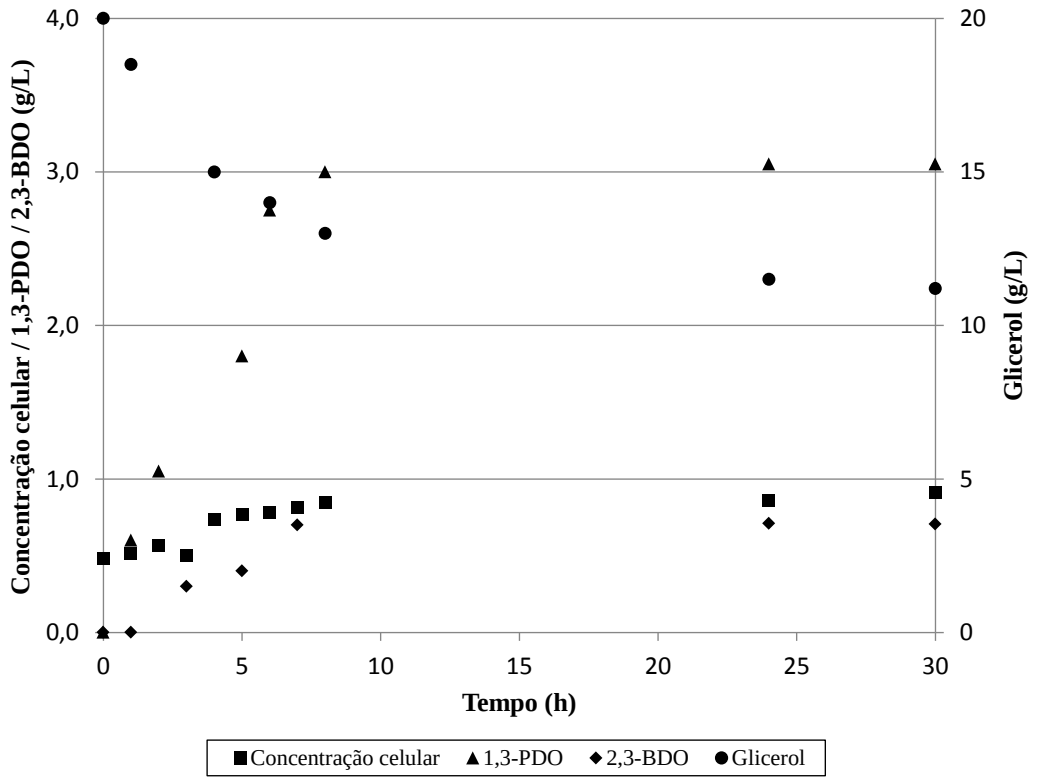

Figura IV.1 - Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e 2,3-BDO do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em Meio 1.

Já no experimento em Meio 2, o crescimento celular foi maior, atingindo cerca de 1,7 g/L como pode ser visto na Figura V.2. O consumo de glicerol foi ligeiramente maior do que no experimento em Meio 1 (9,5 $g.L^{-1}$), porém a produção de 1,3-PDO foi menor (1,85 $g.L^{-1}$).

Papanikolau *et al.* (2004) verificaram que em concentrações crescentes de glicerol no meio de alimentação, a produção de biomassa diminuiu. Esta diminuição foi atribuída ao metabolismo microbiano sendo direcionado para a biossíntese dos ácidos orgânicos (e consequentemente as perdas de carbono, CO_2). Sendo assim, foram realizadas análises de alguns ácidos orgânicos possíveis de serem produzidos por *Citrobacter freundii*. Foram analisados os ácidos oxálico, cítrico e succínico, assim como, o 2,3-BDO. Como é possível verificar na Figura V.2, ocorreu elevada produção de 2,3-BDO, atingindo a concentração de 4,0 $g.L^{-1}$ e produção dos ácidos cítrico e oxalato na concentração de 0,54 $g.L^{-1}$ e 0,22 $g.L^{-1}$, respectivamente.

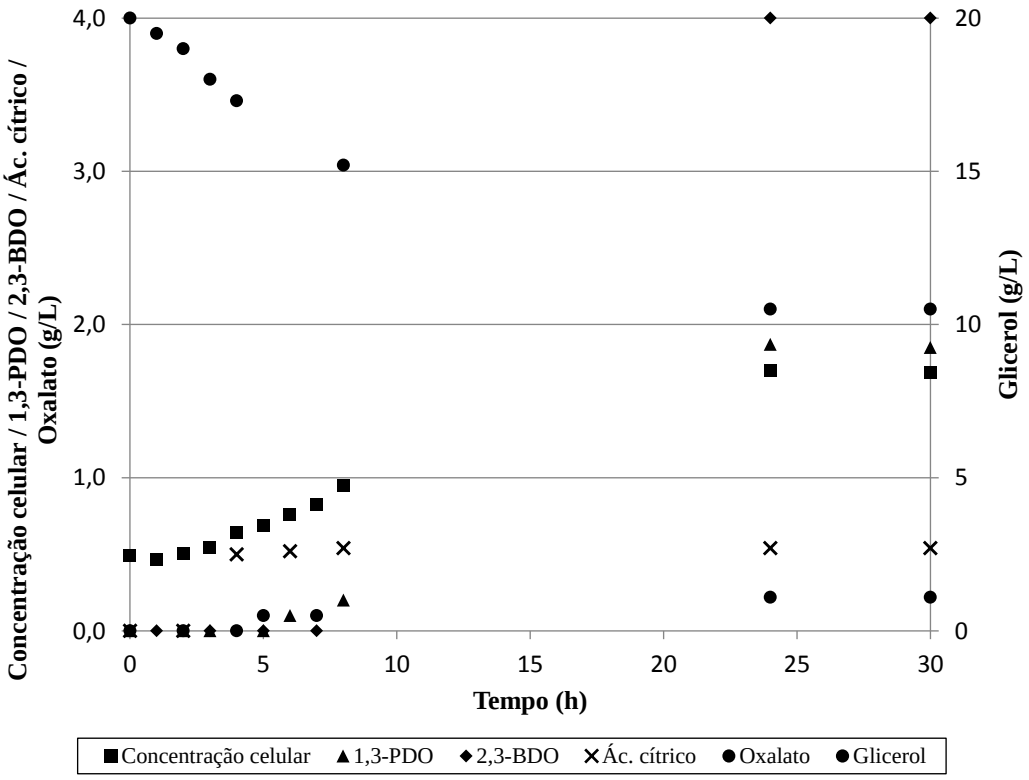

Figura IV.2 - Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, 2,3-BDO, ácido oxálico e ácido cítrico do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em Meio 2.

Os rendimentos de glicerol em biomassa e nos produtos formados para os experimentos de *C. freundii* ATCC 8090 nos Meio 1 e 2 encontram-se detalhados na Tabela V.1. Podemos observar que no Meio 1, onde houve baixa produção de biomassa, o metabolismo parece ter sido desviado para a formação de 1,3-PDO. Já no experimento em Meio 2, onde houve uma maior produção de biomassa, algumas vias como a via de produção de 2,3-BDO foi mais expressiva, reduzindo consideravelmente o rendimento em 1,3-PDO. Ocorreu também produção do ácido cítrico e do oxalato, o que também contribuiu para a redução no rendimento de 1,3-PDO.

Tabela IV.1 – Rendimentos de glicerol em biomassa e nos produtos formados para os experimentos de *C. freundii* ATCC8090 nos Meios 1 e 2.

	Rendimentos ($g.g^{-1}$)	
	Meio 1	Meio 2
Biomassa	0,050	0,125
1,3-propanodiol	0,354	0,195
2,3-butanodiol	0,080	0,421
Ácido cítrico	0,000	0,057
Oxalato	0,000	0,023
Total	0,484	0,821

Esses resultados podem ser explicados pelo fato de no experimento em Meio 2 ter ocorrido um maior crescimento celular e significativa produção de ácidos orgânicos, o que contribui para redução do pH e consequente favorecimento da via de produção de 2,3-BDO.

Biebl *et al.* (1998) verificaram que em condições de pH baixo, o fornecimento de elétrons para produção de 1,3-PDO pode ser totalmente direcionado para a síntese de 2,3-BDO. Os autores produziram 1,3-PDO a partir de glicerol utilizando *Klebsiella pneumonia* e observaram o maior rendimento de 1,3-PDO em pH = 7,0. Conforme esse pH vai sendo reduzido, diminui o rendimento em 1,3-PDO, acetato e etanol, mas o rendimento em 2,3-BDO aumenta significativamente.

Jansen *et al.* (1984) avaliaram a influência do pH sobre a produção de 2,3-BDO por *Klebsiella oxytoca*. Os autores observaram que entre os pHs estudados, 4,4 e 5,8, o rendimento do produto não parece ser muito afetado por este parâmetro do processo, atingindo um pico de produção entre 5,2 e 5,6. Utilizando valores maiores de pH, como 6,0, o rendimento de 2,3-BDO diminui.

Sendo assim, o elevado rendimento em 2,3-BDO pode ser explicado pela ausência de controle de pH, visto que o pH ótimo para a produção de 1,3-PDO fica em torno da neutralidade. Caso haja uma redução do pH, ocorre o favorecimento da via de produção de 2,3-BDO. O pH inicial dos experimentos foi de 7,3, porém durante os experimentos houve redução do pH, como pode ser visto na Tabela V.2. A redução do pH do Meio 2 foi maior do que no Meio 1, o que justifica a redução da produção de 1,3-PDO e aumento da produção de 2,3-BDO no Meio 2.

Tabela IV.2 – pH inicial e pH final dos experimentos de *C. freundii* ATCC 8090 nos Meios 1 e 2.

	Meio 1	Meio 2
$pH_{inicial}$	7,3	7,3
pH_{final}	6,7	6,2

Acerca dos resultados obtidos, foi possível concluir que a cepa *C. freundii* foi capaz de produzir 1,3-PDO. O Meio 1 apresentou melhor formulação para a produção de 1,3-PDO do que o Meio 2. Isso pode ter ocorrido devido a presença de extrato de levedo no Meio 1, que apesar de sua baixa concentração (0,2 g/L) pode ter contribuído com algum nutriente importante para o metabolismo deste micro organismo.

Como o Meio 1 apresentou melhor resultado para produção de 1,3-PDO, realizou-se outro experimento utilizando o Meio 1 (descrito no item IV.4.2.1), porém substituindo o glicerol por glicerina bruta a fim de verificar a capacidade da cepa *C. freundii* ATCC 8090 em converter glicerina bruta em 1,3-PDO.

Como é possível verificar na Figura V.3, ocorreu expressivo crescimento celular, praticamente dobrando a concentração celular após 24 horas de experimento. Além disso, todo glicerol (aproximadamente 17,5 $g.L^{-1}$) presente na glicerina bruta foi consumido em cerca de 30 horas. Houve significativa produção de 1,3-PDO, atingindo 8,3 $g.L^{-1}$ após 30 horas de fermentação. Ocorreu também produção de ácido succínico na concentração de 2,5 $g.L^{-1}$ e acetato na concentração de 3,9 $g.L^{-1}$.

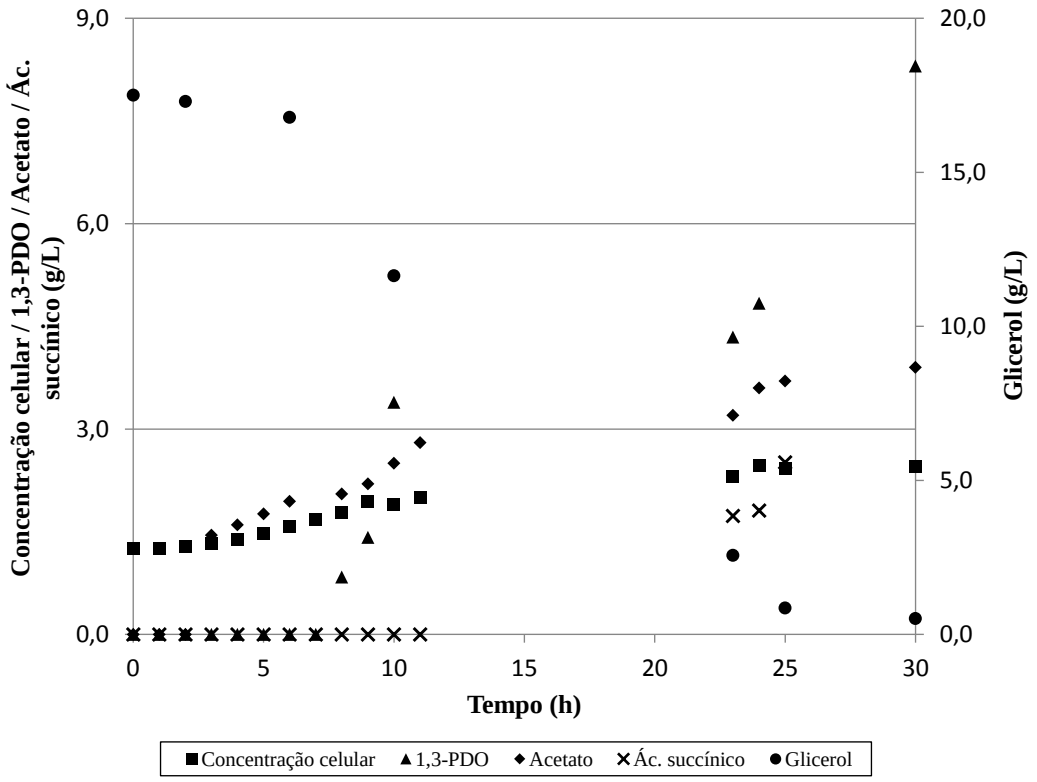

Figura IV.3 - Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, ácido acético e ácido succínico do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em contendo glicerina bruta.

A pureza do glicerol bruto varia de 65% para 90% p/p, sendo o restante normalmente constituído por água, metanol ou etanol (remanescente do processo de transesterificação), ácidos graxos livres e sais (resíduos de sua aplicação como catalisadores). Alguns estudos mostram a influência da variação da composição do glicerol bruto sobre o crescimento de micro organismos. Além disso, a existência de impurezas tais como o metanol, ácidos graxos ou sais é indicado como um fator que inibe o crescimento microbiano, especialmente quando encontrado em concentrações significativas (Chatzifragkou *et al.*, 2010). Contudo, Chatzifragkou *et al.* (2010) mostraram que não houve diferença entre o crescimento celular e a produção de 1,3-PDO para a cepa *Clostridium butyricum* VPI 1718 em glicerol puro e glicerol bruto. A cepa foi ainda submetida a condições drásticas de concentrações de sal e metanol (acima das encontradas na glicerina bruta) e não apresentou inibição do crescimento e da produção de 1,3-PDO.

Para a cepa *Citrobacter freundii* estudada neste trabalho, o glicerol bruto apresentou um efeito positivo em termos de crescimento celular e produção de 1,3-PDO como pode ser visto na Tabela V.3. Na presença da glicerina bruta, o micro organismo apresentou uma produção de biomassa (ΔX) de 1,19 $g.L^{-1}$ e um rendimento de glicerol em biomassa ($Y_{X/S}$)

de 0,070 $g.g^{-1}$. Para o crescimento em glicerol P.A., a produção de biomassa (ΔX) foi 0,43 $g.L^{-1}$ e o rendimento de glicerol em biomassa (Yx/s) foi 0,049 $g.g^{-1}$. Em relação à produção de 1,3-PDO, o ganho também foi bastante expressivo. A conversão de glicerina bruta em 1,3-PDO foi maior (48,9 %) do que a conversão de glicerol P.A. (34,6 %) e a produtividade também foi mais elevada (0,28 $g.L^{-1}.h^{-1}$ contra 0,10 $g.L^{-1}.h^{-1}$ em glicerol P.A.).

Tabela IV.3 – Comparação entre a produção de biomassa (ΔX), rendimento de glicerol em biomassa ($Y_{biomassa/glicerol}$), concentração final de 1,3-PDO ($[1,3\text{-PDO}]_{final}$), rendimento de glicerol em 1,3-PDO ($Y_{1,3\text{-PDO/glycerol}}$) e produtividade ($Q_{1,3\text{-PDO}}$) para cepa *C. freundii* ATCC 8090 nos meios contendo glicerol P.A. e glicerina bruta.

	Glicerol P.A.	Glicerina bruta
ΔX ($g.L^{-1}$)	0,43	1,19
$Y_{biomassa/glicerol}$ ($g.g^{-1}$)	0,049	0,070
$[1,3\text{-PDO}]_{final}$ ($g.L^{-1}$)	3,0	8,3
$Y_{1,3\text{-PDO/glicerol}}$ ($g.g^{-1}$)	0,346	0,489
$Q_{1,3\text{-PDO}}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	0,10	0,20

IV.1.2 – Experimentos com *Lactobacillus brevis* ATCC 367

Para avaliar a capacidade da cepa *Lactobacillu brevis* ATCC 367 em converter glicerol em 1,3-PDO, cresceu-se este micro organismo no meio descrito na Tabela IV.2. Diferentemente dos outros micro organismos testados no presente trabalho, foi necessária a adição de glicose ao meio de cultivo do *L. brevis* já que o glicerol sozinho não é capaz de sustentar o crescimento e o metabolismo precisa de uma forma de disponibilizar $NADH.H^+$ (Cunha & Foster, 1992b). Talvez seja por essa razão que o rendimento em ácido pirúvico tenha sido tão elevado (Tabela V.3), visto que para produzir piruvato só há formação de $NADH.H^+$, a transformação de piruvato em outro composto é que consume $NADH.H^+$, como pode ser visto na Figura II.9.

A Figura V.4 apresenta o perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e glicose e produção de 1,3-PDO e 2,3-BDO para o experimento de *L. brevis* ATCC 367 no meio formulado. Podemos observar que o crescimento celular foi expressivo e houve produção de 1,3-PDO e 2,3-BDO em pequenas quantidades, 0,32 g/L e 0,60 g/L, respectivamente, após 24 horas de fermentação. O consumo de glicerol foi pequeno, porém o consumo de glicose foi elevado.

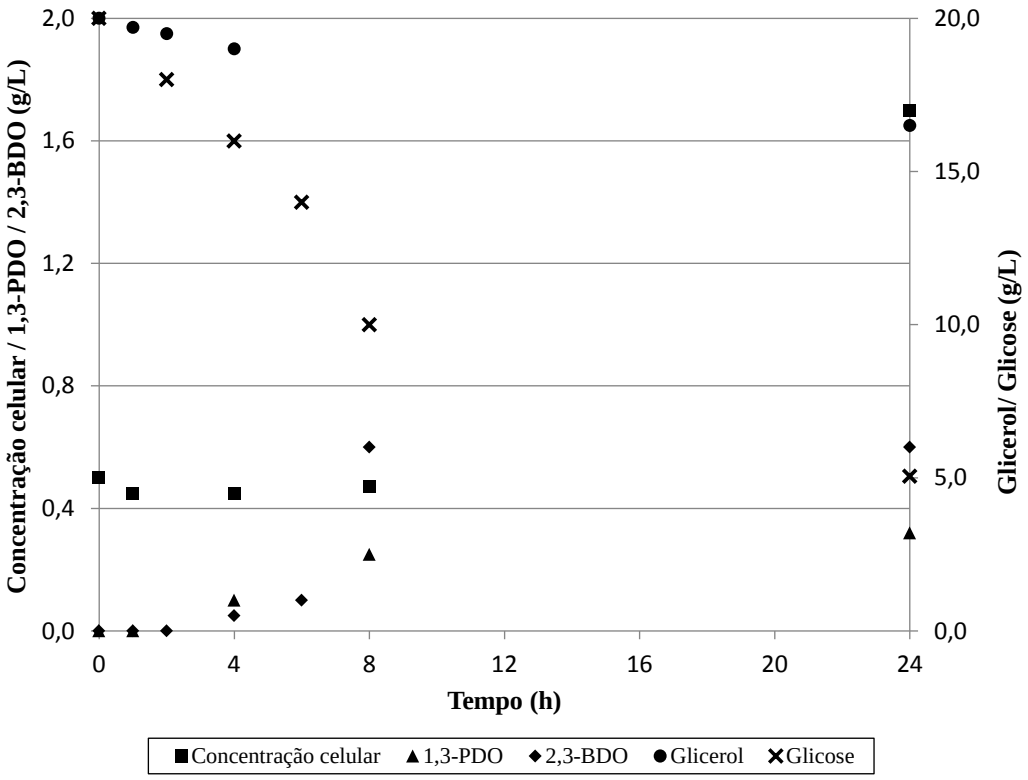

Figura IV.4 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, consumo de glicose e produção de 1,3-PDO e 2,3-BDO do experimento com *L. brevis* ATCC 367 em meio formulado.

Na Tabela V.4 é possível verificar os ácidos orgânicos formados durante o experimento de *L. brevis* em meio formulado. Ocorreu elevada produção dos ácidos pirúvico, acético e succínico e uma produção menos expressiva dos ácidos oxálico e lático.

Tabela IV.4 – Ácidos orgânicos formados em função do tempo no experimento com *L. brevis* em Meio 4.

Tempo (h)	Piruvato	Acetato	Succinato	Oxalato	Lactato
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	1,20	0,00	0,00	0,00	0,00
4	2,05	2,40	0,05	0,08	0,11
6	-	-	0,07	0,10	0,13
8	5,85	2,40	3,95	0,15	0,72
24	6,05	6,00	4,00	0,48	0,90

Alguns estudos mostram que no crescimento de *L. brevis* em meio contendo glicose e glicerol, a glicose é fermentada a acetato ou lactato, etanol e CO_2 enquanto o glicerol é

desidratado a 3-hidroxipionaldeído e este reduzido para 1,3-propanodiol (Radler & Schutz, 1984).

Sendo assim, o rendimento em 1,3-PDO, calculado considerando o glicerol como substrato, foi de 0,082 $g.g^{-1}$ e o rendimento em acetato (maior produto formado), calculado considerando a glicose como substrato foi 0,436 $g.g^{-1}$.

O pH do meio sofreu uma redução de 6,5 para 4,3 após 24 horas de fermentação. Essa redução está associada a elevada produção de ácidos orgânicos e pode ter contribuído para o baixo rendimento em 1,3-PDO. Assim como também foi observado para *C. freundii*, o controle de pH é de extrema importância, pois sua redução diminui significativamente o rendimento em 1,3-PDO. Isso pode ser observado através da produção de 2,3-BDO (0,60 $g.L^{-1}$), que foi o dobro da produção de 1,3-PDO (0,32 $g.L^{-1}$).

Visto que a cepa *L. brevis* ATCC 367 é capaz de converter glicerol em 1,3-PDO, estudou-se também sua capacidade de produzir o intermediário de interesse, porém utilizando um substrato de baixo valor agregado, a glicerina bruta. Realizou-se os crescimentos nos Meios 1 e 2 como descritos na Tabela IV.3 do item IV.4.2.2.

A cepa *L. brevis* ATCC 367 também foi capaz de crescer em meio contendo glicerina bruta (Figura V.6), porém o substrato utilizado pelas células foi a glicose e não o glicerol. Verificou-se o mesmo no meio contendo glicerol P.A. (Figura V.5).

No experimento em Meio 1 (Figura V.5) é possível verificar um crescimento celular bem inferior ao experimento em Meio 2 (Figura V.6). No primeiro caso, a cepa atingiu a concentração final de aproximadamente 1,3 $g.L^{-1}$ após 30 horas de experimento, apresentando uma produção de biomassa (ΔX) de 1,1 $g.L^{-1}$ e um rendimento de glicerol em biomassa ($Yx_{/S}$) de 0,380 $g.g^{-1}$. A produção de 1,3-PDO foi significativa, atingindo a concentração de 0,9 $g.L^{-1}$ do produto de interesse ($Y_{P/S}$ = 0,297 $g.g^{-1}$). Já no segundo caso, a cepa atingiu cerca de 5,6 $g.L^{-1}$ com uma produção de biomassa (ΔX) de 5,4 $g.L^{-1}$ e $Yx_{/S}$ = 0,780 $g.g^{-1}$. Como a conversão de glicerol em biomassa foi elevada nesse experimento, a produção do 1,3-PDO ficou prejudicada, sendo de aproximadamente 0,05 $g.L^{-1}$ ($Y_{P/S}$ = 0,006 $g.g^{-1}$). Assim como ocorreu com a cepa *Citrobacter freundii*, o glicerol bruto apresentou um efeito positivo no crescimento de *Lactobacillus brevis*, contudo inibiu a produção de 1,3-PDO. Esses resultados podem ser melhor visualizados na Tabela V.5.

