Universidade Federal do Rio de Janeiro

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

BIOAPROVEITAMENTO DE GLICEROL POR *Clostridium* spp. PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO, ENGENHARIA METABÓLICA E *DOWNSTREAM*

Daiana Wischral

Orientadores:

Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)

Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, *DSc* (EQ/UFRJ)

Shang-Tian Yang, *PhD* (*CBEC*/*The Ohio State University* - Columbus, OH)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2016

BIOAPROVEITAMENTO DE GLICEROL POR *Clostridium* spp. PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO, ENGENHARIA METABÓLICA E *DOWNSTREAM*

Daiana Wischral

Tese de Doutorado apresentada ao Programa 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 para obtenção do grau de Doutor em Ciências (*DSc.*).

Orientadores:

Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)

Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, *DSc* (EQ/UFRJ)

Shang-Tian Yang, *PhD* (*CBEC*/*The Ohio State University* - Columbus, OH)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2016

Wischral, Daiana
W811b BIOAPROVEITAMENTO DE GLICEROL POR Clostridium spp. PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO, ENGENHARIA METABÓLICA E DOWNSTREAM / Daiana Wischral. -- Rio de Janeiro, 2016.
215 f.

Orientador: Nei Pereira Jr..
Coorientador: Fernando Luiz Pellegrini Pessoa.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2016.

1. 1,3-propanodiol. 2. Glicerol. 3. Clostridium spp.. 4. Engenharia metabólica. 5. Downstream. I. Pereira Jr., Nei , orient. II. Luiz Pellegrini Pessoa, Fernando, coorient. III. Título.

BIOAPROVEITAMENTO DE GLICEROL POR *Clostridium spp.* PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO, ENGENHARIA METABÓLICA E *DOWNSTREAM*

Daiana Wischral

Tese de Doutorado apresentada ao Programa 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 para obtenção do grau de Doutor em Ciências (*DSc.*).

Aprovada em

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*. EQ-UFRJ (Orientador)

Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, *DSc*. EQ-UFRJ (Orientador)

Prof[a]. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, *DSc*. EQ-UFRJ

Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, *DSc*. EQ-UFRJ

Prof[a]. Antônio Carlos Augusto Costa, *DSc*. IQ-UERJ

Cláudia Groposo, *DSc*. CENPES-PETROBRÁS

Viridiana Santana Ferreira Leitão, *DSc*. INT-RJ

Aos meus exemplos de força e fé: meus avós, Carlos (*in memoriam)* e Cidália (*in memoriam*), e meus pais, Nilberto e Edeltraud dedico esta tese.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela força em todos os momentos e por colocar no meu caminho cada uma das pessoas iluminadas, citadas a seguir nestes agradecimentos.

Aos meus pais, Nilberto e Edeltraud Wischral, e familiares, em especial minha irmã Caroline Wischral, por todo o amor, apoio e confiança incondicionais.

Ao meu querido orientador, Professor Nei Pereira Jr., ilustre pesquisador de profunda visão, serei eternamente grata pelos inúmeros ensinamentos, total confiança, paciência, amizade e constante encorajamento. Sua dedicação e seu olhar sempre atento e crítico ao lapidar tudo o que faz com tanta maestria são exemplares e tornaram sua contribuição inestimável a esta tese.

Ao meu querido orientador, Professor Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, pelos ensinamentos, total apoio e confiança durante todo o desenvolvimento da tese.

Ao querido Professor Shang-Tian Yang, da *The Ohio State University*, excelente pesquisador, por me receber muito bem em seu grupo de pesquisa. Seu domínio do tema, alto nível de exigência e total liberdade no desenvolvimento das atividades em laboratório foram fundamentais para a conclusão desta tese. Sua eficiência e serenidade diante das dificuldades são um grande exemplo para mim.

Ao meu querido Leonardo Cardoso por todo amor, apoio, paciência, incentivo, companheirismo de sempre e ainda me ensinar estatística.

Às minhas queridas amigas Carolina Barcelos e Mariana Faber que me acompanharam e instruiram desde o início das atividades no laboratório, muito obrigada pelos ensinamentos, apoio, torcida e tantos momentos agradáveis de descontração.

Ao querido amigo Roberto Maeda por todo apoio, amizade e inúmeros ensinamentos do começo ao fim desta tese, sua dedicação e profissionalismo são exemplares para mim.

Aos grandes amigos do LADEBIO: Juliana, Johanna, Patrycia, Ana Pantoja e Vanessa pelos ensinamentos, sugestões, apoio incondicional, encorajamento e momentos de descontração; à Áurea, Bia, Carol Abreu, Carolina Lázaro, Isis e Túlio pela assistência, apoio e colaboração no trabalho; e à Suzana, Carina, Danielle, Fernando, Leonard, Luiz André, Luiz Felipe, Lys, Manu, Monica, Paulo e Rodrigo pela agradável convivência.

Aos colegas e amigos do laboratório do Prof Yang: Le Yu, Xu Mengmeng, Jianzhi Zhang, Chi Cheng, Meng Lin, Fangfang Liu e Hongxin Fu pelas instruções em fermentações anaeróbias, engenharia metabólica, *gas stripping* e *salting-out* indispensáveis para o avanço e desenvolvimento desta tese; e as queridas Kookae Srisakul e Annie Ali pela amizade e momentos de descontração.