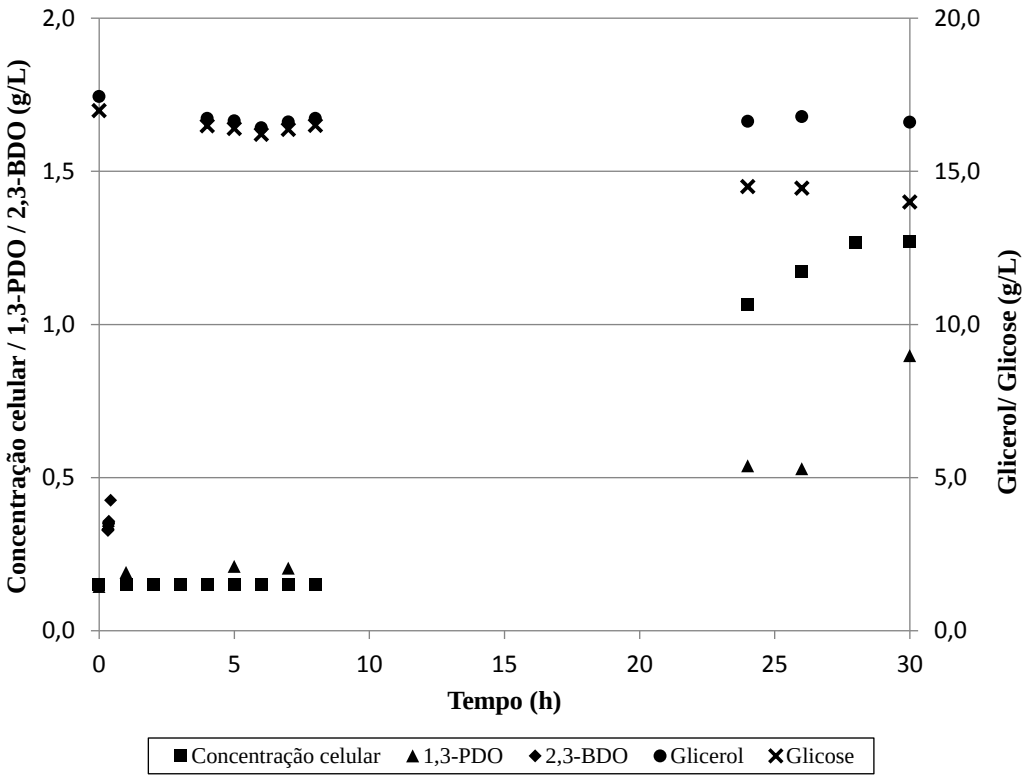

Figura IV.5 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, consumo de glicose e produção de 1,3-PDO e 2,3-BDO do experimento com *L. brevis* ATCC 8090 em meio contendo glicerol P.A.

Tabela IV.5 – Comparação entre a produção de biomassa (ΔX), rendimento de glicerol em biomassa ($Y_{biomassa/glicerol}$), concentração final de 1,3-PDO ($[1,3\text{-PDO}]_{final}$) e rendimento de glicerol em 1,3-PDO ($Y_{1,3\text{-PDO/glycerol}}$) para a cepa *L brevis* ATCC 367 nos meios contendo glicerol P.A. e glicerina bruta.

	Meio 1	Meio 2
ΔX ($g.L^{-1}$)	1,1	5,4
$Y_{biomassa/glicerol}$ ($g.g^{-1}$)	0,380	0,780
$[1,3\text{-PDO}]_{final}$ ($g.L^{-1}$)	0,9	0,05
$Y_{1,3\text{-PDO/glicerol}}$ ($g.g^{-1}$)	0,297	0,006

Cunha & Foster (1992b) também cresceram uma cepa de *Lactobacillus brevis* B22 em meio MRS Broth contendo glicose e glicerol como fonte de carbono e verificaram que após 60 h de experimento o crescimento foi de 3,2 (A_{600nm}) e a produção de 1,3-PDO foi de 38 mM (cerca de 2,8 $g.L^{-1}$). Esses valores são próximos aos obtidos visto que o crescimento

no Meio 1 (glicerol P.A.) após 30 h foi cerca de 2,6 (A_{600nm}) e a produção de 1,3-PDO foi aproximadamente 0,9 $g.L^{-1}$.

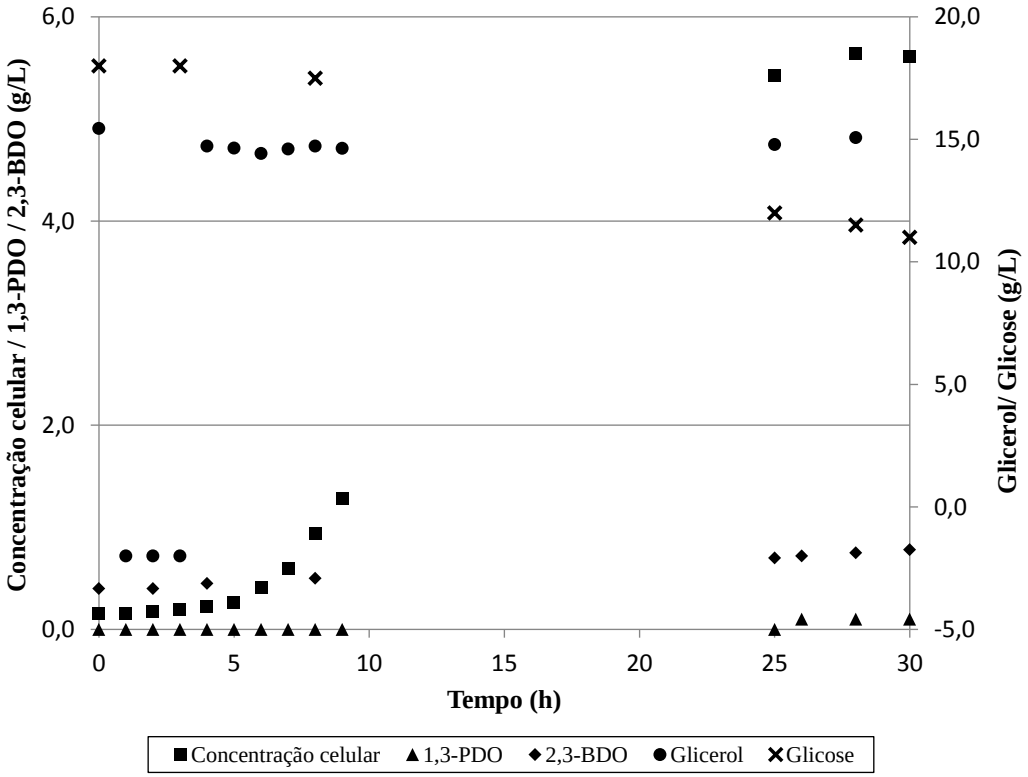

Figura IV.6 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, consumo de glicose e produção de 1,3-PDO do experimento com *L. brevis* ATCC 367 em meio contendo glicerina bruta.

O oxalato e os ácidos cítrico e succínico também foram analisados no experimento com *L. brevis* ATCC 367 em Meio 2, onde a cepa apresentou maior crescimento. Foi possível observar que não houve produção dos ácidos cítrico e succínico e do oxalato. Ao contrário do que ocorreu no experimento com *C. freundii* em meio contendo glicerol bruto, o experimento com *L. brevis* em Meio 2 apresentou elevado rendimento em biomassa e baixa produção de ácidos orgânicos.

IV.1.3 – Experimentos com cepa de *Citrobacter freundii* modificada

A Figura V.7 apresenta o perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e ácido acético no experimento de *C. freundii* modificada no meio contendo glicerina bruta na ausência de antibiótico. Podemos observar que o crescimento

celular foi menos expressivo que para cepa selvagem nas mesmas condições e a produção de 1,3-PDO também foi inferior, atingindo 3,5 $g.L^{-1}$ após 28 horas de fermentação. O ácido acético também apareceu como co-produto na concentração de 0,72 $g.L^{-1}$ após 28 horas de fermentação.

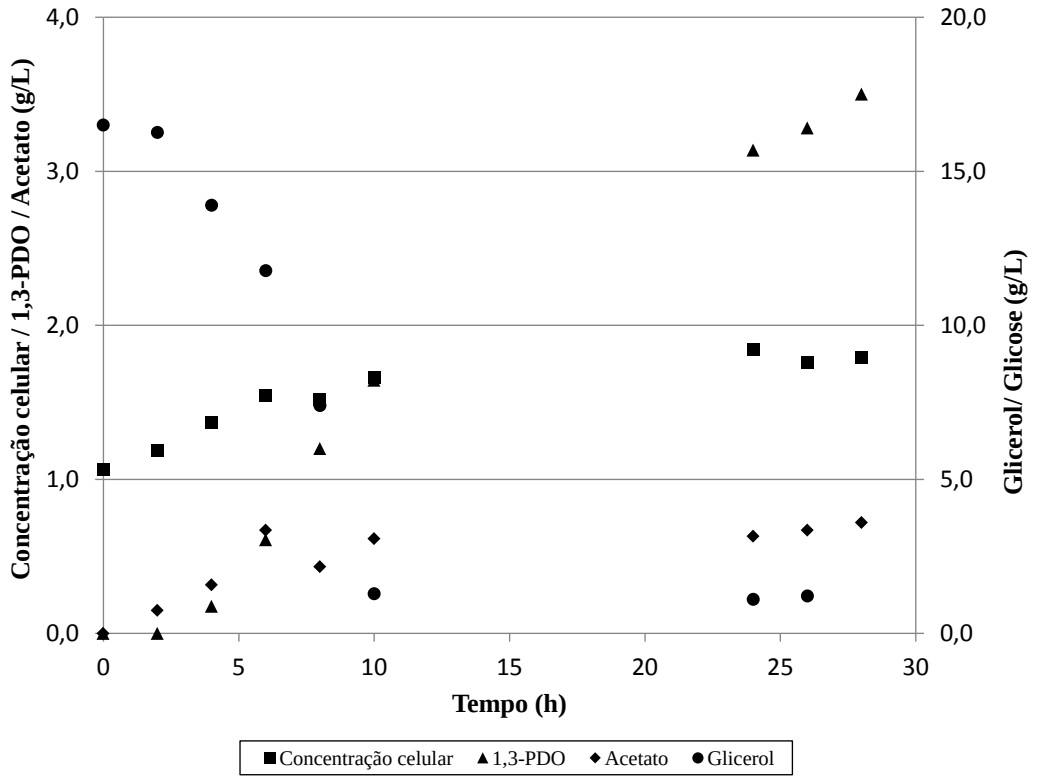

Figura IV.7 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* modificada em meio contendo glicerina bruta na ausência da antibiótico.

A Figura V.8 apresenta o perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e de ácido acético no experimento com *C. freundii* modificada no meio contendo glicerina bruta na presença de antibiótico. É possível verificar que não houve crescimento microbiano, porém grande parte do glicerol foi consumido e ocorreu produção de 1,3-PDO. Contudo, a produção deste intermediário (2,7 $g.L^{-1}$) foi inferior ao obtido na ausência de antibiótico (3,5 $g.L^{-1}$).

Comparando a cepa de *C. freundii* modificada com a cepa de *C. freundii* selvagem é possível concluir que esta última consumiu a glicerina bruta mais rapidamente e produziu uma maior quantidade do produto de interesse. Isso pode ter ocorrido, pois o *pool* extra de $NADH.H^+$ gerado no metabolismo da cepa modificada pode ter favorecido outros produtos que também dependem de $NADH.H^+$ para sua formação e não seletivamente o 1,3-PDO como esperado.

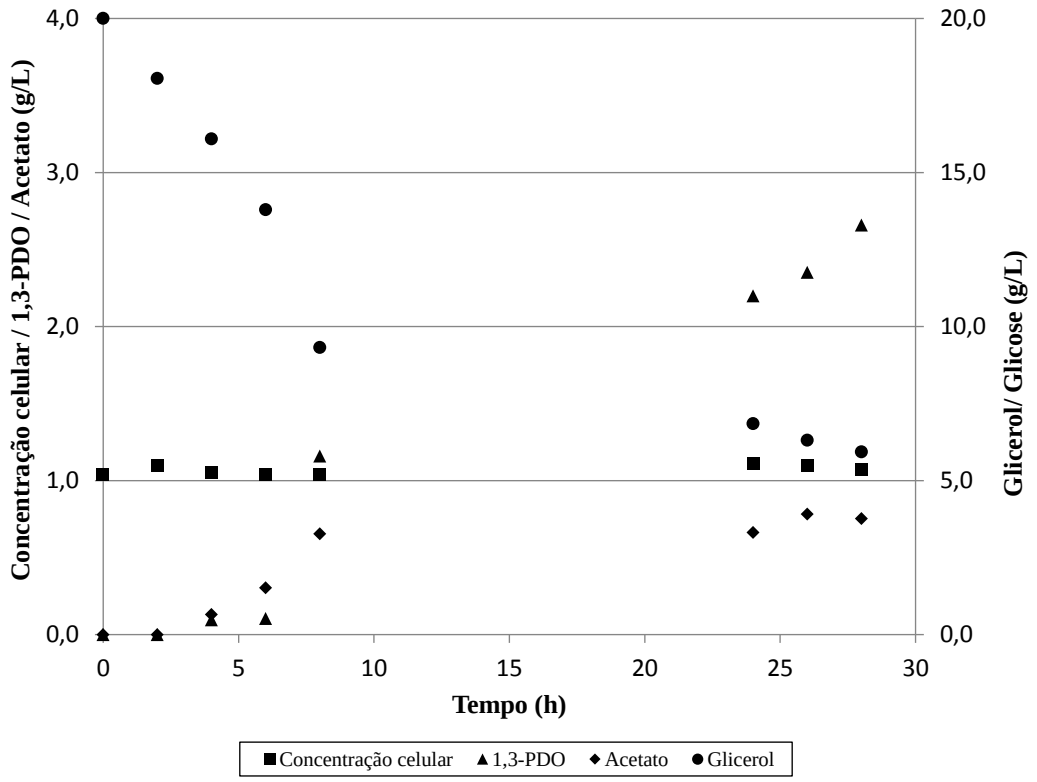

Figura IV.8 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, consumo de glicose e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* modificada em meio contendo glicerina bruta e antibiótico.

IV.1.4– Experimentos com cepas de *Escherichia coli* modificadas

Foram realizados experimentos em meio contendo glicerol como substrato com o intuito de investigar o metabolismo das cepas construídas, pBAD e pTrc, ou seja, verificar se ambas eram capazes de crescer utilizando glicerol como substrato e produzir 1,3-PDO.

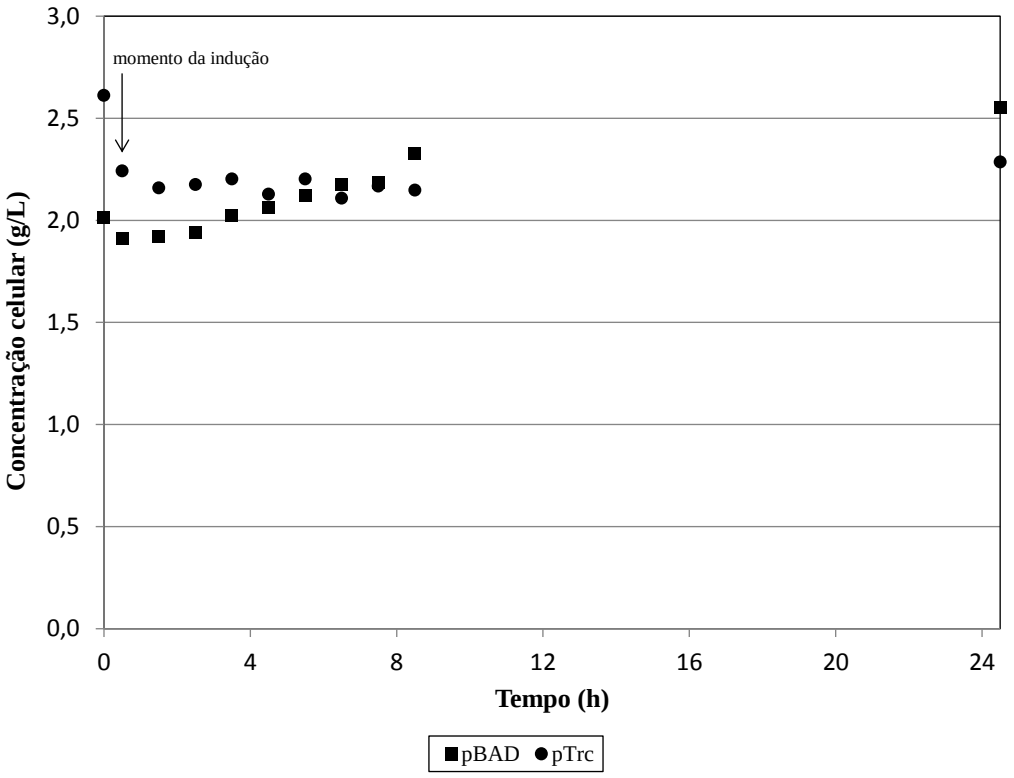

Figura IV.9 – Crescimento celular das cepas pBAD e pTrc em meio contendo 30 g.L^{-1} de glicerol.

Na etapa anaeróbia não houve crescimento celular, porém ocorreu consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO. Contudo, não foi possível precisar o consumo de glicerol e a produção de 1,3-PDO, pois devido a uma elevada concentração desses dois compostos ocorreu coeluição dos picos, não sendo possível traçar a linha base para quantificar mesmo mediante as diluições realizadas nas amostras obtidas durante as fermentações.

Apesar de não ter sido possível realizar um estudo quantitativo, foi possível visualizar que nos cromatogramas do experimento com a cepa pBAD (dados não apresentados), o pico do glicerol teve uma redução mais expressiva enquanto que o pico do 1,3-PDO teve um aumento mais expressivo do que no experimento com a cepa pTrc, indicando que a cepa pBAD apresenta maior capacidade de conversão de glicerol em 1,3-PDO. Outro indicativo de que o metabolismo da cepa pBAD é mais acelerado do que o da cepa pTrc foi o pH final dos experimentos que foram 5,09 e 6,13, respectivamente.

Sendo assim, realizou-se outro experimento como o descrito no item IV.4.2.4, porém utilizando-se 10 g.L^{-1} de glicerol ao invés de 30 g.L^{-1}. Esse experimento foi realizado em aerobiose e em anaerobiose para verificar se a cepa pBAD é capaz de produzir 1,3-PDO em aerobiose visto que o processo em anaerobiose é normalmente mais lento.

A Figura V.10 apresenta o perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO em anaerobiose. É possível observar o rápido consumo de glicerol associado à elevada produção de 1,3-PDO (5,4 $g.L^{-1}$), obtendo uma conversão de 49,5 % ($g.g^{-1}$) de glicerol em 1,3-PDO.

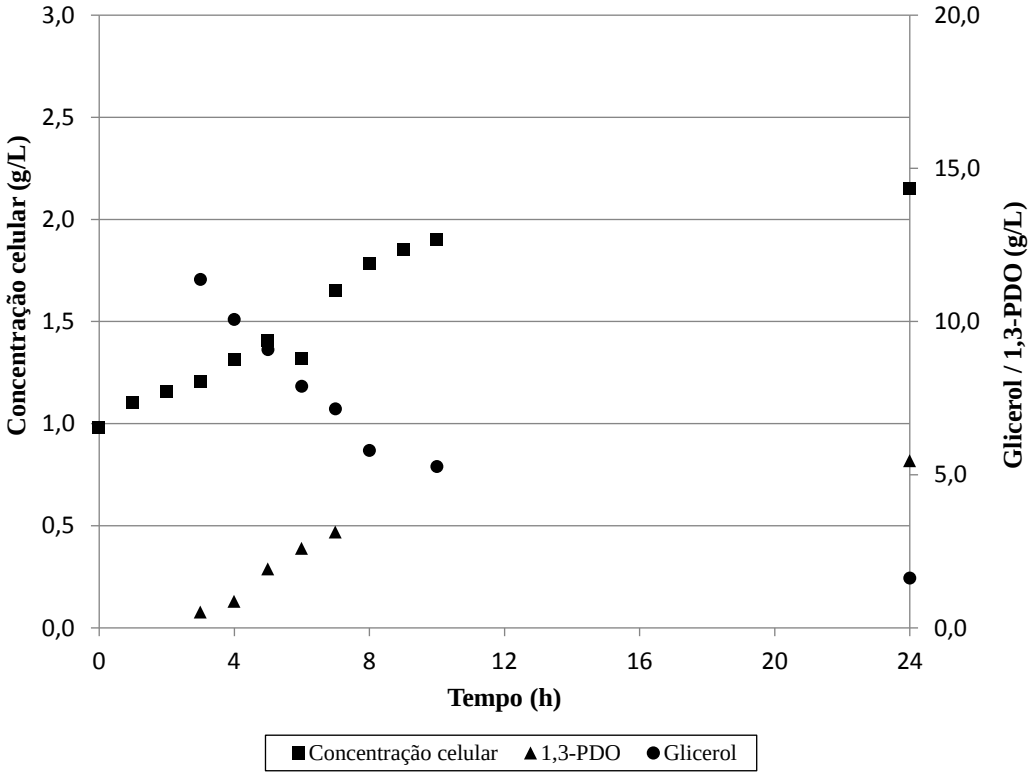

Figura IV.10 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO do experimento com *E. coli* pBAD crescendo em anaerobiose em meio contendo 10 $g.L^{-1}$ glicerol.

O crescimento da bactéria *E. coli* pBAD em aerobiose (Figura V.11) apresentou um consumo também acelerado de glicerol, porém a produção de 1,3-PDO foi bem inferior (2,17 $g.L^{-1}$), obtendo uma conversão de 22,5 % ($g.g^{-1}$) de glicerol em 1,3-PDO. O pH final de ambos os experimentos foram muito próximos, 5,2 e 5,5, para os experimentos realizados em aerobiose e anaerobiose, respectivamente.

Apesar do *Clostridium butyricum* ser um micro-organismo estritamente anaeróbio, quando expressou-se seus genes, referentes a produção de 1,3-PDO, em *Escherichia coli* foi possível verificar a produção deste intermediário em condições aeróbias, indicando que as enzimas referentes a esta via são produzidas e encontram-se ativas mesmo na presença de oxigênio. Contudo, o rendimento de conversão em 1,3-PDO é inferior. Isso pode ocorrer devido a presença de oxigênio ativar outras vias, gerando outros produtos, diminuindo

assim o rendimento de glicerol em 1,3-PDO ou até mesmo devido a inibição parcial das enzimas envolvidas na produção de 1,3-PDO na presença de oxigênio.

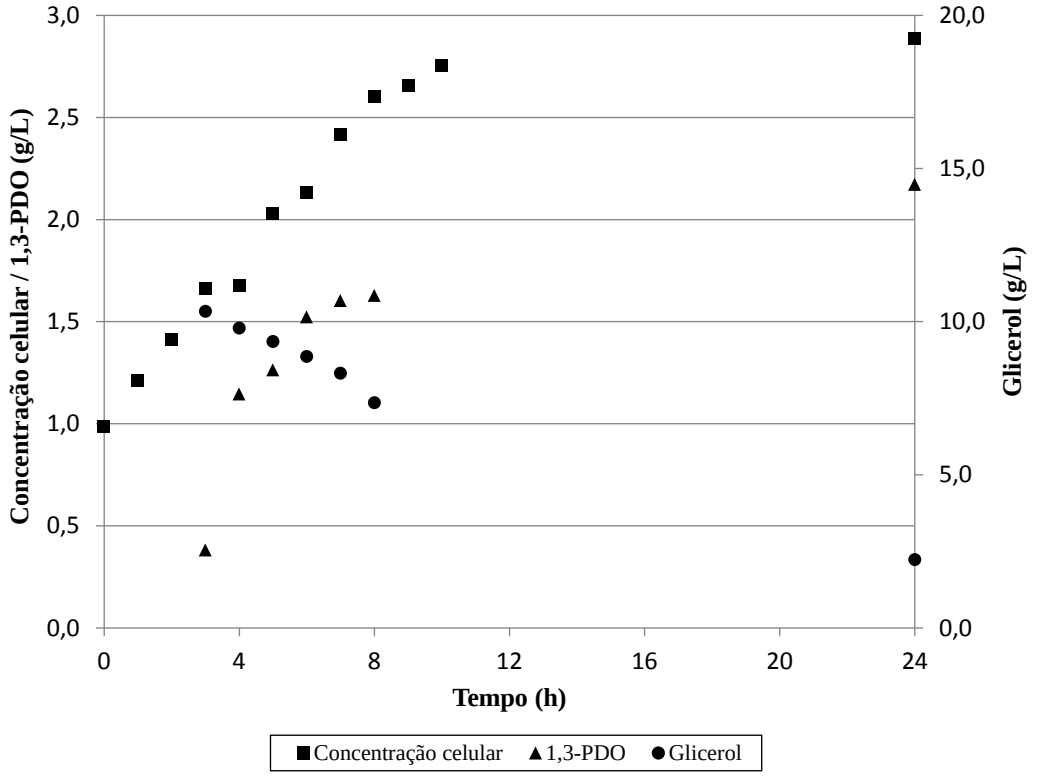

Figura IV.11 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO do experimento com *E. coli* pBAD crescendo em aerobiose em meio contendo 10 g.L^{-1} glicerol.

IV.1.5– Comparando as cepas estudadas

A Tabela V.6 apresenta a concentração final de 1,3-PDO, o rendimento de glicerol em 1,3-PDO, a produtividade e a produtividade específica para o produto de interesse para as cepas testadas. É possível visualizar que a cepa selvagem de *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) foi a que apresentou melhores resultados. A cepa *Lactobacillus brevis* ATCC 367 não apresentou elevada capacidade de conversão de glicerol em 1,3-PDO e esses valores foram ainda menores quando utilizou-se glicerina bruta. A cepa modificada de *Citrobacter freundii* apresentou capacidade de conversão de glicerol em 1,3-PDO inferior a cepa selvagem. Já a cepa *Escherichia coli pBAD* também apresentou bons resultados de

conversão de glicerol em 1,3-PDO, porém esses resultados foram obtidos em meio rico e utilizando-se glicerol P.A. e não glicerina bruta.

Tabela IV.6 – Comparando os valores da concentração de 1,3-PDO após 24 horas ($[1,3\text{-PDO}]_{24h}$), rendimento de glicerol em 1,3-PDO ($Y_{1,3\text{-PDO/Glicerol}}$), produtividade de 1,3-PDO ($Q_{1,3\text{-PDO}}$) e produtividade específica de 1,3-PDO ($q_{1,3\text{-PDO}}$) entre as cepas estudadas.

Cepa	$[1,3\text{-PDO}]_{24h}$ ($g.L^{-1}$)	$Y_{1,3\text{-PDO/Glicerol}}$ ($g.g^{-1}$)	$Q_{1,3\text{-PDO}}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	$q_{1,3\text{-PDO}}$ ($g.g^{-1}.h^{-1}$)
Citrobacter freundii ATCC 8090	8,30	0,50	0,34	0,14
Lactobacillus brevis ATCC 367**	0,90	*	0,04	0,03
Citrobacter freundii modificada	3,50	0,23	0,14	0,08
Escherichia coli pBAD**	5,45	0,55	0,23	0,10

*Não foi possível calcular o rendimento pois o glicerol não era a única fonte de carbono, havia glicose também presente no meio. Além disso, praticamente não houve consumo de glicerol, indicando que o substrato preferencial foi a glicose.
**Dados obtidos utilizando glicerol P.A.

Em função dos resultados preliminares obtidos e a pequena produção bibliográfica de estudos na literatura reportando a produção de 1,3-PDO por *Citrobacter freundii*, optou-se por estudar este micro organismo e aprender um pouco mais sobre o seu metabolismo.

IV.2 – Experimentos com *Citrobacter freundii* ATCC 8090

IV.2.1 – Otimização da concentração de L-cisteína

Foram realizados cinco experimentos com diferentes concentrações iniciais de L-cisteína no meio de cultivo visando otimizar a concentração ideal para a produção de 1,3-PDO. No Meio 1, não houve crescimento microbiano, porém ocorreu consumo de aproximadamente metade do glicerol e a produção de 1,3-PDO atingiu 1,46 $g.L^{-1}$, com a conversão de glicerol em 1,3-PDO de 15% ($g.g^{-1}$). Dentre os co-produtos analisados, o acetato foi o único detectado, atingindo 1,63 $g.L^{-1}$, o que resultou num pH final de 6,38. Os perfis de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato no Meio 1 estão representados na Figura V.12. Vale ressaltar que essa concentração foi obtida

com 17 horas de experimento onde a consumo de glicerol e a produção de 1,3-PDO cessaram.

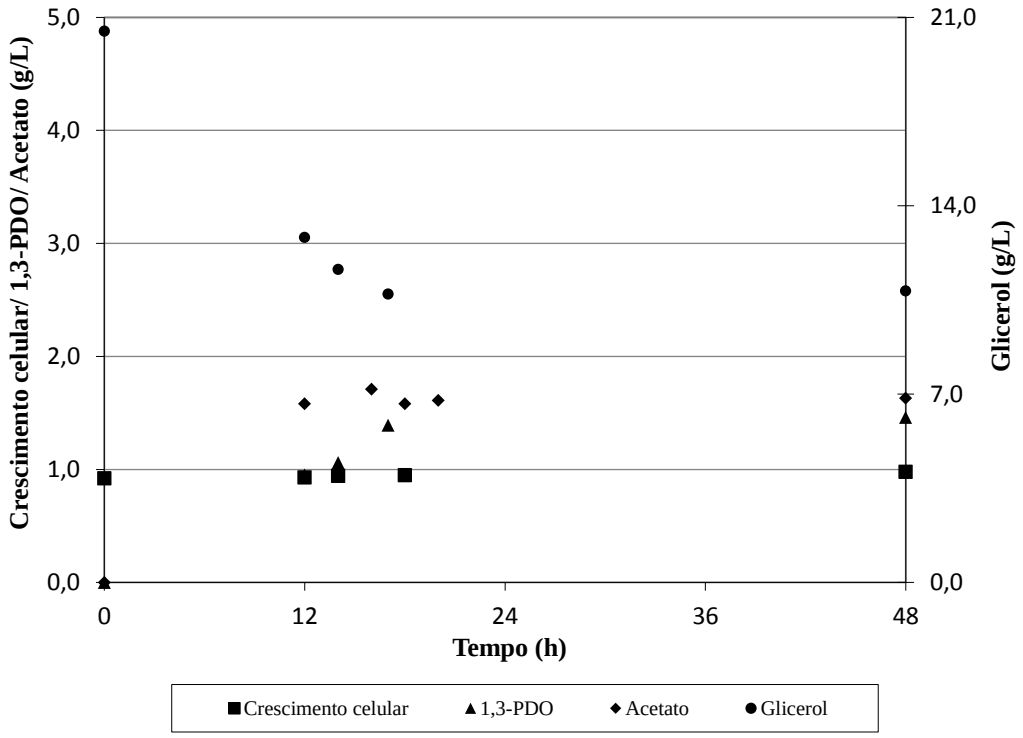

Figura IV.12 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 0,05 g.L^{-1} de cisteína.

No Meio 2, também não houve crescimento microbiano, sendo que o consumo de glicerol e a produção de 1,3-PDO foram um pouco superiores aos obtidos no Meio 1, resultando numa de conversão de glicerol em 1,3-PDO de 20% (g.g^{-1}). Assim como no Meio 1, o único co-produto formado foi o acetato na concentração de 1,05 g.L^{-1} e o pH final foi 6,63. Os perfis de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e ácido acético no Meio 2 estão representadas na Figura V.13. É possível verificar que o consumo de glicerol e a produção de 1,3-PDO não cessaram com 17 horas de experimento como ocorreu no Meio 1.

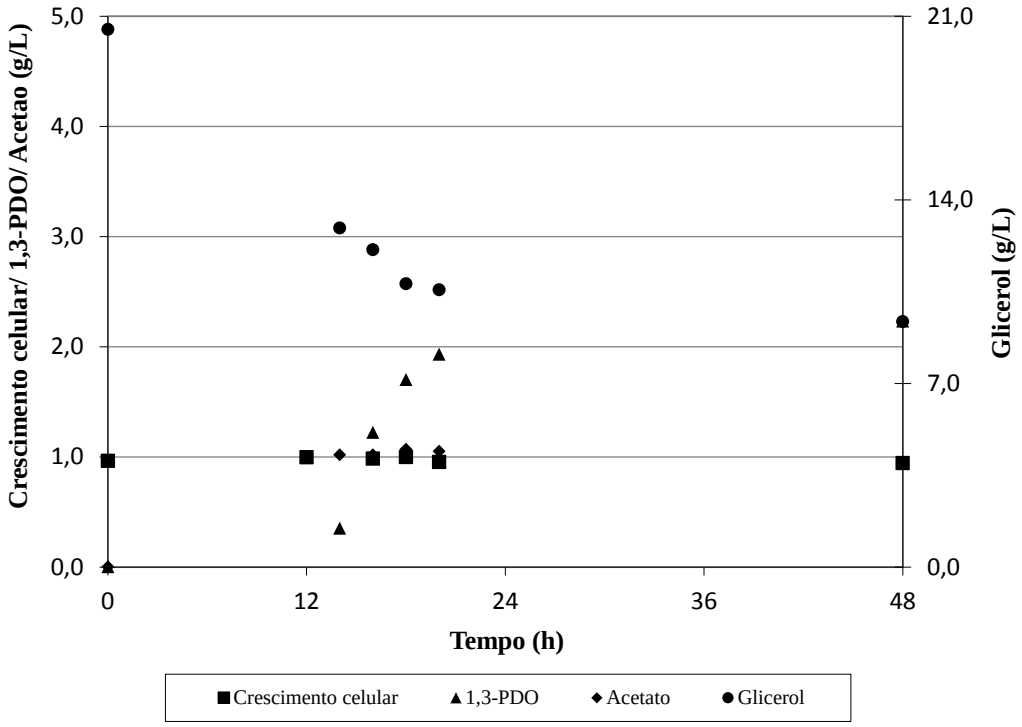

Figura IV.13 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 0,10 g.L^{-1} de cisteína.

No Meio 3, o crescimento microbiano não foi expressivo, portanto foi consumido mais da metade do glicerol e a produção de 1,3-PDO atingiu 3,25 g.L^{-1}, gerando uma conversão de glicerol em 1,3-PDO de 26% (g.g^{-1}). Ocorreu produção de 1,80 g.L^{-1} de acetato e o pH final foi 6,33. Os perfis de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato no Meio 3 encontram-se na Figura V.14.

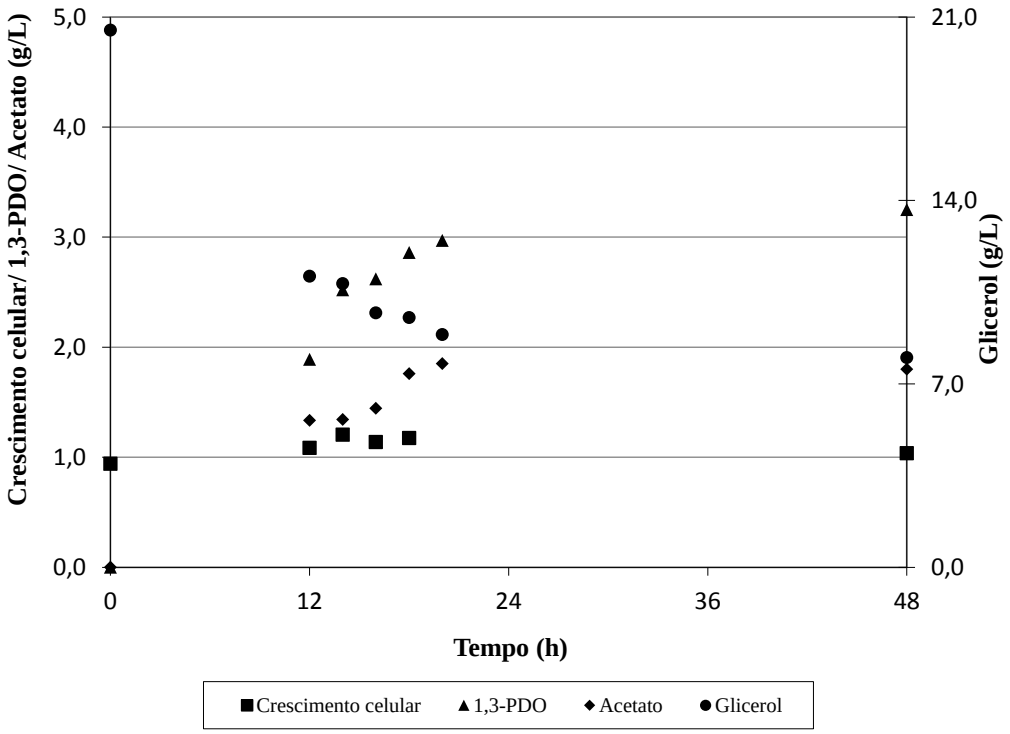

Figura IV.14 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 0,15 g.L^{-1} de cisteína.

Já no Meio 4, houve crescimento microbiano, o consumo de glicerol foi expressivo e a produção de 1,3-PDO atingiu 3,90 g.L^{-1}, com uma conversão de glicerol em 1,3-PDO de 35% (g.g^{-1}). A produção de acetato atingiu 1,95 g.L^{-1} e o pH final foi 6,65. Os perfis de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato no Meio 4 encontram-se na Figura V.15.

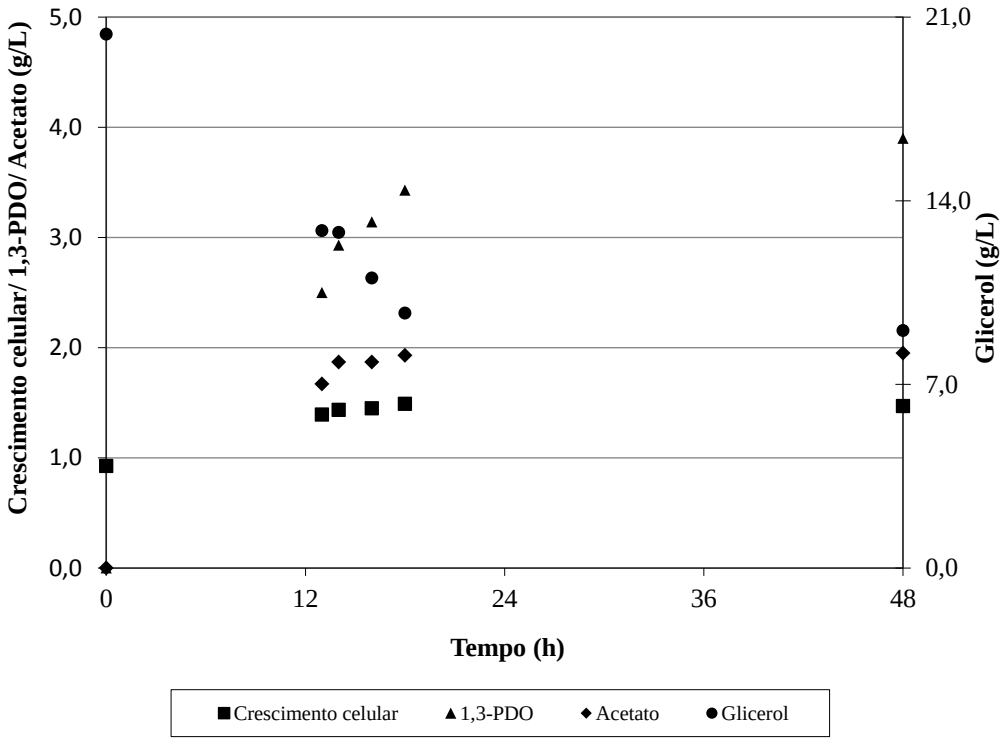

Figura IV.15 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 0,20 g.L^{-1} de cisteína.

O Meio 5 também apresentou expressivo crescimento celular e a produção de 1,3-PDO atingiu 4,8 g.L^{-1}. Contudo o consumo de glicerol foi bem elevado, resultando numa conversão de glicerol em 1,3-PDO de 28% (g.g^{-1}), inferior a conversão obtida no Meio 4. A produção de acetato foi 1,88 g.L^{-1} e o pH final foi 6,31. Os perfis de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato no Meio 5 encontram-se na Figura IV. 16.

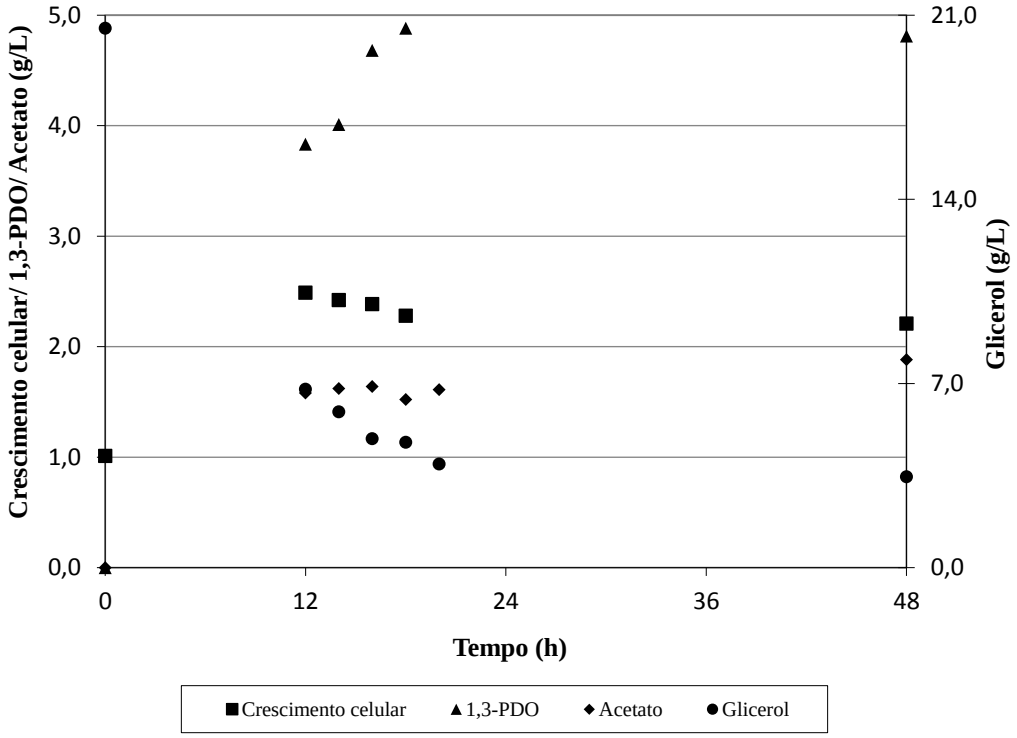

Figura IV.16 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 0,25 g.L^{-1} de cisteína.

As concentrações de L-cisteína utilizadas, assim como, as concentrações finais de 1,3-PDO produzido, os rendimentos de glicerol no produto de interesse ($Y_{1,3\text{-PDO/Glicerol}}$) e os pH finais encontram-se na Tabela V.5.

Tabela IV.7 – Concentração de L-cisteína utilizada, produção de 1,3-PDO, rendimento de glicerol em 1,3-PDO e pH final dos diferentes experimentos com *Citrobacter freundii* ATCC8090.

Meio	[L-cisteína]	[1,3-PDO]	$Y_{glicerol/1,3\text{-}PDO}$	pH_{final}
1	0,05	1,46	0,15	6,38
2	0,10	2,23	0,20	6,63
3	0,15	3,25	0,26	6,33
4	0,20	3,90	0,35	6,65
5	0,25	4,81	0,28	6,31

Os valores de concentração de L-cisteína e produção de 1,3-PDO encontram-se em g.L^{-1} e o rendimento encontra-se em g.g^{-1}.

Nos Meios 1, 2 e 3, a concentração de L-cisteína não foi suficiente para promover o crescimento celular utilizando glicerol como fonte de carbono. Contudo, houve produção de 1,3-PDO e acetato. Nos Meios 4 e 5, ocorreu crescimento celular além de elevada produção de 1,3-PDO e acetato. Porém, o maior rendimento em 1,3-PDO e acetato foi obtido no Meio 4. Esses resultados indicam que o Meio 4, onde a concentração de cisteína foi 0,20 $g.L^{-1}$, foi a melhor condição para a conversão de glicerol em 1,3-PDO, acima desta concentração ocorreu uma redução no rendimento do produto de interesse como mostra a Tabela V.5.

O ácido acético é o único composto produzido por *Citrobacter freundii* que não utiliza $NADH.H^+$ na sua via de produção, disponibilizando, assim, maior quantidade de $NADH.H^+$ para produção de 1,3-PDO (Biebl *et al*., 1999). Isso justifica o fato do experimento no Meio 4 ter apresentado maior rendimento em 1,3-PDO visto que este apresentou também maior rendimento em acetato. Possivelmente nos outros experimentos houve maior produção de algum bioproduto que não foi analisado.

O potencial para a oxidação eletrocatalítica da cisteína está intimamente relacionado com o par Co^{3+}/ Co^{2+} em meios ácidos e o par Co^{2+}/ Co^{1+} em meios básicos (Maree & Nyokong, 2000). Assim, também se faz necessário otimizar a concentração de íons de cobalto no meio de cultura. Essa otimização foi realizada posteriormente.

As correntes catalíticas e o potencial de oxidação da cisteína também são dependentes do pH da solução, o potencial é menos positivo à medida que aumenta o pH e as correntes catalíticas decrescem com o aumento do pH, para a mesma concentração de cisteína (Maree & Nyokong, 2000). Esta é outra razão que mostra a necessidade de controlar o pH durante a produção de 1,3-PDO.

IV.2.2 – Estudo da inibição da produção de 1,3-propanodiol

A Figura V.17 apresenta os resultados obtidos no experimento utilizando 10 $g.L^{-1}$ de glicerina bruta (Meio 1). É possível verificar que não houve crescimento celular significativo, portanto ocorreu consumo de glicerol e a produção de 1,3-PDO,, atingindo uma concentração final de 1,85 $g.L^{-1}$ do produto de interesse após 24 horas de experimento.

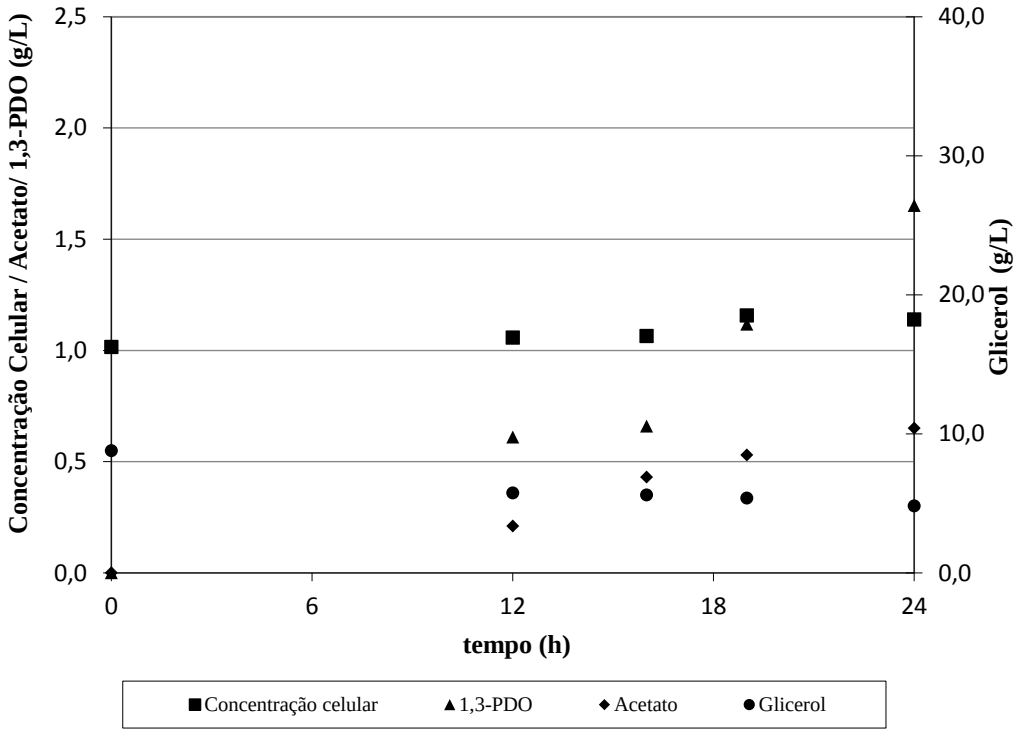

Figura IV.17 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 10,0 g.L^{-1} de glicerina bruta.

Os resultados obtidos no experimento utilizando 20 g.L^{-1} de glicerina bruta (Meio 2) encontram-se na Figura V.18. É possível verificar que o crescimento celular também não foi significativo, portanto houve consumo de glicerol e a produção de 1,3-PDO, atingindo uma concentração final de 2,25 g.L^{-1} após 24 horas de experimento.