Ao querido Joaquim Santos do Laboratório de Anaeróbios do Instituto de Microbiologia da UFRJ pelas instruções sobre cultivo de bactérias anaeróbias.

À querida Natalie Khoury pela excelente hospitalidade em Columbus.

A todas as amizades nascidas em Columbus que fizeram dessa uma experiência incrível e estarão eternamente em meu coração: Matteo Cocetti, Nina Lobzhanidze, Giuliano Bertagna, Gabriella Cobellis, Emanuelle La Corte, Loveheart Rodney, Renata Cardoso, Larissa Dorigon, Sandro Jerônimo, Karina Medeiros, Tânia Costa, Giurock, Marina Tavares, Juliana Espíndola, Catheleen McComas, Bruce e Melissa Wilson.

Aos queridos amigos Mark e Sally Sulc e a todos os amigos do grupo de discussão da bíblia organizados por eles, sem palavras para agradecer todo o carinho, apoio, preces e tantos bons momentos em Columbus. Pessoas de muita fé, verdadeiros exemplos de doação e de amor ao próximo.

Às queridas amigas da pós-graduação Alyne Moraes, Isabella Cesario e Danielle Nunes pelo apoio, torcida e encorajamento desde o início.

Às grandes amigas de longa data que apesar da distância sempre estiveram presentes, Elisiane Jaschefsky, Patricia Maros, Nathaly Brunnquell e Ellen Krause pela torcida, apoio e pelos ótimos momentos juntas.

Aos funcionários do LADEBIO Luiz Cláudio, Jorge Malheiros e Janaina Brito.

À amiga e secretária do PRH-13, Alzirene Ferreira, a aos funcionários da secretaria da pós-graduação da Escola de Química, Roselee, Julio e Nathalia, por todo o auxílio durante esses anos.

À todos os professores que tive na vida pela contribuição na minha formação pessoal e profissional.

Aos professores que compuseram a banca de qualificação pelas valiosas contribuições e sugestões.

À ANP pela concessão da bolsa de doutorado no Brasil por meio do PRH-13.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche nos EUA.

Aos membros da banca por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

WISCHRAL, Daiana. **Bioaproveitamento de glicerol por *Clostridium* spp. para produção de 1,3-propanodiol: otimização do processo fermentativo, engenharia metabólica e *donwstream*.** Tese de doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Brasil, 2016.

Orientadores: Nei Pereira Jr., Fernando Luiz Pellegrini Pessoa e Shang-Tian Yang.

O 1,3-propanodiol, tradicionalmente obtido a partir de matéria prima fóssil, é largamente empregado na indústria química, principalmente para a produção de uma classe superior de polímeros. Vários substratos são atualmente estudados para a obtenção de 1,3-propanodiol dentre eles o glicerol, um subproduto de baixo valor agregado oriundo da indústria de biodiesel. O presente trabalho objetivou otimizar a produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol, utilizando bactérias *Clostridium* spp., e propor uma estratégia para recuperação do produto. Inicialmente, realizou-se a seleção da melhor linhagem e a otimização do meio de cultura para a linhagem selecionada (*C. beijerinckii* DSM 791). Então, estudou-se a otimização do pH e a substituição do extrato de levedura por milhocina, levando ao aumento de rendimento, crescimento celular e produtividade. Investigou-se a adição de glicose ao meio de cultivo, entretanto nenhum efeito positivo foi observado no crescimento celular ou na produção de 1,3-propanodiol. Imobilizou-se as células em *fibrous bed bioreactor*, estratégia empregada para contornar a inibição da fermentação pela produção de 1,3-propanodiol, obtendo-se produção estável por longo prazo em batelada sequencial. A linhagem foi então modificada geneticamente para aumentar a atividade das enzimas: glicerol desidrogenase (GDH) e dihidroxiacetona quinase (DHAK), a partir de *E. coli*, resultando em uma produtividade de 0,99 $g/L.h^{-1}$ e 0,71 $g/L.h^{-1}$ de 1,3-propanodiol a partir de glicerol e glicerina, respectivamente. A estratégia de engenharia metabólica aumentou além da produtividade de 1,3-propanodiol, a taxa de crescimento celular. Por fim, duas técnicas de *donwstream* foram estudadas para recuperação de 1,3-propanodiol: *gas stripping* e *salting-out*, sendo esta última a técnica que apresentou coeficiente de partição de 33 e recuperação de 97%. Este trabalho pode servir de base para o desenvolvimento de um processo economicamente competitivo de bioprodução de 1,3-propanodiol.

Palavras-chave: 1,3-propanodiol. Glicerol. *Clostridium beijerinckii* DSM 791. Glicerol desidrogenase. Dihidroxiacetona quinase. *Salting-out*.

ABSTRACT

WISCHRAL, Daiana. **Bioaproveitamento de glicerol por *Clostridium* spp. para produção de 1,3-propanodiol: otimização do processo fermentativo, engenharia metabólica e *donwstream*.** Tese de doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Brasil, 2016.