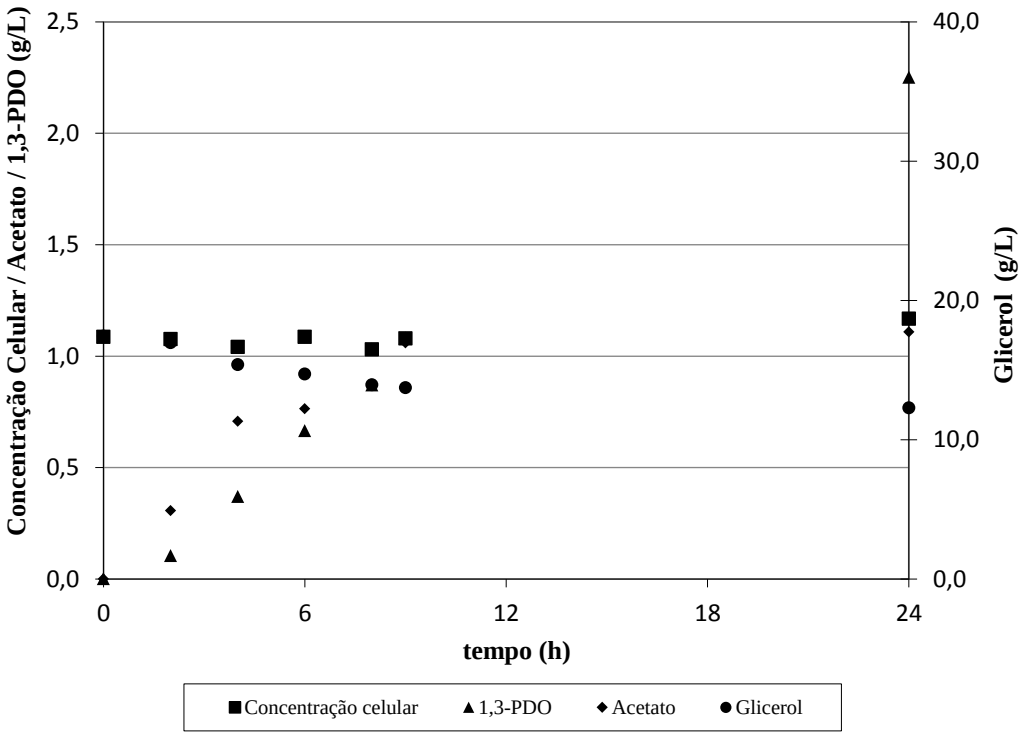

Figura IV.18 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 20,0 g.L^{-1} de glicerina bruta.

A Figura V.19 apresenta os resultados obtidos no experimento utilizando 30 g.L^{-1} de glicerina bruta (Meio 3). Neste experimento não houve crescimento celular significativo, portanto ocorreu consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, atingindo uma concentração final de 1,77 g.L^{-1} do produto de interesse após 24 horas de experimento.

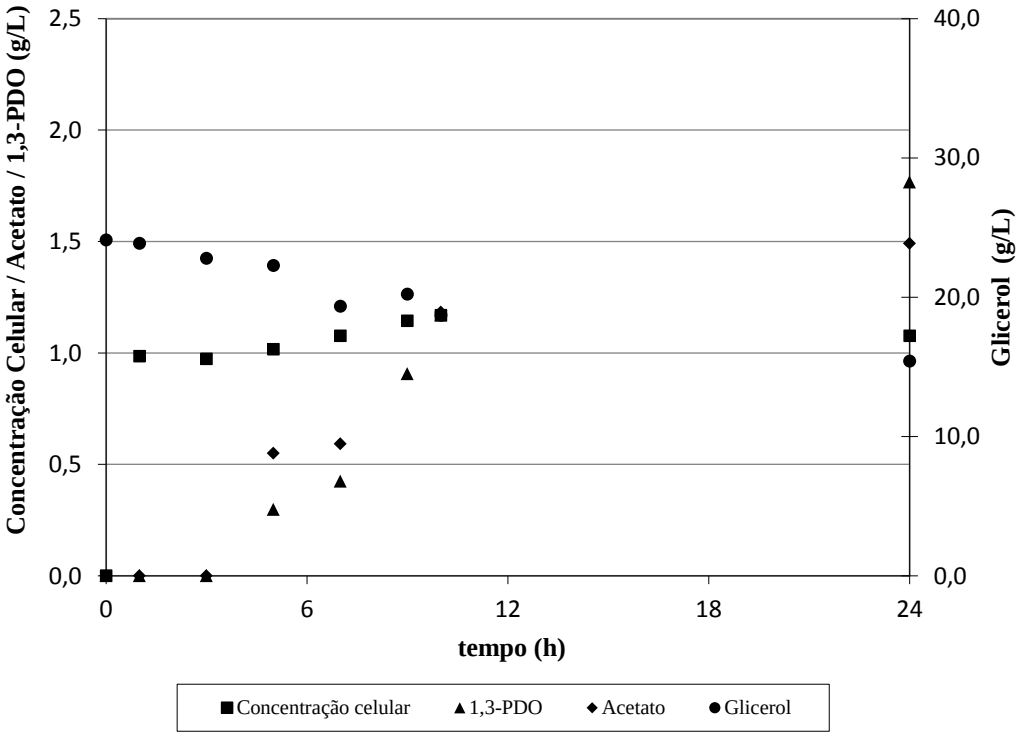

Figura IV.19 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 30,0 g.L^{-1} de glicerina bruta.

Os resultados obtidos no experimento utilizando 40 g.L^{-1} de glicerina bruta encontram-se na Figura V.20 (Meio 4). Assim como nos demais experimentos, não houve crescimento celular significativo, porém parte do glicerol foi consumido e a produção de 1,3-PDO atingiu 1,49 g.L^{-1} após 24 horas de experimento.

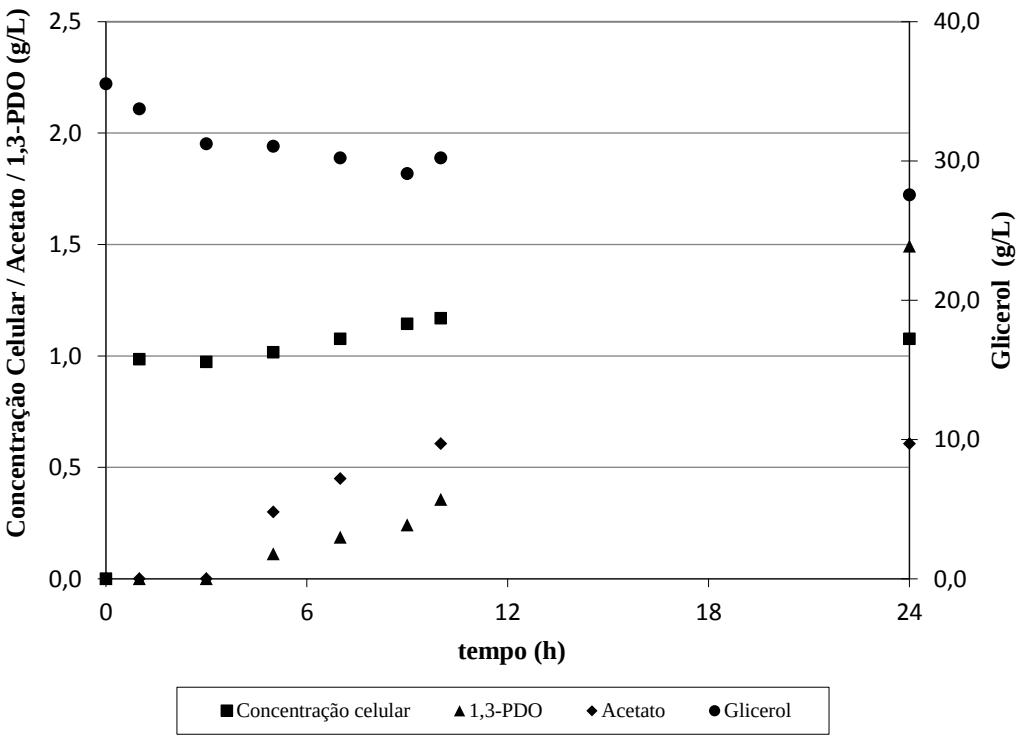

Figura IV.20 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em meio contendo 40,0 g.L^{-1} de glicerina bruta.

Nos diferentes experimentos realizados, contendo 10, 20, 30 e 40 g.L^{-1} de glicerina, foi possível verificar que o único subproduto formado foi o acetato, nas concentrações de 0,65; 1,11; 1,49; 0,61 g.L^{-1}; respectivamente.

Na Tabela V.6 encontram-se os valores de rendimento de glicerol em biomassa ($Y_{Biomassa/Glicerol}$), em 1,3-PDO ($Y_{1,3\text{-}PDO/Glicerol}$), em acetato ($Y_{Acetato/Glicerol}$) e o pH obtidos em cada experimento após 24 horas.

Tabela IV.8 – Conversão de glicerol em biomassa ($Y_{Biomassa/Glicerol}$), 1,3-PDO ($Y_{1,3\text{-}PDO/Glicerol}$), acetato ($Y_{Acetato/Glicerol}$) e o pH obtidos após 24 horas nos diferentes experimentos realizados.

Meio	Concentração inicial de glicerol (g.L^{-1})	$Y_{1,3\text{-}PDO/Glicerol}$ (g.g^{-1})	$Y_{Acetato/Glicerol}$ (g.g^{-1})	$Y_{Biomassa/Glicerol}$ (g.g^{-1})	pH final
1	10	0,416	0,164	0,031	6,65
2	20	0,437	0,216	0,016	6,53
3	30	0,203	0,171	0,011	6,42
4	40	0,187	0,076	0,011	6,73

É possível verificar que nos experimentos com as menores concentrações de glicerol os rendimentos em 1,3-PDO foram bem parecidos, porém o valor foi um pouco superior para o experimento no Meio 2, que também apresentou maior rendimento em acetato e menor rendimento em biomassa, aproximadamente a metade do obtido no experimento no Meio 1. Segundo Zeng & Biebl (2002), o rendimento em 1,3-PDO depende da combinação e estequiometria das vias redutoras e oxidativas. A combinação da formação de 1,3-PDO com acetato como único subproduto da via oxidativa gera o máximo de rendimento em 1,3-PDO. Para esta combinação a equação da fermentação deve ser escrita segundo a Equação V.1.

$$2CH_2OH\text{-}CHOH\text{-}CH_2OH \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + H_2 + 2CH_2OH\text{-}CH_2\text{-}CH_2OH + H_2 \qquad \text{Eq. V.1}$$

Sendo assim, é possível visualizar que para cada mol de ácido acético formado também se formará dois mols de 1,3-PDO, o que gera uma relação em massa de 152 g de 1,3-PDO para 60 g de ácido acético, ou seja, uma razão de aproximadamente 2,53. Esta relação foi obtida no experimento no Meio 1 como pode ser visto na Tabela V.7. O experimento realizado no Meio 2 apesar de apresentar maior rendimento em 1,3-PDO apresentou menor razão $Y_{1,3\text{-}PDO/Glicerol}$/ $Y_{Acetato/Glicerol}$, pois a conversão de glicerol em acetato foi significativamente maior do que no experimento no Meio 1, o que justifica o pH final um pouco inferior.

Tabela IV.9 – Razão entre o rendimento de glicerol em 1,3-PDO e o rendimento de glicerol em acetato obtida nos diferentes experimentos realizados.

Meio	Concentração inicial de glicerol ($g.L^{-1}$)	$Y_{P/S\ 1,3\text{-}PDO}$ / $Y_{P/S\ Acetato}$
1	10	2,54
2	20	2,03
3	30	1,18
4	40	2,46

No experimento no Meio 3 houve uma redução significativa no rendimento de glicerol em 1,3-PDO, indicando uma possível inibição da formação deste. O mesmo ocorreu no experimento no Meio 4, porém neste experimento houve inibição também da produção de ácido acético.

Como já foi dito anteriormente, a literatura reporta a inibição da produção de 1,3-PDO. Em elevadas concentrações de glicerol, o 3-HPA se acumula e é excretado da célula

até certa concentração tolerável já que este apresenta efeito bactericida. Em seguida, quando parte do glicerol já foi consumido, o 3-HPA é metabolizado e convertido em 1,3-PDO.

A inibição da produção de 1,3-PDO pode ser facilmente percebida quando comparamos o experimento em Meio 2 (Figura V.18), onde foi obtido o maior rendimento em 1,3-PDO, com o experimento em Meio 3 (Figura V.19). No Meio 2, o 1,3-PDO já é produzido logo nas primeiras horas de experimento, atingindo 0,67 $g.L^{-1}$ após 6 horas de experimento. Já no Meio 3, o produto de interesse só começa a aparecer após 4 horas de experimento e atinge apenas 0,42 $g.L^{-1}$ após 7 horas de experimento. A concentração de 1,3-PDO neste após 24 horas é aproximadamente 21,5 % menor do que no experimento em Meio 2.

A inibição foi ainda mais intensa no Meio 4, onde a concentração inicial de glicerol foi maior. Neste caso, o produto de interesse só apareceu após 5 horas de experimento e numa concentração muito baixa, cerca de 0,10 $g.L^{-1}$. Após 10 horas de experimento, a produção de 1,3-PDO foi de 0,36 $g.L^{-1}$, contra 1,18 $g.L^{-1}$ obtido no Meio 3. Após 24 horas, a produção foi 33,8 % menor do que no Meio 2.

Segundo os dados obtidos por Zeng & Biebl (2002), o pico de 3-HPA no meio de cultivo ocorre por volta de 15 horas e, em seguida, o 3-HPA começa a ser convertido em 1,3-PDO, sendo que o pico de produção deste ocorre após 60 horas de experimento quando o glicerol é totalmente consumido.

O tempo de 24 horas não foi suficiente para que todo o glicerol fosse consumido. Além disso, a partir de 30 $g.L^{-1}$ de glicerina, que corresponde a cerca de 25 $g.L^{-1}$ de glicerol já que a glicerina usada tem cerca de 83 % de pureza, a cepa *C. freundii* ATCC 8090 já sofre inibição da produção de 1,3-PDO. Sendo assim, o rendimento em 1,3-PDO obtido foi menor nos experimentos com as maiores concentrações de glicerol. Contudo, caso o experimento tivesse sido realizado por mais tempo possivelmente todo o glicerol seria consumido e o todo 3-HPA convertido em 1,3-PDO, gerando um concentração final de 1,3-PDO maior no experimento em Meio 4. Portanto, o objetivo dessa parte do trabalho foi verificar a concentração máxima de glicerina bruta que não afeta o metabolismo microbiano, ou seja, não causa inibição da produção de 1,3-PDO visando trabalhar sempre com essa concentração como um parâmetro limite para otimizar a produção nas diferentes estratégias operacionais.

IV.2.3 – Experimentos em biorreator

Após o processo de otimização da concentração de L-cisteína, da concentração inicial de glicerol e da concentração dos principais sais presentes no meio de produção foram, então, iniciados os experimentos em biorreator.

No primeiro experimento realizado em biorreator, descrito no item IV.5.3, o glicerol foi consumido e houve expressivo crescimento celular na etapa aeróbia. Contudo, na etapa anaeróbia não houve consumo de glicerol e consequentemente não houve produção de 1,3-PDO, indicando que ocorreu inibição do metabolismo celular ao se purgar nitrogênio no meio de cultivo.

Alguns experimentos em biorreator, modificando os parâmetros de aeração e agitação, foram realizados, mas nenhum obteve resultados positivos quanto o consumo de glicerol e a produção de 1,3-propanodiol na etapa anaeróbia.

Essa inibição pode ter ocorrido em função da mudança brusca do ambiente aeróbio para o ambiente anaeróbio, visto que o reator de encontrava-se sob agitação e aeração e ao encerrar-se a etapa aeróbia houve purga de nitrogênio ultrapuro no sistema. Sendo assim, optou-se por uma nova estratégia.

A nova estratégia consistiu em manter a etapa aeróbia, porém ao alimentar o sistema com o meio contendo glicerol e L-cisteína não foi realizada a purga de nitrogênio ultrapuro no meio de cultivo, apenas desligou-se a aeração e utilizou-se o nitrogênio para realizar a alimentação do reator.

Neste novo experimento a produção de 1,3-PDO foi muito baixa como pode ser visto na Figura V.21, apenas 1,60 $g.L^{-1}$ após 24 horas de fermentação. Vale ressaltar que essa concentração pode ter sido atingida antes de 24 horas, porém não foi possível detectar devido a ausência de amostragem noturna. É possível ainda visualizar o baixo consumo de glicerol e a produção de ácido acético (2,00 $g.L^{-1}$).

Sendo assim, esse experimento realizado indicou que de fato a purga com nitrogênio no biorreator para iniciar a etapa anaeróbia inibiu de certa forma a cepa *C. freundii* ATCC 8090, mas não parece ser único fator determinante para a produção de 1,3-PDO.

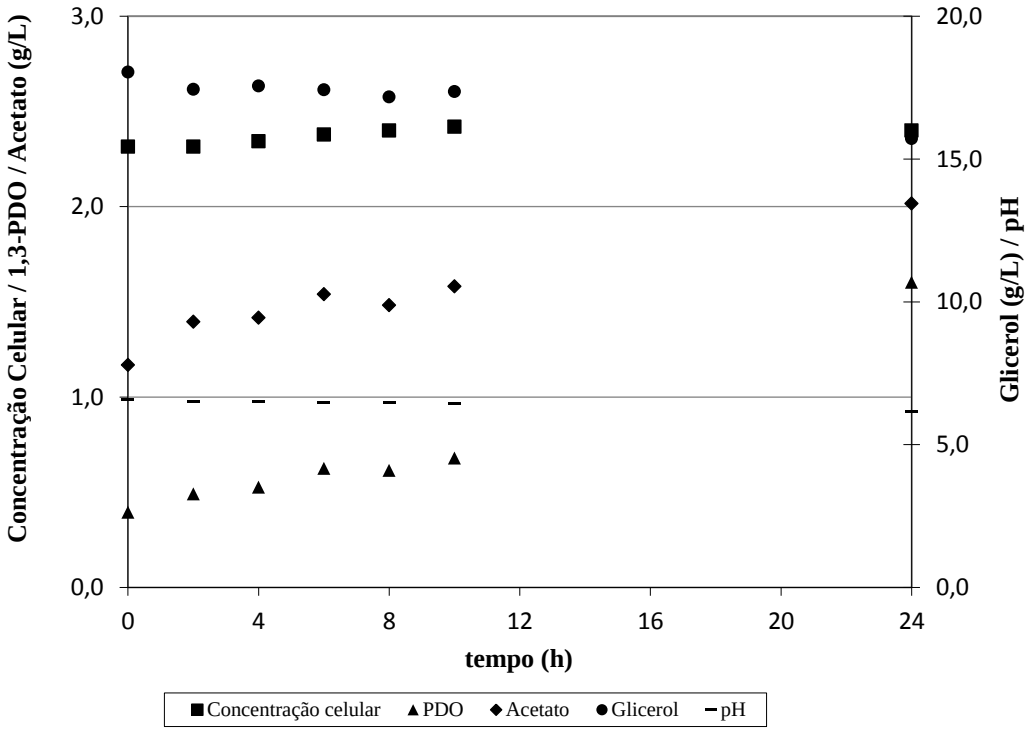

Figura IV.21 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator em condições anaeróbias.

Em seguida, estudou-se a possibilidade de haver limitação de nutrientes na segunda etapa, ou seja, na etapa anaeróbia. Logo, todo o procedimento anterior foi repetido, porém ao se desligar a aeração o sistema foi alimentado com um meio contendo glicerol, L-cisteína e extrato de levedo. Contudo, essa tentativa também não obteve sucesso.

Pensou-se, então, na possibilidade da etapa aeróbia estar criando um ambiente tão oxidativo que apesar da cepa utilizada ser facultativa, esta não está sendo capaz de adaptar toda sua maquinária enzimática para sobreviver em ambiente com ausência de oxigênio. Este ambiente não é tão oxidativo em agitador rotatório, onde só há agitação, não havendo aeração do sistema. Sendo assim, optou-se por realizar a etapa aeróbia em agitador rotatório e inocular as células já crescidas em biorreator para, então, realizar a etapa anaeróbia, de produção de 1,3-PDO. Esta metodologia é mais similar a estratégia utilizada nos experimentos preliminares realizados em agitador rotatório, quando se obteve uma boa produção de 1,3-PDO.

Como a quantidade de células era elevada, acreditou-se que todo o oxigênio presente logo seria consumido, e o sistema ficaria naturalmente anaeróbio.

IV.2.4 – Experimentos em agitador rotatório/ biorreator

Como a estratégia de realizar em biorreator a etapa aeróbia, para crescimento celular, e depois a etapa anaeróbia, para produção de 1,3-PDO, não obteve muito sucesso, optou-se por realizar a etapa aeróbia em agitador rotatório e a etapa anaeróbia em biorreator.

A produção de 1,3-PDO em 24 horas foi de apenas 1,72 $g.L^{-1}$. Portanto, foi possível verificar que após esse tempo ainda restou cerca de 15,7 $g.L^{-1}$ de glicerol, sendo o consumo de aproximadamente 2,5 $g.L^{-1}$. Apesar da conversão de glicerol em 1,3-PDO ter sido de 52 % ($g.g^{-1}$), os resultados indicaram que 24 horas não foi suficiente para que a cepa convertesse todo o glicerol no produto de interesse. Sendo assim, outro experimento foi realizado, porém com a duração de 48 horas.

No experimento apresentado na Figura V.22 (etapa anaeróbia), a produção de 1,3-PDO foi de 7,12 $g.L^{-1}$ em 48 horas. Ainda assim, verificou-se a presença de aproximadamente 2,5 $g.L^{-1}$ de glicerol ao final do experimento, indicando que as 48 horas não foram suficientes para converter todo glicerol. A conversão de glicerol em 1,3-PDO foi de 49 % ($g.g^{-1}$) e em ácido acético foi 23 % ($g.g^{-1}$), atingindo 3,90 $g.L^{-1}$ de acetato no meio de cultivo.

A produtividade obtida em biorreator, 0,15 $g.L^{-1}.h^{-1}$, foi muito inferior a obtida em agitador rotatório nos experimentos realizados anteriormente, que foi de 0,34 $g.L^{-1}.h^{-1}$, mesmo que essa produtividade possa estar subestimada em função da ausência de amostragem noturna.

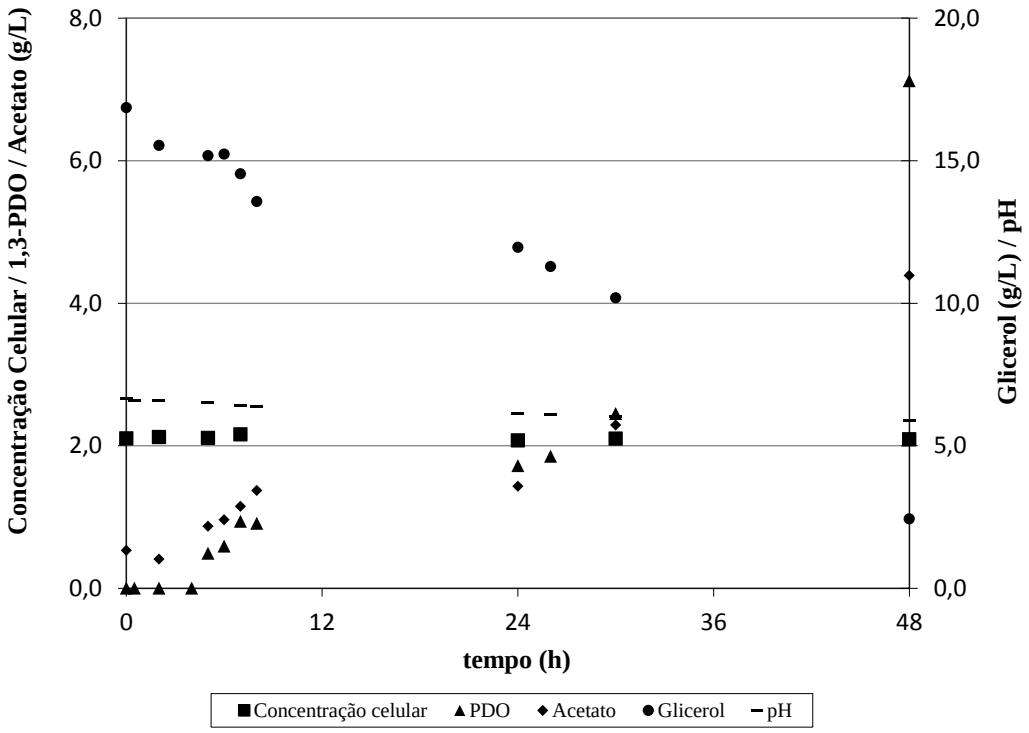

Figura IV.22 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO e acetato do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator com duração de 48 horas.

Apesar de ter ocorrido produção de 1,3-propanodiol, a produtividade não foi expressiva, optou-se, então, por retornar a escala de erlenmeyer a fim de testar a viabilidade da cepa e também da matéria-prima utilizada como substrato, ou seja, a glicerina bruta. Em função das constantes falta de luz, pensou-se na possibilidade de ambas terem sofrido algum dano.

Os experimentos realizados em agitador rotatório (resultados não apresentados) demonstraram que tanto a cepa de *C. freundii* ATCC 8090 quanto a glicerina bruta encontravam-se viáveis. Com isso, conclui-se que possivelmente estava ocorrendo uma inibição da produção de 1,3-PDO nos experimentos realizados em biorreator.

IV.2.5 – Experimentos em biorreator: novas estratégias

IV.2.5.1 – Primeira estratégia

A primeira estratégia consistiu em realizar as duas etapas em biorreator, tanto a etapa de geração de biomassa como a etapa de produção de 1,3-PDO, porém as duas em anaerobiose. Contudo, essa estratégia não se mostrou viável, pois não houve crescimento celular em biorreator nas condições anaeróbias.

A ausência de crescimento celular em meio anaeróbio em biorreator foi um fato estranho, que levou ao questionamento dos experimentos realizados em agitador rotatório. É possível que estes não tenham sido realizados em condições anaeróbias, e sim em condições de microaerofilia. Sendo assim, realizou-se novos experimentos em agitador rotatório utilizando erlenmeyers com rolhas de plásticos adaptadas com mangueiras para amostragem, como usualmente era utilizado (Figura V.23(A)), e erlenmeyers com rolhas de plástico sem as mangueiras (Figura V.23(B)) a fim de verificar se no sistema usualmente utilizado poderia ser equiparado a um sistema realmente fechado.

Figura IV.23 – Frascos erlenmeyer utilizados nos experimentos (A) vedados com rolhas de plásticos adaptadas com mangueiras e (B) vedados com rolhas de plástico sem as mangueiras.

Os resultados apontaram a ausência de 1,3-PDO no frasco vedado com a rolha de plástico. Contudo, houve produção de aproximadamente 1,85 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO nos frascos com as rolhas adaptadas com a mangueira. Esses resultados apontam que nos frascos que

eram utilizados usualmente nas fermentações em agitador rotatório não eram totalmente vedados, havendo troca gasosa. Sendo assim, resolveu-se estudar a produção de 1,3-PDO em condições de microaerofilia a fim de comprovar essa teoria.

IV.2.5.2 – Segunda estratégia

A Figura V.24 apresenta o perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e de acetato e pH no experimento de *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator. É possível verificar que ocorreu produção de 1,3-propanodiol tanto na primeira etapa em microaerofilia quanto na etapa anaeróbia, sendo que na etapa realizada sob condições de microaerofilia a produção foi mais expressiva. Após o inóculo, iniciou-se o experimento com uma vazão de ar de 0,5 vvm, após 6 horas de experimento essa vazão foi aumentada para 1,0 vvm, pois o consumo de glicerol e o crescimento celular estavam baixos e ocorreu formação de pellets no meio de cultura. Esse aumento na vazão de ar pareceu ter um efeito positivo, porém devido a problemas operacionais o biorreator passou parte da noite sem agitação. A agitação foi religada e após 4 horas de agitação reestabelecida o consumo de glicerol foi bastante elevado e a produção de 1,3-propanodiol havia aumentado cerca de 1,0 $g.L^{-1}$, caracterizando uma produtividade de aproximadamente 0,25 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Contudo, verificou-se que a agitação encontrava-se novamente desligada, ou seja, essa produção de 1,0 $g.L^{-1}$ pode ter ocorrido num tempo até mesmo inferior a 4 horas. A agitação foi novamente religada e o meio neutralizado devido a redução do pH. O consumo de glicerol continuou, mas a produção de 1,3-PDO permaneceu constante.

Quando a concentração de glicerol ficou inferior a 5 $g.L^{-1}$, a aeração foi desligada e fez-se a alimentação com o meio contendo glicerol, extrato de levedo e L-cisteína. Nas primeiras horas após a alimentação ocorreu expressivo consumo de glicerol, porém a produção de 1,3-propanodiol não foi tão elevada quanto a que ocorreu na primeira etapa do experimento.

É importante ressaltar que logo nas primeiras horas de experimento, onde a concentração de glicerol era de aproximadamente 22 $g.L^{-1}$ houve quantificação de um produto no HPLC que não foi identificado. Após o consumo de glicerol e a redução de sua concentração esse produto sumiu do meio de cultivo. Porém após a alimentação, onde a concentração de glicerol voltou a crescer ocorreu novamente o aparecimento de tal produto. Esse produto pode ser o intermediário, 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), que segundo Barbirato *et al.* (1996) é excretado para o meio quando a concentração de glicerol é elevada

no meio de cultivo. Infelizmente esse composto é muito instável e não há padrões disponíveis no mercado para que esse intermediário possa ser analisado.

Apesar dos problemas com a queda de energia e a baixa produção de 1,3-PDO (2,5 $g.L^{-1}$) neste experimento foi possível constatar que a produção do produto de interesse não ocorre somente em anaerobiose, mas também em condições de microaerofilia. Contudo esse ponto deve ser minuciosamente estudado de maneira que se otimize a vazão de oxigênio ideal no meio para que a via de produção de 1,3-PDO não seja inibida.

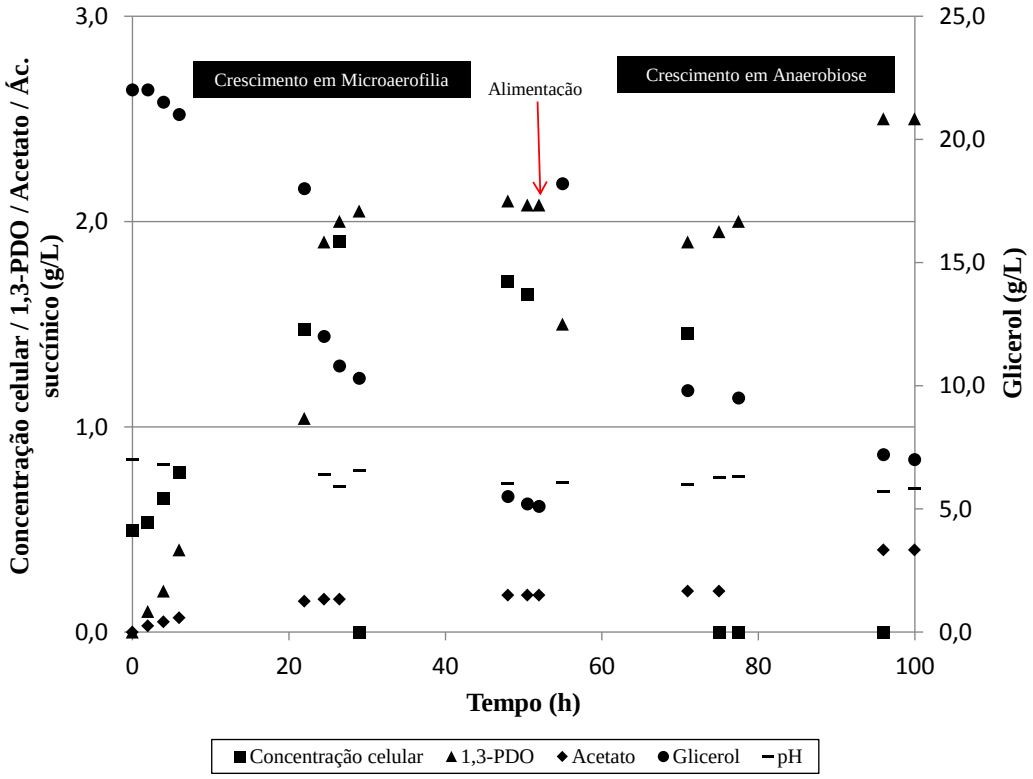

Figura IV.24 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e acetato e pH no experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator.

IV.2.5.3 – Experimento em baixa aeração

A fim de confirmar a produção de 1,3-PDO em baixa aeração por *C. freundii* ATCC 8090 realizou-se um experimento em biorreator utilizando cerca de 1,2 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto).

A Figura V.24 mostra o perfil de crescimento celular, o consumo de glicerol, a produção de 1,3-PDO e de acetato e o pH do experimento realizado sob baixa aeração. É possível verificar que realmente ocorreu produção de 1,3-PDO, atingindo 3,90 $g.L^{-1}$ após 24 horas de fermentação.

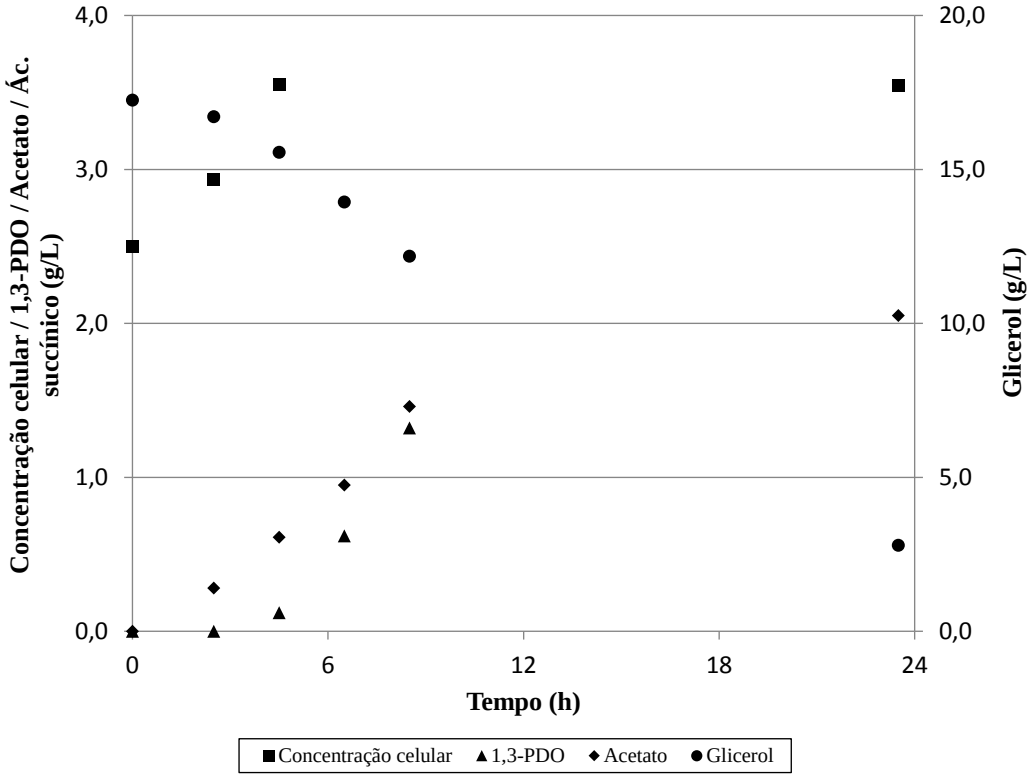

Figura IV.25 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO e acetato e pH do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator com 1,2 vvm.

IV.2.6 – Estudo da produção de 1,3-PDO em baixas aerações

A fim de estudar a produção de 1,3-PDO em baixas concentrações de oxigênio dissolvido realizaram-se novos experimentos como o descrito no item IV.5.6, porém variando-se o volume de ar por volume de meio por minuto (vvm). Foram testadas as condições de 1,0, 1,5 e 2,0 vvm.

A Figura V.26 apresenta o perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, acetato e ácido succínico no experimento com 1,0 vvm. É possível verificar que após 24 horas de fermentação ainda restavam aproximadamente 7,0 $g.L^{-1}$ de glicerol no meio, indicando um lento consumo de glicerol. A produção de 1,3-PDO também

não foi muito expressiva, atingindo 2,80 g.L^{-1} após 24 horas. Ocorreu também produção de acetato e ácido succínico nas concentrações de 2,16 g.L^{-1} e 0,84 g.L^{-1}, respectivamente.

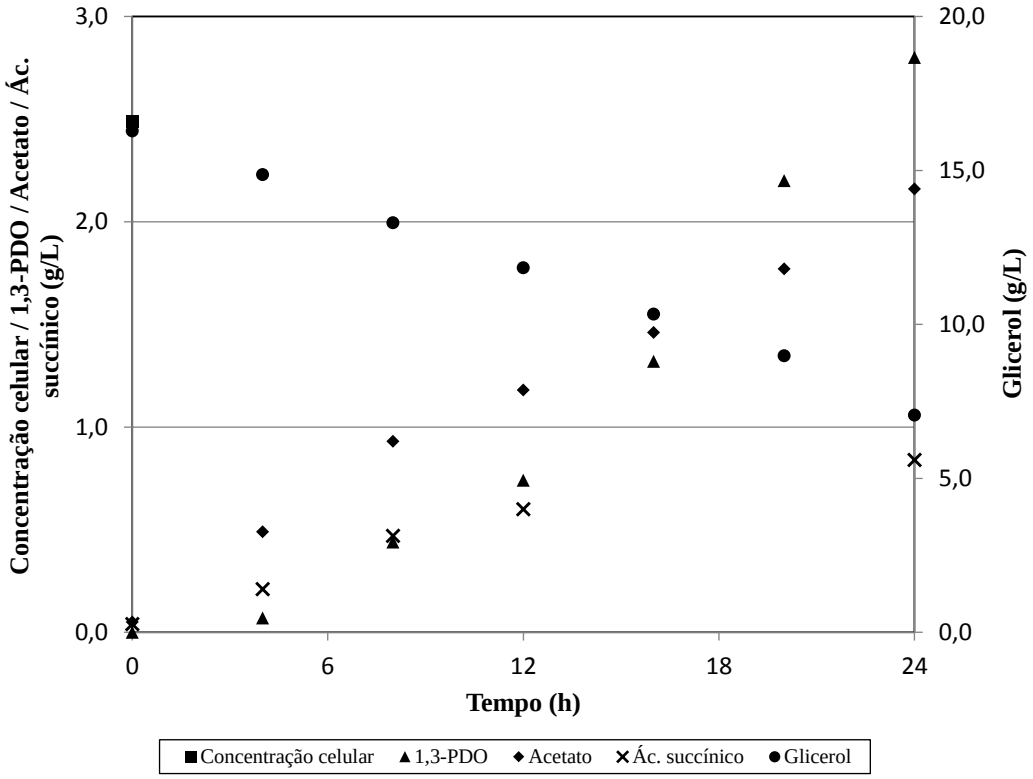

Figura IV.26 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, acetato e ácido succínico do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator com 1,0 vvm.

A Figura V.27 apresenta o perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, acetato e ácido succínico no experimento com 1,5 vvm. Após 20 horas de fermentação, praticamente todo o glicerol presente no meio foi consumido, obtendo-se 4,55 g.L^{-1} de 1,3-PDO após 24 horas de fermentação. O único co-produto detectado foi acetato na concentração de 4,18 g.L^{-1}.

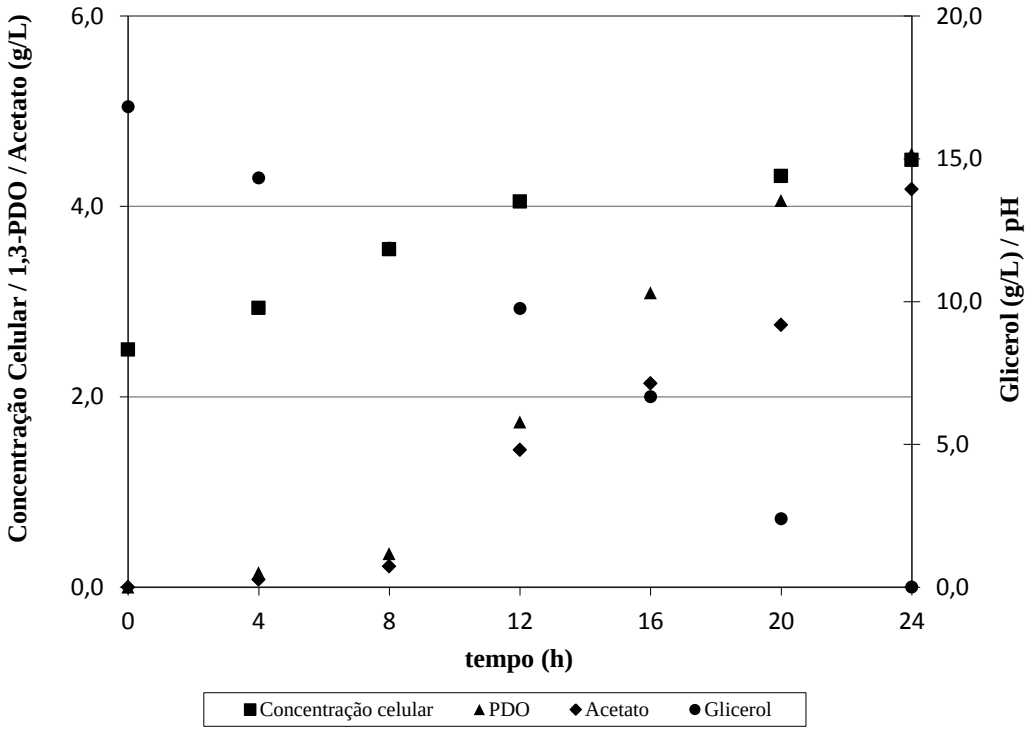

Figura IV.27 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, acetato e ácido succínico do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator com 1,5 vvm.

A Figura V.28 apresenta o perfil de crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO, acetato e ácido succínico no experimento com 2,0 vvm. O consumo de glicerol foi ainda mais rápido do que no experimento com 1,5 vvm. Após 16 horas de fermentação havia muito pouco glicerol no meio (1,68 $g.L^{-1}$). A produção de 1,3-PDO atingiu 3,67 $g.L^{-1}$após 24 horas de fermentação e a produção de ácido acético atingiu 4,22 $g.L^{-1}$ nesse mesmo tempo, superando a produção de 1,3-PDO.

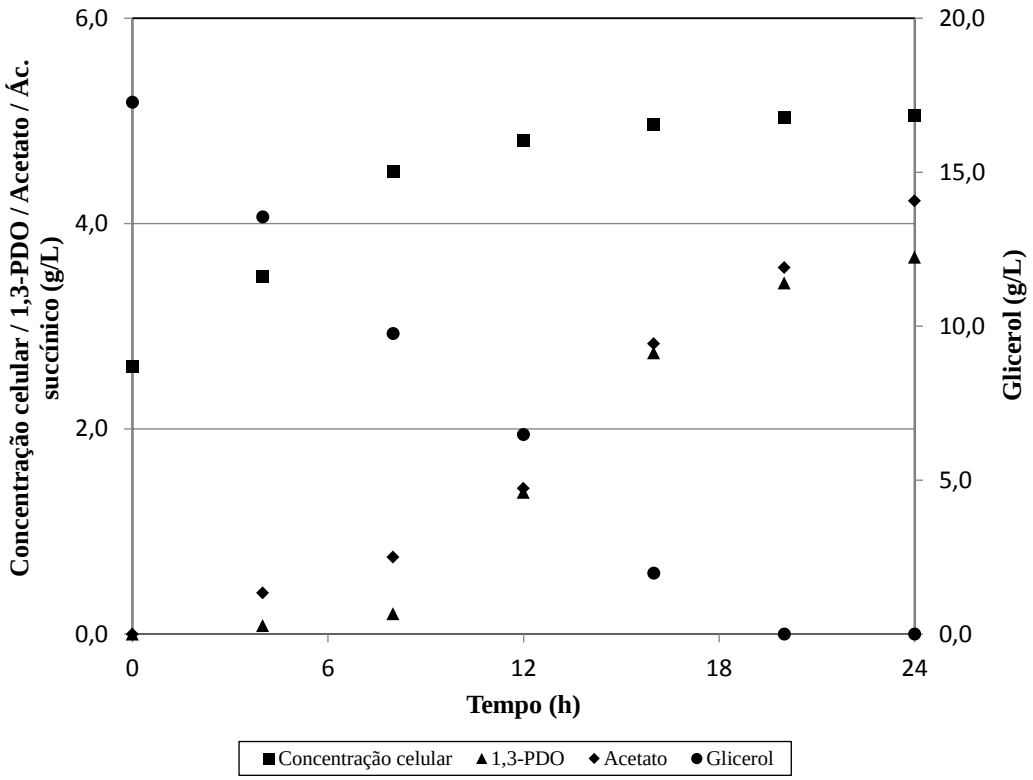

Figura IV.28 – Perfil de crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 1,3-PDO, acetato e ácido succínico do experimento com *C. freundii* ATCC 8090 em biorreator com 2,0 vvm.

A Tabela V.8 resume os rendimentos de glicerol em biomassa, 1,3-PDO, acetato e ácido succínico e a produtividade em relação ao produto de interesse. O aumento da aeração do sistema consequentemente aumenta o fluxo da via oxidativa da *C. freundii* aumentando, assim, o rendimento de conversão de glicerol em biomassa. Contudo, o aumento de atividade da via oxidativa diminui o rendimento de conversão de glicerol em 1,3-PDO apesar de acelerar o consumo de glicerol. Sendo assim, a condição de 1,5 vvm se mostrou a melhor condição para produção de 1,3-PDO, pois apesar do rendimento de conversão de glicerol em 1,3-PDO ter sido inferior do que os obtidos em anaerobiose, o consumo de glicerol foi bem mais rápido, o que resultou numa maior produtividade.

Tabela IV.10 – Rendimento de glicerol em 1,3-PDO, em acetato, em biomassa e em ácido succínico nos diferentes experimentos realizados.

vvm	$[1,3\text{-PDO}]_{final}$ ($g.L^{-1}$)	$Y_{1,3\text{-PDO/Glicerol}}$ ($g.g^{-1}$)	$Y_{Acetato/Glicerol}$ ($g.g^{-1}$)	$Y_{Biomassa/Glicerol}$ ($g.g^{-1}$)	$Y_{Ác.\ succínico/Glicerol}$ ($g.g^{-1}$)	$Q_{1,3\text{-PDO}}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
1,0	2,80	0,303	0,229	0,091	0,087	0,12
1,5	4,55	0,271	0,249	0,118	0,0	0,19
2,0	3,67	0,213	0,244	0,141	0,0	0,15

Normalmente, a produção de 1,3-PDO se dá em anaerobiose, porém a produção de 1,3-PDO em condições de microaerofilia ou baixa aeração por *Klebsiella pneumonia* têm sido bastante discutido na literatura (Saxena *et al.*, 2009). Um exemplo é o trabalho reportado por Chen *et al.* (2003) que produziram 1,3-PDO em condições de microaerofilia aumento a produtividade de 0,80 para 1,57 $g.L^{-1}.h^{-1}$, quando comparada com a produtividade em anaerobiose.

A literatura reporta também a produção de 1,3-propanediol em condições de baixa aeração por *Citrobacter freundii*. Hao *et al*. (2008) foram os primeiros e até o momento únicos a reportarem a produção de 1,3-PDO por *C. freundii* em baixa aeração. Hao *et al.* (2008) isolaram 16 cepas das quais 9 foram capazes de produzir 1,3-PDO a partir de glicerol em baixa aeração. Das nove cepas duas foram identificadas como *K. pneumonia*, uma como *K. oxytoca* e as outras seis como *C. freundii*. Hao *et al.* (2008) cresceram essas cepas em biorreator em meio muito semelhante ao utilizado no presente trabalho, porém contendo 30 $g.L^{-1}$ de glicerol, utilizando a agitação de 250 rpm, temperatura de 37 ˚C e taxa de alimentação de ar de 2 $L.min^{-1}$, ou seja, 0,5 vvm já que o reator operou com 4 L de meio de cultivo. A cepa mais produtiva produziu 1,16 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO após 24 horas de fermentação.

No presente trabalho foi possível comprovar a produção de 1,3-PDO em aerações superiores àquelas reportadas na literatura, inclusive com aumento da produtividade em função do aumento da aeração. Contudo, há um limite que se deve manter a aeração para que a via oxidativa não prevaleça sob a via redutora resultando na redução da produtividade e queda do rendimento de glicerol em 1,3-PDO.

IV.3 – Análise do mercado brasileiro de 1,3-propanodiol

Segundo SBI *Energy* (2010), o segmento de intermediários químicos biorenováveis vai crescer muito fortemente, aproximando-se dos US$ 3 bilhões em 2015 e mostrando uma taxa de crescimento anual de 33% entre 2011 e 2015. O bioetileno será o maior intermediário em volume de vendas na categoria de produtos químicos biorenováveis em 2015. Apesar disso, os polihidroxialcanoatos (PHA) apresentarão o maior mercado em termos de receita, devido ao seu maior custo de produção. SBI *Energy* (2010) estima que a produção anual de poli (ácido láctico) (PLA) será mais que o dobro entre 2011 e 2015, enquanto a produção de 1,3-propanodiol (PDO) vai triplicar, e a produção de PHA irá quadruplicar.

O mercado de 1,3-PDO foi estimado em US$ 157 milhões em 2012 e vai crescer a uma taxa anual de 15,7% até 2014 (MarketsandMarkets, 2012). A progressão realizada por MarketsandMarkets (2012) prevê que o mercado de 1,3-PDO em 2019 movimentará US$ 560 milhões, apresentando uma taxa anual de crescimento de 19,9% entre 2012 e 2019.

No Brasil, o mercado de 1,3-PDO ainda é muito menos expressivo. O país importou uma quantidade significativa (6.000 kg) de 1,3-PDO em 1999. Essa quantidade foi importada da Alemanha, totalizando um valor de US$ 18.296,00 como é possível verificar na Figura V.29. Sendo assim, o 1,3-PDO importado pelo Brasil em 1999 custou aproximadamente US$3,05/Kg (AliceWeb).

O 1,3-PDO importado em 1999 foi proveniente de rota petroquímica, muito possivelmente da rota de hidratação da acroleína seguida de hidrogenação, tecnologia comercial desenvolvida pela Degussa, empresa alemã.

Após 1999, não ocorreram importações significativas de 1,3-PDO até o ano de 2008, quando o Brasil importou 23.502 Kg de PDO (Figura V.29). A maior parte (20.500 kg) foi importada da China e custou cerca de US$ 38.762,00, ou seja, US$1,89/Kg. Em 2008, o Brasil importou também 3.000 Kg da Itália a um preço de US$ 3,39/Kg e 2 Kg dos Estados Unidos a um valor de US$ 62,00/Kg (AliceWeb).

Apesar do aumento das importações de 1,3-PDO a partir de 2008 pelo mercado brasileiro, é possível verificar uma descontinuidade nas importações de 1,3-PDO em 2009 e uma quantidade não muito significativa (401 Kg) em 2010 (Figura V.29) (AliceWeb). Possivelmente, uma grande empresa no Brasil importou uma elevada quantidade de 1,3-PDO em 2008 com o objetivo de, nos anos seguintes, repassar para outras empresas no

mercado brasileiro. Por isso, nos anos seguintes, 2009 e 2010 não houve importações expressivas no Brasil. Contudo, uma forte crise econômica global que começou em 2008, desacelerando o mercado, fez com que parte desse intermediário químico não encontrasse destino no mercado brasileiro. Sendo assim, em 2011 o Brasil exportou 3.000 Kg de 1,3-PDO para a Itália a um preço US$ 3,65/Kg (AliceWeb).

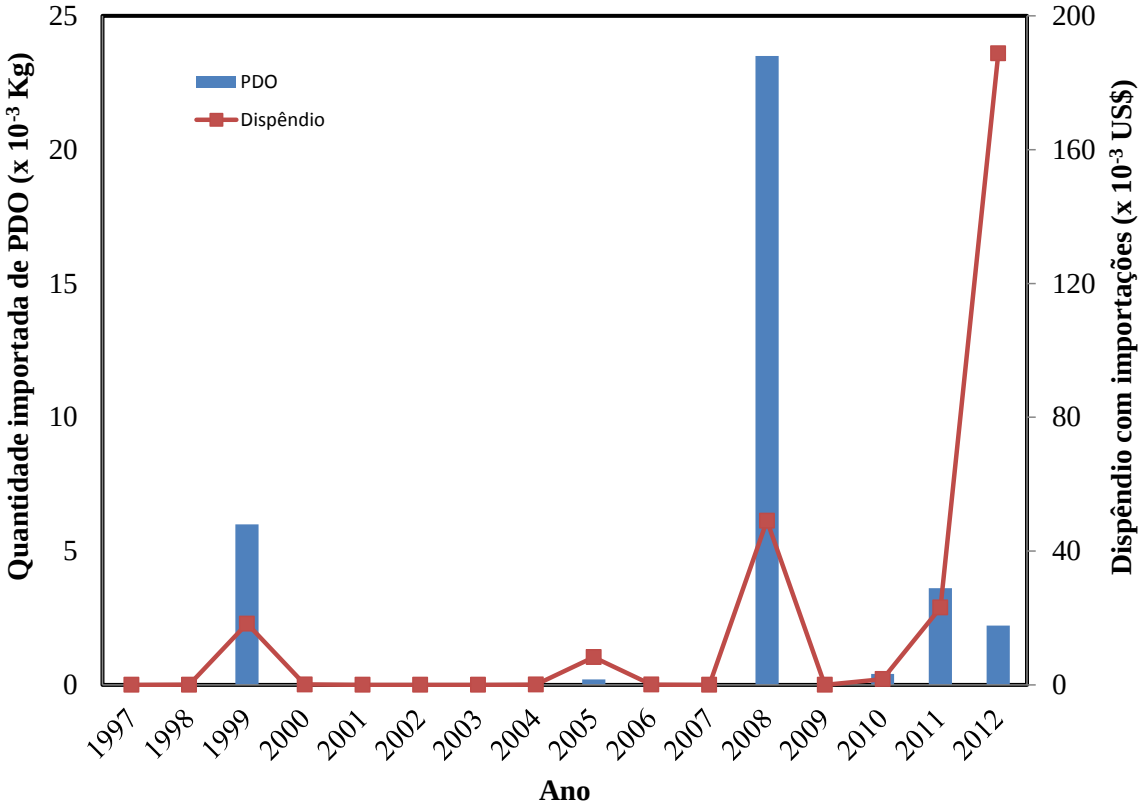

Figura IV.29 – Evolução da quantidade importada de PDO e os dispêndios com a importação no período de 1999 a 2012. Elaboração própria. Dados obtidos de http://aliceweb2.mdic.gov.br.

O aumento das importações de 1,3-PDO no Brasil coincide com a entrada em operação planta BioPDO da Dupont, final de 2006. Apesar de em 2008 só ter sido importado 2 Kg dos Estados Unidos, o preço desse intermediário petroquímico foi bem superior às demais importações realizadas, indicando que este 1,3-PDO contém um grau de pureza mais elevado.

Quantidades expressivas de 1,3-PDO tornaram a ser importadas em 2011 e 2012, como mostra a Figura V.29, sendo que em 2011 foram importados 3.613 Kg. A maior parte (3.611 Kg) foi fornecido pelos Estados Unidos a um preço médio de US$ 5,99/Kg. Porém cerca de 2 Kg foi importado da China a um valor total de US$ 1.400,00. Já em 2012 foram

importados 2.215 Kg, sendo 2.214 kg dos Estados Unidos a um preço médio de US$ 85,25 e 1 Kg da China a US$ 96,00 (AliceWeb).

Praticamente todo 1,3-PDO importado nos últimos anos foi proveniente dos Estados Unidos. Como a empresa DuPont é atualmente a principal produtora de 1,3-PDO e utiliza a rota biotecnológica, o 1,3-PDO importado pelo Brasil nos últimos anos parece ser um produto proveniente de matéria-prima renovável. Ainda na Figura V.29, é possível verificar um aumento muito significativo no preço do PDO nos últimos anos. O processo fermentativo gera um produto com maior valor agregado, sendo capaz de ser utilizado no setor de fármacos e cosméticos devido a sua menor irritabilidade e elevada pureza (DUPONT & TATE LYLE).

O baixo volume comercializado de 1,3-PDO no mercado internacional é justificado pelo fato da empresa DuPont, principal produtora, utilizar grande parte para a produção do PTT, atualmente produzido com o nome comercial de Sorona. Este compete com outros poliéteres glicóis produzidos pela Dow Chemical, Bayer, BASF, Huntsman, e Shell Chemicals. O mercado de polióis tem um consumo global anual de aproximadamente 6 milhões de toneladas com demanda crescente de 5% ao ano (PAVONE, 2013).

De forma direta o 1,3-PDO ainda não possui grande volume comercializado, porém sua utilização como monômero para síntese de PTT vem aumentando, já que este poliéster ganha cada vez mais fatia de mercado devido as suas propriedades físicas interessantes, como foi discutido no item II.1.2. Além disto, ele é originado, em parte, de fonte renovável elevando o apelo pela substituição dos polímeros de fonte exclusivamente petroquímica. Este fato é confirmado pelo estudo PRO-BIP (2009), que revela a potencial demanda a ser conquistada pelos emergentes biopolímeros, em especial o PTT que possuía em 2009 uma possível demanda de 5 milhões de toneladas por ano, levando em conta uma análise mais conservadora da projeção realizada no estudo citado.

A situação atual do Brasil não justifica a instalação de uma planta de produção de PDO para atender a demanda interna deste produto, pois esta ainda é muito pequena e variável. Contudo, se o interesse é atender o mercado internacional, que apresenta crescente demanda de PDO, ou ainda, produzir PTT, que apresenta potencial demanda no mercado internacional, é possível a viabilização de uma unidade de produção de PDO no Brasil.

IV.4– Modelo Cibernético

IV.4.1– Rede Metabólica

A primeira etapa para modelagem foi a identificação da rede metabólica a ser usada em função das enzimas chave do metabolismo celular para determinado fim, no caso, produção de 1,3-PDO.

Após alguns experimentos realizados sob baixa oxigenação utilizando glicerina bruta, verificou-se que o glicerol era convertido em 1,3-PDO, acetato, ácido succínico e lactato. Sendo assim, a rede metabólica foi simplificada, de maneira a conter somente as vias ativas nas condições utilizadas nas fermentações. A rede metabólica simplificada encontra-se detalhada na Figura V.30 e a Tabela V.9 apresenta os metabólitos extracelulares (produtos e substrato) e os metabólitos intracelulares (intermediários) da rede metabólica.

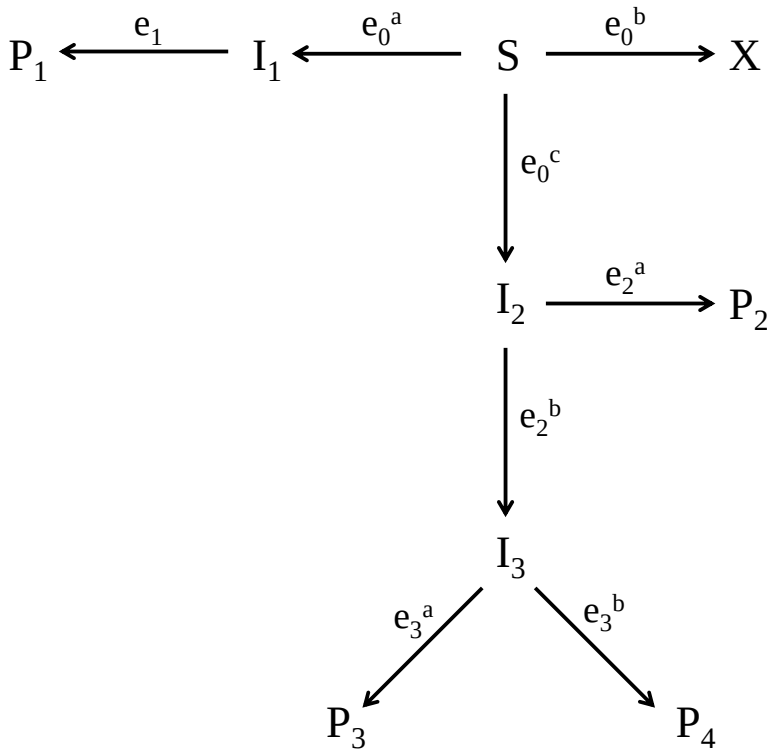

Figura IV.30 – Rede metabólica para *C. freundii* crescendo em glicerol.

Tabela IV.11 – Metabólitos extracelulares e intracelulares da rede metabólica de *C. freundii*.

S	Substrato	Glicerol
X	Produto	Biomassa
P_1	Produto	1,3-propanodiol
P_2	Produto	Ácido Succínico
P_3	Produto	Lactato
P_4	Produto	Acetato
I_1	Intermediário	3-hidroxipropionaldeído
I_2	Intermediário	Fosfoenolpiruvato
I_3	Intermediário	Piruvato

IV.4.1.1– Caminhos metabólicos e suas respectivas enzimas

Os caminhos metabólicos (vias) estão descritos abaixo:

- Via 1: $S \xrightarrow{e_0^a} I_1$
- Via 2: $S \xrightarrow{e_0^b} X$
- Via 3: $S \xrightarrow{e_0^c} I_2$
- Via 4: $I_1 \xrightarrow{e_1} P_1$
- Via 5: $I_2 \xrightarrow{e_2^a} P_2$

- Via 6: $I_2 \xrightarrow{e_2^b} I_3$
- Via 7: $I_3 \xrightarrow{e_3^a} P_3$
- Via 8: $I_3 \xrightarrow{e_3^b} P_4$

IV.4.1.2 – Taxas específicas

- Via 1: substrato S (glicerol) é desidratado, sendo convertido no intermediário I_1 (3-hidroxipropionaldeído), através da atuação da enzima-chave e_0^a (glicerol desidratase), com taxa específica r_0^a:

$$r_0^a = \mu_{0\,máx}^a \cdot \left(\frac{e_0^a}{e_{0\,máx}^a}\right) \cdot \left(\frac{S}{K_0^a + S}\right)$$

A enzima é e_0^a é induzida por S na taxa específica:

$$r_{e_0^a} = \propto_{e_0^a} \cdot \left(\frac{S}{K_{e_0^a} + S}\right)$$

onde:

α = taxa de síntese enzimática,;

K_i = constante de saturação que governa o consumo de substrato;

K_{ei} = constante de saturação que a síntese enzimática;

$e_{máx}$ = especificidade máxima da enzima.

$\mu_{máx}$ = taxa específica máxima.

- Via 2: o substrato S (glicerol) é consumido para a formação de biomassa (X), através da catálise da enzima-chave e_0^b, na taxa específica r_0^b:

$$r_0^b = \mu_{0\,máx}^b \cdot \left(\frac{e_0^b}{e_{0\,máx}^b}\right) \cdot \left(\frac{S}{K_0^b + S}\right)$$

A enzima é e_0^b é induzida por S na taxa específica:

$$r_{e_0^b} = \propto_{e_0^b} \cdot \left(\frac{S}{K_{e_0^b} + S}\right)$$

- Via 3: o substrato S (glicerol) é transformado no intermediário fosfoenolpiruvato (I_2), através da catálise da enzima-chave e_0^c, na taxa específica r_0^c:

$$r_0^c = \mu_{0\,máx}^c \cdot \left(\frac{e_0^c}{e_{0\,máx}^c}\right) \cdot \left(\frac{S}{K_0^c + S}\right)$$

A enzima é e_0^b é induzida por S na taxa específica:

$$r_{e_0^c} = \propto_{e_0^c} \cdot \left(\frac{S}{K_{e_0^c} + S}\right)$$

É importante salientar que a conversão de glicerol em fosfoenolpiruvato ocorre em três etapas e em cada etapa atua uma enzima específica, como pode ser visto na Figura II.11. Sendo assim, considerou-se que estas três reações ocorrem a uma mesma velocidade específica, ou seja, não há acúmulo dos intermediários, pois toda di-hidroxiacetona que é produzida na primeira etapa é simultaneamente convertida em fosfato de di-hidroxiacetona, que por sua vez é todo consumido na terceira para produzir fosfoenolpiruvato. Portanto foram consideradas como uma única via. Esta premissa foi adotada em outro ponto da via metabólica, na conversão do intermediário I_3 (piruvato), no produto P_4 (acetato).

- Via 4: o intermediário 3-hidroxipropionaldeído (I_1) é consumido para formação do produto 1,3-propanediol (P_1), através da catálise da enzima-chave 1,3-propanodiol oxidoredutase (e_1), na taxa específica r_1:

$$r_1 = \mu_{1\,máx} \cdot \left(\frac{e_1}{e_{1\,máx}}\right) \cdot \left(\frac{I_1}{K_1 + I_1}\right)$$

A enzima é e_1 é induzida por I_1 na taxa específica:

$$r_{e_1} = \propto_{e_1} \cdot \left(\frac{I_1}{K_{e_1} + I_1}\right)$$

- Via 5: o intermediário fosfoenolpiruvato (I_2) é transformado no produto ácido succínico (P_2), através da catálise da enzima-chave e_2^a, na taxa específica r_2^a:

$$r_2^a = \mu_{2\,máx}^a \cdot \left(\frac{e_2^a}{e_{2\,máx}^a}\right) \cdot \left(\frac{I_2}{K_2^a + I_2}\right)$$

A enzima é e_2^a é induzida por I_2 na taxa específica:

$$r_{e_2^a} = \propto_{e_2^a} \cdot \left(\frac{I_2}{K_{e_2^a} + I_2}\right)$$

- Via 6: o intermediário fosfoenolpiruvato (I_2) é transformado no intermediário piruvato (I_3), através da catálise da enzima-chave e_2^b, na taxa específica r_2^b:

$$r_2^b = \mu_{2\,máx}^b \cdot \left(\frac{e_2^b}{e_{2\,máx}^b}\right) \cdot \left(\frac{I_2}{K_2^b + I_2}\right)$$

A enzima é e_2^b é induzida por I_2 na taxa específica:

$$r_{e_2^b} = \propto_{e_2^b} \cdot \left(\frac{I_2}{K_{e_2^b} + I_2}\right)$$

- Via 7: o intermediário piruvato (I_3) é consumido para formação do produto lactato (P_3), através da catálise da enzima-chave e_3^a, na taxa específica r_3^a:

$$r_3^a = \mu_{3\,máx}^a \cdot \left(\frac{e_3^a}{e_{3\,máx}^a}\right) \cdot \left(\frac{I_3}{K_3^a + I_3}\right)$$

A enzima é e_3^a é induzida por I_3 na taxa específica:

$$r_{e_3^a} = \propto_{e_3^a} \cdot \left(\frac{I_3}{K_{e_3^a} + I_3}\right)$$

- Via 8: o intermediário piruvato (I_3) é consumido para formação do produto acetato (P_4), através da catálise da enzima-chave e_3^b, na taxa específica r_3^b:

$$r_3^b = \mu_{3\,máx}^b \cdot \left(\frac{e_3^b}{e_{3\,máx}^b}\right) \cdot \left(\frac{I_3}{K_3^b + I_3}\right)$$

A enzima é e_3^b é induzida por I_3 na taxa específica:

$$r_{e_3^b} = \propto_{e_3^b} \cdot \left(\frac{I_3}{K_{e_3^b} + I_3}\right)$$

IV.4.1.3– Variáveis cibernéticas:

IV.4.1.3.1– Variáveis cibernéticas elementares

Todas as enzimas da rede metabólica apresentada na Figura V.30 pertencem a caminhos que são complementares, ou seja, divergentes, onde por definição as enzimas-chave que catalisam as vias reacionais competem para maximizar o produto matemático dos metabólitos, sendo:

Síntese Enzimática: $$u_j = \frac{r_j / P_{j+1}}{\sum r_i / P_{i+1}}$$

Atividade Enzimática: $$v_j = \frac{r_j / P_{j+1}}{máx\left(r_i / P_{i+1}\right)}$$

Onde:

i = 1, 2, …, 9 (nº de caminhos elementares)

j = 1, 2, …, 9 (nº de enzimas-chave)

<u>Cálculo da síntese (u) e atividade (v) das enzimas complementares</u>

As enzimas e_0^a, e_0^b e e_0^c são complementares porque utilizam S como substrato (elementos divergentes).

$$u_{e_0^a} = \frac{\frac{r_{e_0^a}}{I_1}}{\frac{r_{e_0^a}}{I_1} + \frac{r_{e_0^b}}{X} + \frac{r_{e_0^c}}{I_2}} \qquad v_{e_0^a} = \frac{\frac{r_{e_0^a}}{I_1}}{máx\left(\frac{r_{e_0^a}}{I_1}, \frac{r_{e_0^b}}{X}, \frac{r_{e_0^c}}{I_2}\right)}$$

$$u_{e_0^b} = \frac{\frac{r_{e_0^b}}{X}}{\frac{r_{e_0^a}}{I_1} + \frac{r_{e_0^b}}{X} + \frac{r_{e_0^c}}{I_2}} \qquad v_{e_0^b} = \frac{\frac{r_{e_0^b}}{X}}{máx\left(\frac{r_{e_0^a}}{I_1}, \frac{r_{e_0^b}}{X}, \frac{r_{e_0^c}}{I_2}\right)}$$

$$u_{e_0^c} = \frac{\frac{r_{e_0^c}}{I_2}}{\frac{r_{e_0^a}}{I_1} + \frac{r_{e_0^b}}{X} + \frac{r_{e_0^c}}{I_2}} \qquad v_{e_0^c} = \frac{\frac{r_{e_0^c}}{I_2}}{máx\left(\frac{r_{e_0^a}}{I_1}, \frac{r_{e_0^b}}{X}, \frac{r_{e_0^c}}{I_2}\right)}$$

As enzimas e_2^a e e_2^b são complementares porque utilizam I_2 como substrato (elementos divergentes).

$$u_{e_2^a} = \frac{\frac{r_{e_2^a}}{P_2}}{\frac{r_{e_2^a}}{P_2} + \frac{r_{e_2^b}}{I_3}} \qquad v_{e_2^a} = \frac{\frac{r_{e_2^a}}{P_2}}{máx\left(\frac{r_{e_2^a}}{P_2}, \frac{r_{e_2^b}}{I_3}\right)}$$

$$u_{e_2^b} = \frac{\frac{r_{e_2^b}}{I_3}}{\frac{r_{e_2^a}}{P_2} + \frac{r_{e_2^b}}{I_3}} \qquad v_{e_2^b} = \frac{\frac{r_{e_2^b}}{I_3}}{máx\left(\frac{r_{e_2^a}}{P_2}, \frac{r_{e_2^b}}{I_3}\right)}$$

As enzimas e_3^a e e_3^b são complementares porque utilizam I_3 como substrato (elementos divergentes).

$$u_{e_3^a} = \frac{\frac{r_{e_3^a}}{P_3}}{\frac{r_{e_3^a}}{P_3} + \frac{r_{e_3^b}}{P_4}} \qquad v_{e_3^a} = \frac{\frac{r_{e_3^a}}{P_3}}{máx\left(\frac{r_{e_3^a}}{P_3}, \frac{r_{e_3^b}}{P_4}\right)}$$

$$u_{e_3^b} = \frac{\frac{r_{e_3^b}}{P_4}}{\frac{r_{e_3^a}}{P_3} + \frac{r_{e_3^b}}{P_4}} \qquad v_{e_3^b} = \frac{\frac{r_{e_3^b}}{P_4}}{máx\left(\frac{r_{e_3^a}}{P_3}, \frac{r_{e_3^b}}{P_4}\right)}$$

No caso da enzima e_1, que não apresenta competidores, suas variáveis cibernéticas (síntese e atividade) são iguais a um, ou seja, $u_1 = 1$ e $v_1 = 1$.

IV.4.1.3.2– Variáveis cibernéticas locais

As variáveis cibernéticas locais serão representadas por u_j^L e v_j^L, onde:

$$u_j^L = \prod_{i=1}^{9} u_j^i$$

$$v_j^L = \prod_{i=1}^{9} v_j^i$$

Onde:

i = 1, 2, …, 9 (nº de caminhos elementares)

j = 1, 2, …, 9 (nº de enzimas-chave)

A enzima e_0^a pode ser descrita em relação a quatro caminhos elementares, ou seja, recebe recursos de 4 vias:

$$S \xrightarrow{e_0^a} I_1$$

$$S \xrightarrow{e_0^b} X$$

$$S \xrightarrow{e_0^c} I_2$$

$$I_1 \xrightarrow{e_1} P_1$$

$$u_{e_0^a}^L = u_{e_0^a} \cdot u_{e_0^b} \cdot u_{e_0^c} \cdot u_{e_1} \qquad v_{e_0^a}^L = v_{e_0^a} \cdot v_{e_0^b} \cdot v_{e_0^c} \cdot v_{e_1}$$

A enzima e_0^b participa de 3 vias:

$$S \xrightarrow{e_0^a} I_1$$

$$S \xrightarrow{e_0^b} X$$

$$S \xrightarrow{e_0^c} I_2$$

$$u_{e_0^b}^L = u_{e_0^a} \cdot u_{e_0^b} \cdot u_{e_0^c} \qquad v_{e_0^b}^L = v_{e_0^a} \cdot v_{e_0^b} \cdot v_{e_0^c}$$

A enzima e_0^c participa de 5 vias:

$$S \xrightarrow{e_0^a} I_1$$

$$S \xrightarrow{e_0^b} X$$

$$S \xrightarrow{e_0^c} I_2$$

$$I_2 \xrightarrow{e_2^a} P_2$$

$$I_2 \xrightarrow{e_2^b} I_3$$

$$u_{e_0^c}^L = u_{e_0^a} \cdot u_{e_0^b} \cdot u_{e_0^c} \cdot u_{e_2^a} \cdot u_{e_2^b} \qquad v_{e_0^c}^L = v_{e_0^a} \cdot v_{e_0^b} \cdot v_{e_0^c} \cdot v_{e_2^a} \cdot v_{e_2^b}$$

A enzima e_1 participa de 2 vias:

$$S \xrightarrow{e_0^a} I_1$$

$$I_1 \xrightarrow{e_1} P_1$$

$$u_{e_1}^L = u_{e_0^a} \cdot u_{e_1} \qquad v_{e_1}^L = v_{e_0^a} \cdot v_{e_1}$$

A enzima e_2^a participa de 3 vias:

$$S \xrightarrow{e_0^c} I_2$$

$$I_2 \xrightarrow{e_2^a} P_2$$

$$I_2 \xrightarrow{e_2^b} I_3$$

$$u_{e_2^a}^L = u_{e_0^c} \cdot u_{e_2^a} \cdot u_{e_2^b} \qquad v_{e_2^a}^L = v_{e_0^c} \cdot v_{e_2^a} \cdot v_{e_2^b}$$

A enzima e_2^b participa de 5 vias:

$$S \xrightarrow{e_0^c} I_2$$

$$I_2 \xrightarrow{e_2^a} P_2$$

$$I_2 \xrightarrow{e_2^b} I_3$$

$$I_3 \xrightarrow{e_3^a} P_3$$

$$I_3 \xrightarrow{e_3^b} P_4$$

$$u_{e_2^b}^L = u_{e_0^c} \cdot u_{e_2^a} \cdot u_{e_2^b} \cdot u_{e_3^a} \cdot u_{e_3^b} \qquad v_{e_2^b}^L = v_{e_0^c} \cdot v_{e_2^a} \cdot v_{e_2^b} \cdot v_{e_3^a} \cdot v_{e_3^b}$$

A enzima e_3^a participa de 3 vias:

$$I_2 \xrightarrow{e_2^b} I_3$$

$$I_3 \xrightarrow{e_3^a} P_3$$

$$I_3 \xrightarrow{e_3^b} P_4$$

$$u_{e_3^a}^L = u_{e_2^b} \cdot u_{e_3^a} \cdot u_{e_3^b} \qquad v_{e_3^a}^L = v_{e_2^b} \cdot v_{e_3^a} \cdot v_{e_3^b}$$

A enzima e_3^b participa de 3 vias:

$$I_2 \xrightarrow{e_2^b} I_3$$

$$I_3 \xrightarrow{e_3^a} P_3$$

$$I_3 \xrightarrow{e_3^b} P_4$$

$$u_{e_3^b}^L = u_{e_2^b} \cdot u_{e_3^a} \cdot u_{e_3^b} \qquad v_{e_3^b}^L = v_{e_2^b} \cdot v_{e_3^a} \cdot v_{e_3^b}$$

IV.4.1.3.3– Variáveis cibernéticas globais

As variáveis de controle globais transformam o estado nutricional de relevância em uma ação de controle que age no sentido de ativar ou restringir um dado processo enzimático. Serão representadas por u_j^G e v_j^G, onde:

$$u_j^G = \prod_{i=1}^{9} u_j^i$$

$$v_j^G = \prod_{i=1}^{9} v_j^i$$

sendo:

i = 1, 2, …, 9 (nº de caminhos elementares)

j = 1, 2, …, 9 (nº de enzimas-chave)

- Enzima responsável pela produção de 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) (e_0^a)

$$u_{e_0^a}^G = \left(\frac{K_{Glicerol}}{K_{Glicerol} + [Glicerol]}\right)$$

A produção de 3-hidroxipropionaldeído é induzida pela concentração de glicerol no meio de cultivo.

- Enzima responsável pela produção de biomassa (e_0^b)

$$u_{e_0^b}^G = \left(\frac{[Glicerol]}{K_{Glicerol} + [Glicerol]}\right)$$

A produção de biomassa será proporcional a concentração do glicerol (substrato) já que o crescimento celular não sofre inibição pelo substrato.

- Enzima responsável pela produção de fosfoenolpiruvato (e_0^c)

$$u_{e_0^c}^G = \left(\frac{[Glicerol]}{K_{Glicerol} + [Glicerol]}\right)$$

A produção de fosfoenolpiruvato será proporcional a concentração do glicerol. (substrato) já que essa via não sofre inibição pelo substrato.

- Enzima responsável pela produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) (e_1)

$$u_{e_1}^G = \left(\frac{K_{3-HPA}}{K_{3-HPA} + [3-HPA]}\right)\left(\frac{[NADH.H^+]}{K_{NADH.H^+} + [NADH.H^+]}\right)$$

A produção de 1,3-propanodiol é induzida pela baixa concentração de 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) no interior da célula, pois quando este intermediário se acumula, a célula o excreta visto que o mesmo é tóxico (Nakamura & Whited, 2003). Além disso, a enzima responsável pela conversão de 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) em 1,3-propanodiol (1,3-PDO) é dependente de $NADH.H^+$; sendo assim a produção de 1,3-PDO será proporcional a concentração de $NADH.H^+$.

- Enzima responsável pela produção de ácido succínico (e_2^a)

$$u_{e_2^a}^G = \left(\frac{[PEP]}{K_{PEP} + [PEP]}\right)\left(\frac{[NADH.H^+]}{K_{NADH.H^+} + [NADH.H^+]}\right)\left(\frac{K_{O_2}}{K_{O_2} + [O_2]}\right)$$

A produção de ácido succínico é dependente da concentração do intermediário fosfoenolpiruvato (PEP), da concentração de $NADH.H^+$, já que a enzima responsável pela produção de succinato é $NADH.H^+$ dependente e também da concentração de oxigênio, pois a produção de ácido succínico só ocorre em condições de aeração inferior a 1,5 vvm.

- Enzima responsável pela produção de piruvato (e_2^b)

$$u_{e_2^b}^G = \left(\frac{[PEP]}{K_{PEP} + [PEP]}\right)$$

A produção de piruvato é dependente da concentração do intermediário fosfoenolpiruvato (PEP).

- Enzima responsável pela produção de lactato (e_3^a)

$$u_{e_3^a}^G = \left(\frac{[Piruvato]}{K_{Piruvato} + [Piruvato]}\right)\left(\frac{[NADH.H^+]}{K_{NADH.H^+} + [NADH.H^+]}\right)\left(\frac{K_{O_2}}{K_{O_2} + [O_2]}\right)\left(\frac{K_{H^+}}{K_{H^+} + [H^+]}\right)$$

A produção de lactato é dependente da concentração do intermediário piruvato; da concentração de $NADH.H^+$ uma vez que a enzima responsável pela produção de lactato é $NADH.H^+$ dependente; da concentração de oxigênio, pois a produção de lactato só ocorre em condições de aeração inferior a 1,5 vvm; e do pH, já que a produção de lactato só ocorreu em situações onde houve redução do pH a valores inferiores a 6,0.

- Enzima responsável pela produção de acetato (e_3^b)

$$u_{e_3^b}^G = \left(\frac{[Piruvato]}{K_{Piruvato} + [Piruvato]}\right)\left(\frac{K_{NADH.H^+}}{K_{NADH.H^+} + [NADH.H^+]}\right)$$

A produção de acetato é dependente da concentração do intermediário piruvato. Além disso, a produção de acetato será induzida pela baixa concentração de $NADH.H^+$ visto que para produzir este produto não há gasto de $NADH.H^+$.

O controle global de atividade das enzimas (v_j^G), para o presente estudo, foi considerado igual a 1, já que não há processo de inibição conhecido para a rede metabólica apresentada.

IV.4.1.3.4– Variáveis cibernéticas completas

As variáveis cibernéticas completas serão representadas por u_j e v_j, onde:

$$u_j = u_j^L u_j^G$$

$$v_j = v_j^L v_j^G$$

sendo:

j = 1, 2, …, 9 (nº de enzimas-chave)

Os cálculos da síntese enzimática para variáveis cibernéticas completas estão descritos a seguir. Já os cálculos da atividade enzimática para variáveis cibernéticas completas não serão apresentados, pois as equações serão iguais as utilizadas para o cálculo da atividade para as variáveis locais, visto que os controles globais da atividade enzimática são iguais a um para todas as enzimas-chave.

$$u_{e_0^a} = u_{e_0^a} \cdot u_{e_0^b} \cdot u_{e_0^c} \cdot u_{e_1} \cdot \left(\frac{K_{glicerol}}{K_{glicerol} + \lceil Glicerol \rceil}\right)$$

$$u_{e_0^b} = u_{e_0^a} \cdot u_{e_0^b} \cdot u_{e_0^c} \cdot \left(\frac{\lceil Glicerol \rceil}{K_{glicerol} + \lceil Glicerol \rceil}\right)$$

$$u_{e_0^c} = u_{e_0^a} \cdot u_{e_0^b} \cdot u_{e_0^c} \cdot u_{e_2^a} \cdot u_{e_2^b} \cdot \left(\frac{\lceil Glicerol \rceil}{K_{glicerol} + \lceil Glicerol \rceil}\right)$$

$$u_{e_1} = u_{e_1} \cdot u_{e_0^a} \cdot \left(\frac{K_{3-\mathrm{HPA}}}{K_{3-HPA} + \lceil 3-\mathrm{HPA} \rceil}\right)\left(\frac{[NADH.H^+]}{K_{NADH.H^+} + [NADH.H^+]}\right)$$

$$u_{e_2^a} = u_{e_0^c} \cdot u_{e_2^a} \cdot u_{e_2^b} \cdot \left(\frac{[PEP]}{K_{PEP} + \lceil PEP \rceil}\right)\left(\frac{[NADH.H^+]}{K_{NADH.H^+} + [NADH.H^+]}\right)\left(\frac{K_{O_2}}{K_{O_2} + \lceil O_2 \rceil}\right)$$

$$u_{e_2^b} = u_{e_0^c} \cdot u_{e_2^a} \cdot u_{e_2^b} \cdot u_{e_3^a} \cdot u_{e_3^b} \cdot \left(\frac{[PEP]}{K_{PEP} + \lceil PEP \rceil}\right)\left(\frac{K_{NADH.H^+}}{K_{NADH.H^+} + [NADH.H^+]}\right)$$

$$u_{e_3^a} = u_{e_2^b} \cdot u_{e_3^a} \cdot u_{e_3^b} \cdot \left(\frac{[Piruvato]}{K_{piruvato} + \lceil Piruvato \rceil}\right)\left(\frac{[NADH.H^+]}{K_{NADH.H^+} + [NADH.H^+]}\right)\left(\frac{K_{O_2}}{K_{O_2} + \lceil O_2 \rceil}\right)$$

$$u_{e_3^b} = u_{e_2^b} \cdot u_{e_3^a} \cdot u_{e_3^b} \cdot \left(\frac{[Piruvato]}{K_{pi} + \lceil Piruvato \rceil}\right)\left(\frac{K_{NADH.H^+}}{K_{NADH.H^+} + [NADH.H^+]}\right)$$

IV.4.1.3.5– Balanço para as variáveis de estado e enzimas

<u>Balanço para o consumo de substrato</u>

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{I_1}/_S} \cdot r_0^a \cdot v_0^a \cdot I_1 - \frac{1}{Y_{X}/_S} \cdot r_0^b \cdot v_0^b \cdot X - \frac{1}{Y_{I_2}/_S} \cdot r_0^c \cdot v_0^c \cdot I_2$$

Balanço para a produção de biomassa

$$\frac{dX}{dt} = r_0^b \cdot v_0^b \cdot X$$

Balanço para as enzimas

$$\frac{de_0^a}{dt} = r_{e_0^a} \cdot u_{e_0^a} - (r_0^a \cdot v_0^a + \beta) \cdot e_0^a + r_{e_0^a}^*$$

$$\frac{de_0^b}{dt} = r_{e_0^b} \cdot u_{e_0^b} - \left(r_0^b \cdot v_0^b + \beta\right) \cdot e_0^b + r_{e_0^b}^*$$

$$\frac{de_0^c}{dt} = r_{e_0^c} \cdot u_{e_0^c} - (r_0^c \cdot v_0^c + \beta) \cdot e_0^c + r_{e_0^c}^*$$

$$\frac{de_1}{dt} = r_{e_1} \cdot u_{e_1} - (r_1 \cdot v_1 + \beta) \cdot e_1 + r_{e_1}^*$$

$$\frac{de_2^a}{dt} = r_{e_2^a} \cdot u_{e_2^a} - (r_2^a \cdot v_2^a + \beta) \cdot e_2^a + r_{e_2^a}^*$$

$$\frac{de_2^b}{dt} = r_{e_2^b} \cdot u_{e_2^b} - \left(r_2^b \cdot v_2^b + \beta\right) \cdot e_2^b + r_{e_2^b}^*$$

$$\frac{de_3^a}{dt} = r_{e_3^a} \cdot u_{e_3^a} - (r_3^a \cdot v_3^a + \beta) \cdot e_3^a + r_{e_3^a}^*$$

$$\frac{de_3^b}{dt} = r_{e_3^b} \cdot u_{e_3^b} - \left(r_3^b \cdot v_3^b + \beta\right) \cdot e_3^b + r_{e_3^b}^*$$

Onde:

β representa o decaimento de 1ª ordem da maquinária enzimática e $r_{e_i}^*$é a taxa específica de síntese da enzima constitutiva (ordem zero).

Para simplicar, consideraremos que todas as enzimas compartilharão o mesmo $r_{e_i}^*$no presente trabalho.

Balanço para os produtos e os intermediários

$$\frac{dP_1}{dt} = r_1 \cdot v_1$$

$$\frac{dP_2}{dt} = r_2^a \cdot v_2^a$$

$$\frac{dP_3}{dt} = r_3^a \cdot v_3^a$$

$$\frac{dP_4}{dt} = r_3^b \cdot v_3^b$$

$$\frac{dI_1}{dt} = r_0^a \cdot v_0^a - r_1 \cdot v_1$$

$$\frac{dI_2}{dt} = r_0^c \cdot v_0^c - r_2^a \cdot v_2^a - r_2^b \cdot v_2^b$$

$$\frac{dI_3}{dt} = r_2^b \cdot v_2^b - r_3^a \cdot v_3^a - r_3^b \cdot v_3^b$$

IV.4.2– Programação

A formulação do modelo foi implementada em MATLAB 7.12 e o conjunto de equações diferenciais ordinárias foi resolvida através de um método adequado de ordem variável para resolver problemas *stiff*. A estimação dos parâmetros do modelo foi realizada pelo método de busca direta simplex de Nelder-Mead para minimização da função objetivo formulada como a diferença entre os valores experimentais e calculados ao longo do tempo.

IV.4.3– Resultados

Os parâmetros utilizados no presente modelo foram obtidos experimentalmente, obtidos da literatura ou estimados a partir de valores encontrados na literatura. Os valores estimados correspondem a parâmetros referentes a uma via elementar da rede metabólica que na verdade corresponde a mais de uma via elementar do metabolismo celular real. Essa simplificação foi realizada com intuito de simplificar o modelo matemático. Um exemplo, é a conversão de glicerol em fosfoenolpiruvato que na verdade é realizado em três etapas, porém o presente modelo propõe uma única etapa supondo que não há inibição nem acúmulo dos intermediários, ou seja, as três vias ocorrem com o mesmo fluxo. Os valores utilizados para cada parâmetro do modelo matemático encontram-se descritos na Tabela IV.10. Segundo Mandli & Modak (2014), e_i foi considerado igual a 1% do valor de $e_{imáx}$.

Tabela IV.12 – Parâmetros utilizados no modelo matemático implementado em MATLAB 7.12.

Parâmetros	Valor	Unidade	Fonte
μ_0^a	0,05	h^{-1}	Obtido experimentalmente
K_0^a	0,28	mM	Menzel *et al.* (1997)
Ke_0^a	2,41	mM	Sun *et al.* (2008)
μ_0^b	0,013	h^{-1}	Obtido experimentalmente
K_0^b	0,28	mM	Menzel *et al.* (1997)
Ke_0^b	0,28	mM	Menzel *et al.* (1997)
μ_0^c	0,05	h^{-1}	Obtido experimentalmente
K_0^c	0,28	mM	Menzel *et al.* (1997)
Ke_0^c	1,80	mM	Estimado
μ_1	0,09	h^{-1}	Obtido experimentalmente
K_1	0,49	mM	Jo et al. (2008)
Ke_1	1,35	mM	Sun *et al.* (2008)
μ_2^a	0,025	h^{-1}	Obtido experimentalmente
K_2^a	0,10	mM	Peng & Shimizu (2006)
Ke_2^a	0,59	mM	Ting & Osmond (1973)
μ_2^b	0,025	h^{-1}	Obtido experimentalmente
K_2^b	0,10	mM	Peng & Shimizu (2006)
Ke_2^b	1,58	mM	Estimado
μ_3^a	0,029	mM	Obtido experimentalmente
K_3^a	0,25	mM	Estimado
Ke_3^a	1,0	mM	Estimado
μ_3^b	0,055	h^{-1}	Obtido experimentalmente
K_3^b	0,50	mM	Estimado
Ke_3^b	1,0	mM	Estimado
[PEP]	0,1	mM	Peng & Shimizu (2006)
[Piruvato]	1,58	mM	Peng & Shimizu (2006)
$[NADH.H^+]$	0,13	mM	Peng & Shimizu (2006)
$[O_2]$	0,03	mM	Obtido experimentalmente
$Y_{X/S}$	0,09	$g.g^{-1}$	Obtido experimentalmente
$Y_{I1/S}$	0,27	$g.g^{-1}$	Obtido experimentalmente
$Y_{I2/S}$	0,25	$g.g^{-1}$	Obtido experimentalmente

Foram realizadas duas simulações em MATLAB 7.12, a primeira considerando a condição de 1,0 vvm e a segunda considerando a condição de 2,0 vvm.

Na primeira condição simulada, 1,0 vvm, é possível verificar os valores preditos para concentração de glicerol (Figura 31(A)), biomassa (Figura 31(B)), 1,3-PDO (Figura 31(C)), ácido succínico (Figura 31(D)), lactato (Figura 31(E)) e acetato (Figura 31(F)). Os valores preditos são próximos aos valores encontrados experimentalmente para as condições simuladas. Isso pode ser melhor visualizado pela Tabela IV. 11 que mostra a variação da concentração desses compostos ao longo do tempo para os valores experimentais e para os valores preditos pelo modelo e apresenta também a diferença entre ambos.

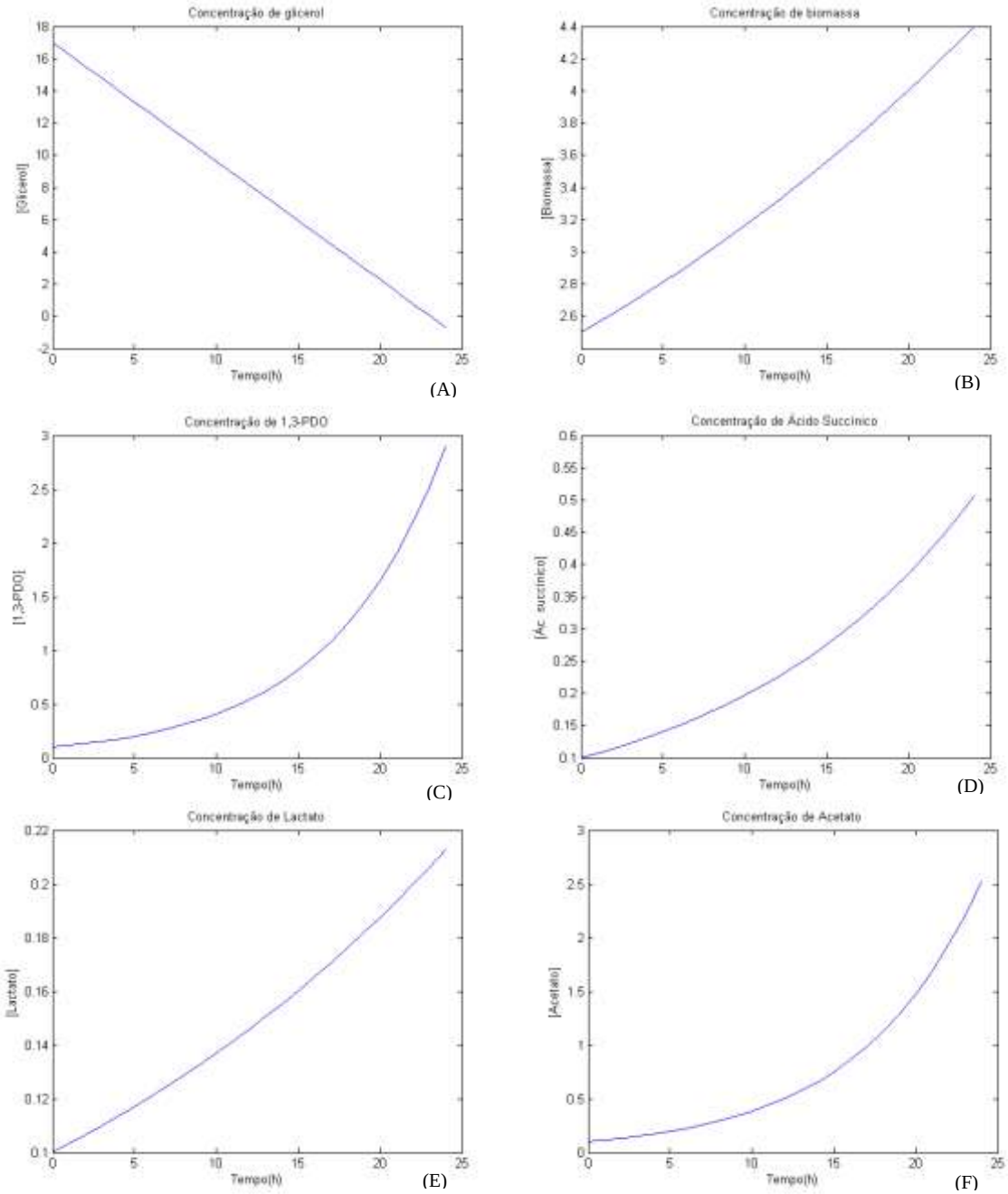

Figura IV.31 – Valores preditos pelo modelo para a concentração de glicerol (A), biomassa (B), 1,3-PDO (C), ácido succínico (D), lactato (E) e acetato (F) para a condição de 1,0 vvm.

Tabela IV.13 – Valores preditos pelo modelo *versus* valores experimentais para a condição de 1,0 vvm.

	Glicerol			Biomassa			1,3-PDO		
Tempo	Predito	Experimental	Diferença	Predito	Experimental	Diferença	Predito	Experimental	Diferença
0	17,0	16,3	0,7	2,50	2,50	0,0	0,00	0,0	0,00
4	15,7	14,9	0,8	2,70	3,00	0,3	0,18	0,07	0,11
8	14,3	13,3	1,0	2,80	3,12	0,3	0,30	0,44	0,14
12	13,0	11,8	1,2	3,00	3,24	0,2	0,54	0,74	0,20
24	9,0	7,0	2,0	3,11	3,33	0,2	2,89	2,81	0,08

	Ácido Succínico			Lactato			Acetato		
Tempo	Predito	Experimental	Diferença	Predito	Experimental	Diferença	Predito	Experimental	Diferença
0	0,00	0,04	0,04	0,00	0,0	0,00	0,00	0,05	0,05
4	0,13	0,21	0,08	0,11	0,0	0,11	0,17	0,49	0,32
8	0,15	0,47	0,32	0,13	0,0	0,13	0,29	0,93	0,64
12	0,20	0,60	0,40	0,15	0,0	0,15	0,50	1,18	0,68
24	0,51	0,84	0,33	0,21	0,26	0,05	2,52	2,61	0,09

Os valores encontram-se em $g.L^{-1}$.

Na segunda condição simulada, 1,5 vvm, é possível verificar os valores preditos para concentração de glicerol (Figura 32(A)), biomassa (Figura 32(B)), 1,3-PDO (Figura 32(C)), ácido succínico (Figura 32(D)), lactato (Figura 32(E)) e acetato (Figura 32(F)). Os valores preditos também são próximos aos valores encontrados experimentalmente para as condições simuladas. Isso pode ser melhor visualizado pela Tabela IV.12 que mostra a variação da concentração desses compostos ao longo do tempo para os valores experimentais e para os valores preditos pelo modelo e apresenta também a diferença entre ambos.

A simulação do bioprocesso em diferentes condições operacionais mostra a robustez do modelo matemático que descreve o consumo de substrato, produção de biomassa e produção de produtos muito similar ao que ocorre na prática. Alguns produtos obtidos apresentam um desvio percentual maior do valor predito em relação ao valor experimental devido possivelmente a estimativa de alguns parâmetros enzimáticos para sua síntese. Isso pode ser facilmente percebido quando comparamos os valores preditos para a concentração de ácido succínico com os valores experimentais e fazemos o mesmo para produção de 1,3-PDO (Tabela IV.11). O modelo matemático descreve bem a produção de 1,3-PDO, apresentando um desvio percentual baixo em relação aos valores experimentais, pois os parâmetros utilizados nas duas vias elementares que convertem glicerol em 1,3-PDO foram obtidos da literatura e foram descritos para as enzimas glicerol desidratase e 1,3-propanodiol oxidoredutase de *Citrobacter freundii*. Já no caso da produção de ácido succínico a partir de fosfoenolpiruvato, os valores utilizados foram para *Escherichia coli*, já que a literatura não reporta esses valores para *C. freundii*.

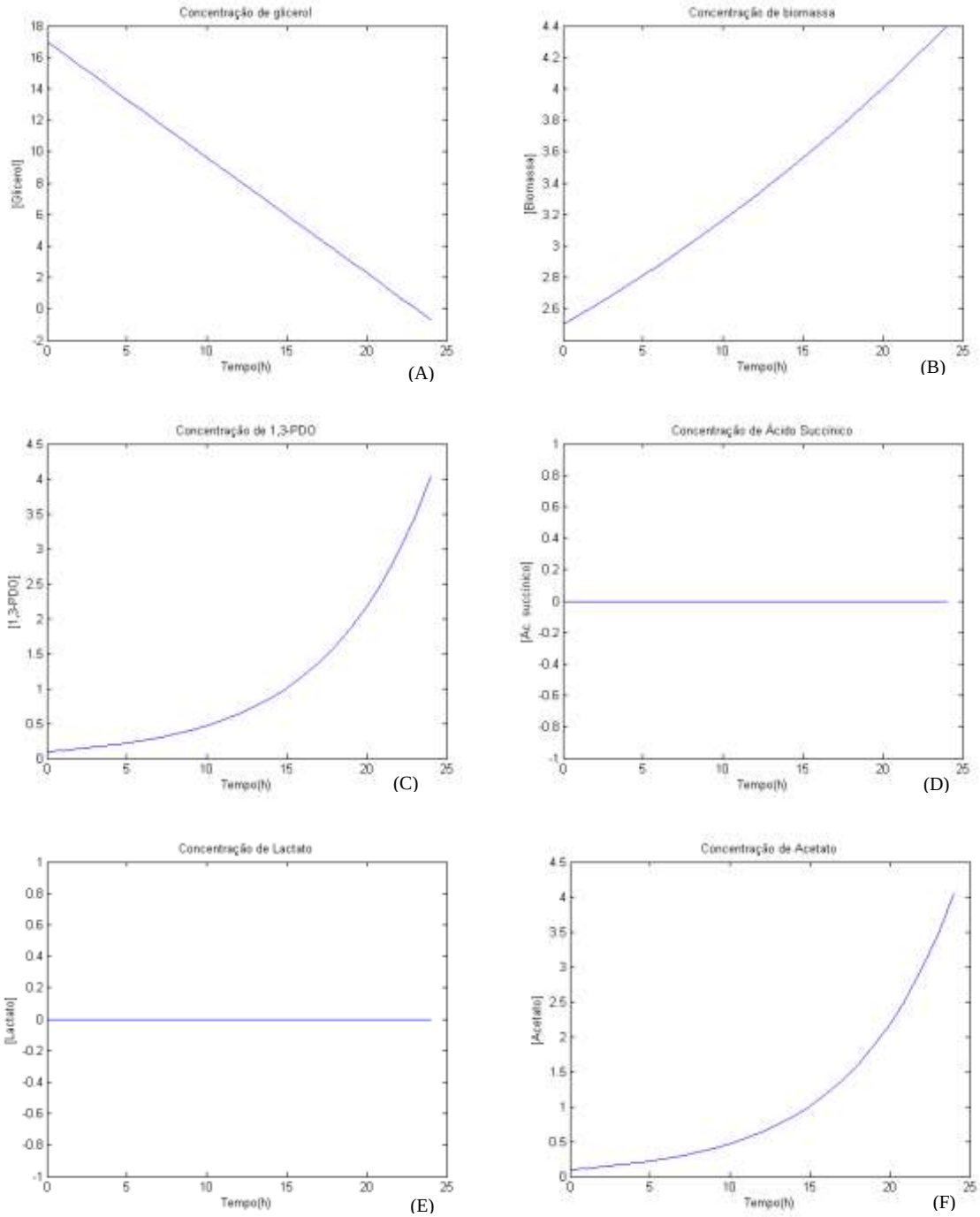

Figura IV.32 – Valores preditos pelo modelo para a concentração de glicerol (A), biomassa (B), 1,3-PDO (C), ácido succínico (D), lactato (E) e acetato (F) para a condição de 1,5 vvm.

Tabela IV.14 – Valores preditos pelo modelo *versus* valores experimentais para a condição de 1,5 vvm.

	Glicerol			Biomassa		
Tempo	Predito	Experimental	Diferença	Predito	Experimental	Diferença
0	17,00	16,82	0,18	2,50	2,50	0,00
4	14,04	14,33	-0,29	2,74	2,94	0,20
8	11,09	9,76	1,33	3,02	3,55	0,53
12	8,14	6,67	1,47	3,32	4,05	0,73
24	0,0	0,00	0	4,41	4,49	0,08

	1,3-PDO			Acetato		
Tempo	Predito	Experimental	Diferença	Predito	Experimental	Diferença
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,16	0,15	0,01	0,16	0,08	0,08
8	0,30	0,35	0,05	0,29	0,22	0,07
12	0,67	1,74	1,07	0,64	1,44	0,80
24	4,37	4,55	0,18	4,04	4,18	0,14

V- CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível comprovar a produção de 1,3-PDO em aerações superiores àquelas reportadas na literatura. A literatura até, então, só havia reportado a produção de 1,3-PDO por *C. freundii* na condição de 0,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), obtendo 1,16 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO após 24 horas de fermentação, ou seja, uma produtividade de 0,05 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Neste trabalho, comprovou-se a produção de 1,3-PDO em aerações mais elevadas (até 2,0 vvm). Na condição otimizada (1,5 vvm), a cepa C. freundii ATCC 8090 atingiu a produção de 4,55 $g.L^{-1}$, quase quatro vezes maior do que a reportada na literatura. Contudo a produtividade obtida em biorreator para essas condições (0,19 $g.L^{-1}.h^{-1}$) foi ainda inferior as obtidas em escala de shaker (0,34 $g.L^{-1}.h^{-1}$).

A literatura reportou recentemente produtividade de aproximadamente 0,79 $g.L^{-1}.h^{-1}$ para uma cepa de *C. freundii* (FMCC-B 294 ou VK-19) operando em regime de batelada alimentada (*Metsoviti* et al., 2013). Esses resultados demonstram que as produtividades alcançadas pela espécie *Citrobacter freundii* são inferiores às das demais espécies capazes de produzir 1,3-PDO a partir de glicerol. Isso se deve principalmente a sua lenta metabolização de glicerol. Sendo assim, apesar da conversão de glicerol em 1,3-PDO ser elevada, essa conversão é lenta necessitando de um longo período de tempo para acontecer, o que acaba por reduzir muito a produtividade.

Mesmo assim, o 1,3-PDO não deixa de ser um produto de extremo interesse para o setor químico e petroquímico na atualidade. O estudo realizado com um o intuito de mapear o mercado interno deste produto indicou que a quantidade comercializada no Brasil ainda é pequena, até mesmo devido a ausência de unidades produtoras de PTT (poli(tereftato de trimetileno)), polímero que demanda a grande parte do 1,3-PDO produzido no mundo. Contudo, se o Brasil tem interesse em produzir internamente o PTT é de extrema importância que domine uma tecnologia viável para produção de 1,3-PDO que corresponde a cerca de 37% do peso do PTT quando este é polimerizado com o ácido tereftálico através das reações de policondensação. Além disso, o custo do 1,3-PDO responde por mais de 50% do valor que o polímero será comercializado.

Com os dados obtidos neste trabalho foi possível construir um modelo matemático robusto que descreve a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol por *C. freundii* em condições de baixa aeração. Para construção de tal modelo utilizou-se a perpectiva cibernética, sendo o modelo emplementado em MATLAB 7.12. Os valores preditos pelo modelo estão de acordo com os valores obtidos em diferentes condições experimentais

indicando a robustez do modelo construído. Esse modelo pode ser utilizado para simular a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol em outras condições ambientais ou até mesmo como base para modelar esta via metabólica para outras cepas estudadas.

VI- PUBLICAÇÕES

VI.1- Artigos publicados

1. **Ferreira, T.F.**; Ribeiro, R. R.; Matos, P.M.; Coelho, M.A.Z. *Optimización de la Concentración de L-Cisteína para la producción de 1,3-Propanodiol por una vía Biotecnológica. Informacion Tecnologica*, v.24, p.43-50, 2013.

Home page: [doi:10.4067/s0718-07642013000100006]

2. **Ferreira, T. F.**; Ribeiro, R. R.; Ribeiro, C.M.S.; Freire, D.M.G.; Coelho, M. A. Z. *Evaluation of 1,3-propanediol production from crude glycerol by* Citrobacter freundii *ATCC 8090. Chemical Engineering Transactions*, v.27, p.157-162, 2012.

Home page: [doi:10.3303/cet1227027]

3. Amaral, P.F. F.; **Ferreira, T.F.**; Fontes, G.C.; Coelho, M.A.Z. *Glycerol valorization: New biotechnological routes. Food and Bioproducts Processing*, v.87, p.179-186, 2009.

Home page: [doi:10.1016/j.fbp.2009.03.008]

VI.2- Artigo aceito para publicação

1. **Ferreira, T. F.**; Saab, V.; Matos, P. M.; Ribeiro, C.M.S.; Coelho, M. A. Z. *Evaluation of 1,3-propanediol production from glycerine by Clostridium butyricum NCIMB 8082. Chemical Engineering Transactions*, v.38, 2014.

VI.3- Trabalhos completos publicados

1. Guimarães, R. B. B.; Ferreira, T. F.; Coelho, M. A. Z. Avaliação do mercado de 1,3-propanodiol produzido por via biotecnológica. **7° Congresso Brasileiro de P&D de Petróleo e Gás** (PDPetro), Aracaju-SE, Brasil, 2013.

2. Ferreira, T. F.; Matos, P. M.; Ribeiro, C.M.S.; Coelho, M. A. Z. Reaproveitamento da

glicerina bruta para produção de 1,3-propanodiol. **7° Congresso Brasileiro de P&D de Petróleo e Gás** (PDPetro), Aracaju-SE, Brasil, 2013.

3. **Ferreira, T. F.**; Freire, D. M. G.; Coelho, M. A. Z. Rede metabólica de produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerina. **11° Congresso Interamericano de Computación Aplicada a la Industria de Procesos**, Lima, Peru, 2013.

4. **Ferreira, T.F.**; Matos, P.M.; Ribeiro, R. R.; Ribeiro, C.M.S.; Coelho, M.A.Z. Estudo da Inibição da Produção de 1,3-propanodiol por *Citrobacter freundii* ATCC 8090. **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química** (COBEQ), Búzios-RJ, Brasil, 2012.

5. Matos, P.M.; Ribeiro, R.R.; **Ferreira, T.F.;** COELHO, M.A.Z. Extração Bifásica de 1,3-propanodiol produzido por via biotecnológica. **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química** (COBEQ), Búzios-RJ, Brasil, 2012.

6. **Ferreira, T.F.;** Ribeiro, R.R.; Matos, P.M.; Ribeiro, C.M.S.; Coelho, M.A.Z. Otimização da concentração de L-cisteína para produção de 1,3-propanodiol por via biotecnológica. **Congresso Latinoamericano Ingeniería y Ciencias Aplicadas (**CLICAP), San Rafael – Mendoza, Argentina, 2012.

7. **Ferreira, T. F.**; Coelho, M.A.Z.; Ribeiro, C.M.S. Avaliação da Capacidade Produtora de 1,3-PDO a partir de Glicerina Bruta por Duas Cepas: *C. freundii* e *L. brevis*. **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos** (SINAFERM), Caixas do Sul-RS, Brasil, 2011.

VI.4- Resumos publicados

1. **Ferreira, T.F.**; Freire, D.M.G.; Coelho, M.A.Z. Production of 1,3 propanodiol from glicerine by fermentation process. **IX Curso Latinoamericano de Biotecnología**, Valparaíso, Chile, 2012.

2. Matos, P.M.; Ribeiro, R.R.; Coelho, M.A.Z; **Ferreira, T.F.** Influence of Crude Glycerin Impurities in *Citrobacter freundii* Metabolism. **I International Symposium on Microbiology and Biotechnology** (SIMB), Viçosa-MG, Brasil, 2012.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, L., Blomberg, A. e Nilsson, A. (1985). Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology* , 162: 300–306.

Aggelis, G. (2009). Microbial conversions of raw glycerol. Nova York: Nova Biomedical Books.

AliceWeb. Disponível em <http://aliceweb2.mdic.gov.br/>, acesso em 26 de julho de 2012.

Almeida, M. (2009). Caracterização fenotípica e molecular de Escherichia coli uropatogênica em receptores de transplante renal. Rio de Janeiro: Tese de Doutorado.

Amaral, P.F., Ferreira, T.F., Fontes, G.C. e Coelho, M.A.Z. (2009). Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing* , 87: 179-186.

ANP (Agência de Petróleo, Gás Natutal e Biocombustíveis). Disponível em http://www.anp.gov.br/?pg=64555&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1390398915816, acesso em 22 de janeiro de 2014.

Atsumi, S., Cann, A., Connor, M., Shen, C., Smith, K. e Brynildsen, M. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metabolic Engineering*, 10: 305-311.

Badger, J. L., Stins, M. F. e Kim, K. S. (1999). *Citrobacter freundii* Invades and Replicates in Human Brain Microvascular Endothelial cells. Infection and Immunity,67(8): 4208-4215.

Barbirato, F., Grivet, J. P., Soucaille, P. e BORIES, A. (1996). 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by Enterobacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1448-1451..

Barbirato, F., Himmi, E. H., Conte, T. e 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: 281-289.

Bermermann, H. (1967). Quantitative aspects of goal-seeking self-organizing system. Progr. Theoret. Biol. , 1: 59-77.

Berrios-Rivera, S. J., Bennett, G. N. e Sana, K.-Y. (2002). Metabolic Engineering of *Escherichia coli*: Increase of NADH Availability by Overexpressing an NAD^+-Dependent Formate Dehydrogenase. *Metabolic Engineering*, 4(3): 217–229.

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

Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A-P. e Deckwe, W.-D. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 52: 289-297.

Biebl, H., Zeng, A.P., Menzel, K. e Deckwer, W.D. (1998). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 24-29.

Boenigk, R., Bowien, S. e Gottschalk, G. (1993). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 38: 453-457.

Bories, A., Himmi, E., Jauregui, J. J., Pelayo-Ortiz, C. e Gonzales, V. A. (2004). Glycerol fermentation with Propionibacteria and optimization of the production of propionic acid. *Sci Aliments* , 24: 121–135.

Chatzifragkou, A., Dietz, D., Komaitis, M., Zeng, A.-P. e Papanikolaou, S. (2010). Effect of Biodiesel-Derived Waste Glycerol Impurities on Biomass and 1,3-Propanediol Production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. *Biotechonology and Bioengineering* , 107(1): 76-84.

Chen, X., Zhang, D., Qi, W., Gao, S., Xiu, Z. e Xu, P. (2003). Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions . *Applied Microbiology and Biotechnology* , 63(2): 143-146.

Claret, C., Salmon, J. M., Romieu, C. e Bories, A. (1994). Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 41(3):359-365.

Colin, T., Bories, A. e Moulin, G. (2000). Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 201-205.

Cunha, M.V. e Foster, M.A. (1992b). Sugar-Glycerol Cofermentations in *Lactobacilli*: the Fate of Lactate. *Journal of Bacteriology* , 174(3): 1013-1019.

Cunha, M. e Foster, M. (1992a). 1,3-Propanediol:NAD^+ Oxidoreductases of *Lactobacillus brevis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6): 2005-2010.

Dharmadi, Y., Murarka, A. e Gonzalez, R. (2006). Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering* , 94: 821–829.

Dhurjati, P., Ramkrishna, D., Flickinger, M. e Tsao, G. (1985). Cybernetic view of microbial growth: modeling of cells as optimal strategists. *Biotech. Bioeng.* , 27: 1-9.

Drozdzynska, A., Leja, K. e Czaczyk, K. (2011). Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 92(1): 92-100.

DUPONT, Renewably Sourced Material. Disponível em <http://www2.dupont.com/Renewably_Sourced_Materials/en_US/materials.html>, acesso em 02 fevereiro de 2013.

Gancedo, C., Llobell, A., Ribas, J. C. e Luchi, F. (1986). Isolation and characterization of mutants from *Schizosaccharomyces pombe* defective in glycerol catabolism. *European Journal of Biochemistry* , 159: 171–174.

Gilbert, D. (2006). Genomic comparison of lactic acid bacteria published. *News Release Archives* .

Graumann, K. e Premstaller, A. (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal* , 1(2): 164-186.

Grauslund, M., Lopes, J. M. e Ronnow, B. (1999). Expression of GUT1, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. *Nucleic Acids Research* , 22: 4391–4398.

Haasa, T., Jaegera, B., Webera, R., Mitchellb, S. F. e Kingb, C. F. (2005). New diol processes: 1,3-propanediol and 1,4-butanediol. *Applied Catalysis A: General 280* , 83-88.

Hao, J., Lin, R., Zheng, Z., Liu, H. e Liu, D. (2008). Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* , 24: 1731-1740.

Homann, T., Tag, C., Biebl, H., Deckwer, W-D. e Schink, B. (1990). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains . *Applied Microbiology and Biotechnology* , 33: 121-126.

ICIS Green Chemicals (2010). Disponível em <http://www.icis.com/blogs/greenchemicals/2010/05/dupont-tate-lyle-expands-bio-p.html> , acesso em 31 de janeiro de 2011.

Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T. e Nishio, N. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 100: 260–265.

Itoh, N., Tuijibata, Y. e Liu, J. Q. (1995). Cloning and overexpression in *Escherichia coli* of the gene encoding dihydroxyacetone kinase isoenzyme I from *Schizosaccharomyces pombe* and its application to dihydroxyacetone phosphate production. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 51: 193–200.

Jansen, N. B., Flickinger, M. C. e Tsao, G. T. (1984). Production of 2,3-butanediol from Dxylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. *Biotechnology and Bioengineering* , 26: 362-369.

Jarvis, G. N., Moore, E. R. e Thiele, J. H. (1997). Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *Journal of Applied Microbiology* , 83: 166–174.

Jo J.-E,. Raj S. M.; Rathnasingh C., Selvakumar, E. Jung W.-C., Park S. (2008). Cloning, expression, and characterization of an aldehyde dehydrogenase from Escherichia coli K-12 that utilizes 3-Hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Applied of Microbiology and Biotechnology* (2008) 81:51–60.

Lee, P. C., Lee, W. G., Lee, S. Y. e Chang, H. N. (2001). Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnology and Bioengineering* , 72: 41–48.

Malik, P. e Roy, G. (2005). Metabolic Engineering: Issues and Prospects. *Biotechnology* , 4(4): 6-7.

Maree, S., e Nyokong, T. (2000). Electrocatalytic behavior of substituted cobalt phthalocyanines towards the oxidation of cysteine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 492(2): 120-127.

MarketsandMarkets (2012). 1,3-Propanediol (PDO) Market By Applications (PTT [Polytrimethylene Terephthalate], Polyurethane, Cosmetic, Personal Care & Home Cleaning & other Applications) & Geography - Global Market Trends & Forecasts to 2019. Disponível em <1,3-Propanediol (PDO) Market By Applications (PTT [Polytrimethylene Terephthalate], Polyurethane, Cosmetic, Personal Care & Home Cleaning & other Applications) & Geography - Global Market Trends & Forecasts to 2019>, acesso em 29 de novembro de 2013.

Menzel, K., Zeng, A. e Deckwer, W. (1997). High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme and Microbial Technology* , 20(2): 82-86.

Metsoviti, M., Zeng A.-P., Koutinas, A. A. e Papanikolaou, S. (2013). Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated Citrobacter freundii strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. *Journal of Biotechnology*,163(4): 408–418.

Mota, C. J.A., Da Silva, C. X. A. e Gonçalves, V. L. C. (2009). Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. Quimica Nova, 32(3), 639-648.

Nabe, K., Izuo, N., Yamada, S. e Chibata, I. (1979). Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology* , 38(6): 1056–1060.

Nakamura, C. E. e Whited, G. M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology* , 14: 454–459.

Narang, A. (1998). The Steady States of Microbial Growth on Mixtures of Substitutable Substrates in a Chemostat. *Journal of Theoretical Biology*, 190: 241-261.

Papanikolaou, S., Fick, M. e Aggelis, G. (2004). The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* , 79(11): 1189-1196.

Pavone, A. Cerenol™. DuPont Polyether Glycol Made from 1,3-Propanediol (PDO). IHS Chemical, PEP Review (2013).

Peng, L. e Shimizu, K. (2006). Effect of *fadR* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* based on analyses of protein expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3-4): 512-520.

Pfennig, N. e Lippert, K. (1966). Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Archives of Microbiology* , 55(3): 245-256.

Pflugmacher, U. e Gottschalk, G. (1994). Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 41: 313-316.

Pidoux, M. (1989). The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* , 5 (2): 223–238.

PRO-BIP (2009). Product overview and market projection of emerging bio-based plastics. Final Report. University of Utrecht.

Puchenkova, S.G. (1996). Enterobacteria in areas of water along the Crimean Coast. *Mikrobiolohichnyĭ zhurnal* , 58(2): 3-7.

Radler, F. e Schütz, H. (1984). Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and applied microbiology* , 5: 169-178.

Rhee, S.G., Bae, Y.S., Lee, S.-R. e Kwon, J. (2000). Hydrogen Peroxide: A Key Messenger That Modulates Protein Phosphorylation Through Cysteine Oxidation. *Sci. STKE*, 53, pe1.

Ryan, K. e Ray, C. (2004). *Sherris Medical Microbiology* . 4th ed.: McGraw Hill.

Raynaud, C., Sarçabal, P., Meynial-Salles, I., Croux, C. e Soucaille, P. (2003). Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum. Proceeding of the National Academy of Sciences of the Unites States of America*, 100(9): 5010-5015.

Saxena, R. K., Anand, P., Saran, S. e Isar, J. (2009). Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*: 27, 895-913.

SBI *Energy* (2010). *Biorenewable Chemicals World Market*. Disponível em <http://www.sbireports.com/Biorenewable-Chemicals-2747396/>, acesso em 29 de novembro de 2013.

SRI Consulting (2000). 1,3-Propanediol and polytrimethylene terephthlate. PEP'97 227 ERM & RGB.

Sun, Y. Q., Qi, W. T., Teng, H., Xiu, Z. L., Zeng A.P. (2008). Mathematical modeling of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Concerning enzyme-catalytic reductive pathway and transport of glycerol and 1,3-propanediol across cell membrane. *Biochemical Engineering Journal*, 38: 22–32.

Tang, X., Tan, Y., Zhu, H., Zhao, K. e Shen, W. (2009). Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by engineered strain of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* , 75(6): 1628-1634.

Tate & Lyle. DuPont Tate & Lyle Bio Products Begin BioPDO™ Production in Tennessee. Disponível em <http://www.tateandlyle.presscentre.com/content/detail.aspx?releaseid=89&news>, acesso em 02 de fevereiro de 2013.

Ting, I.P. e Osmond C.B. (1973). Photosynthetic Phosphoenolpyruvate Carboxylases Characteristics of Alloenzymes from Leaves of C3 and C1 Plants. *Plant Physiology March*, 51(3): 439-447.

Tong, I-T. e Cameron, D. C. (1992). Enhancement of 1,3-Propanediol production by cofermentation in *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* dha regulon genes . *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 34-35(1): 149-159.

Tortora, G., Funke, B. e Case, C. L. (2005). *Microbiologia.* 8ed. Porto Alegre: Artmed.

Van Zyl, P. J., Prior, B. A. e Kilian, S. G. (1991). Regulation of glycerol metabolism in *Zygosaccharomyces rouxii* to osmotic stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 36: 369–374.

Varner, J e Ramkrishna, D. (1999). Metabolic Engineering from a Cybernetic Perspective. 1. Theoretical Preliminaries.*Biotechnology Progress,* 15: 407–425.

Wagner, A. (2012). Metabolic Networks and Their Evolution. *Evolutionary Systems Biology*, Advances in Experimental Medicine and Biology, 751. Springer ScienceBusiness Media, LLC.

Walsh, G. (2005). Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Applied microbiology and biotechnology* , 67(2): 151-159.

Wang, J., Chang, S., Chen, Y. e Luh, K. (2000b). Comparison of antimicrobial susceptibility of *Citrobacter freundii* isolates in two different time periods. *The Journal of Microbiology, Immunology and Infection* , 33(4): 258-262.

Wang, Z. X., Zhuge, J., Cao, Y., Chen, J. e Fang, H. Y. (2000a). The key enzymes of metabolism of glycerol in *Candida glycerolgenesis*. *Acta Microbiol Sin* , 40: 180–187.

Wang, Z. X., Zhuge, J., Fang, H. e Prior, B. A. (2001). Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnology Advances* , 19: 201–223.

Whalen, J. e Mully, T. (2007). Spontaneous *Citrobacter freundii* infection in an immunocompetent patient. *Archives of dermatology* , 143(1): 124-125.

Zeng, A-P. e Biebl, H. (2002). Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 74: 239-259.