Advisors: Nei Pereira Jr., Fernando Luiz Pellegrini Pessoa e Shang-Tian Yang.

1,3-propanediol, traditionally obtained by fossil, has numerous applications in the chemical industry, mainly to produce polimers with high performace. Several substrates are currently investigated for 1,3-propanediol production, including glycerol, a low-value byproduct from the biodiesel industry. Thus, the present work reported the use of a robust *Clostridium* spp. for 1,3-propanediol production from glycerol as well as a strategy for product recovery. Initially, a selection of the best strain was performed and the optimization of the culture medium for the selected strain (*C. beijerinckii* DSM 791) was carried out. Then, the optimization of pH and the replacement of yeast extract by corn steep liquor greatly improved yield, cell growth and fermentation productivity. Addicionaly, the addition of glucose in fermentation medium was investigated, however no positive effect was observed either on cell growth or 1,3-propanediol production, which was ascribed to the strong inhibition caused by glucose. To partially circumvent 1,3-propanediol inhibition on the fermentation, cells were immobilized in a fibrous bed bioreactor for stable, long-term 1,3-propanediol production in a repeated batch mode of operation. The strain was genetically engineered to overexpress glycerol dehydrogenase (GDH) and dihydroxyacetone kinase (DHAK), from *E. coli*, which resulted in a 1,3-propanediol productivity of 0,99 $g/L.h^{-1}$ and 0,71 $g/L.h^{-1}$ to pure glycerol and crude glycerol, respectively. This study demonstrated an effective metabolic engineering strategy to increase the production rate of 1,3-propanediol from glycerol in a clostridial fermentation. Finally, two donwstream techniques have been studied for recovery of 1,3-propanediol: *gas stripping* and *salting-out*, and the latter technique showed a partition coefficient of 33 and 1,3-propanediol recovery of 97%. The findings of this work can guide the further development of a fermentation process for economical production of bio-based 1,3-propanediol.

Keywords: 1,3-propanediol. Glycerol. *Clostridium beijerinckii* DSM 791. Glycerol dehydrogenase. Dihydroxyacetone quinase. Salting-out.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Obtenção de glicerol a partir da síntese de propeno. 28

Figura 2.2: Reação de transesterificação de triglicerídeo que leva a obtenção de ésteres (biodiesel) e glicerol. 28

Figura 2.3: Mapa de plantas de biodiesel autorizadas por capacidade de produção. 32

Figura 2.4: O consumo anual de biocombustíveis nos EUA estimado para o período de 2008 a 2022. 33

Figura 2.5: Distribuição percentual das principais aplicações de glicerol. 34

Figura 2.6: Glicerina como *building block* para obtenção de produtos químicos. 37

Figura 2.7: 1,3-propanodiol, obtido a partir de glicerol por rota biotecnológica, como *building block* em diferentes segmentos industriais. 41

Figura 2.8: Rotas metabólicas para síntese de 1,3-propanodiol, ácidos orgânicos e solventes por bactérias. Destacados em: verde a via redutiva, amarelo a via oxidativa, vermelho as enzimas e azul os genes. 47

Figura 2.9: Inserção de DNA exógeno em um vetor para formação do plasmídeo recombinante. 53

Figura 2.10: Módulos disponíveis nos plasmídeos da série pMTL80000 para a construção de recombinantes. 54

Figura 2.11: Representação de um ciclo da PCR para amplificação de determinada sequência de DNA. 55

Figura 4.1: Ativação e propagação em frascos agitados (80 rpm) a 37°C, agitador rotatório fabricado pela *New Brunswick Scientific* – Edison N. J., U.S.A. 73

Figura 4.2: Etapas e condições do processo de obtenção de ácidos e 1,3-propanodiol em biorreator mecanicamente agitado por *C. beijerinckii* DSM 791 a partir de glicerol. 79

Figura 4.3: Sistema FBB. 1: Fermentador, 2: Unidade de controle de temperatura, 3: Unidade de controle de pH, 4: Adição de solução de NH_4OH, 5 e 6: bombas peristáticas, 7 FBB, 8: Entrada de água e 9: Saída de água. 85

Figura 4.4: Sequência dos genes iniciadores. Destacados em: vermelho a sequência do plasmídeo, azul o sítio de restrição, branco a sequência Shine-Dalgarno (SD), verde o gene alvo e amarelo o fragmento de gene de *E.coli*. 87

Figura 4.5: Mapa do plasmídeo com as sequências *gldA* (GDH) e *dhaKLM* (DHAK). SacII: site de restrição; *traJ* +*ColE1*: replicação Gram-; *catP*: gene de resistência a antibiótico; *orf2*: sequência de codificação (CDS); *repA*: replicação Gram+; *Pthl*: promotor de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755. 87

Figura 4.6: Sequência de genes iniciadores para RT-PCR, para confirmação da expressão dos genes *gldA* e *dhaKLM*. 89

Figura 4.7: Sistema de *Gas stripping.* 1: Fermentador, 2: Unidade de controle de temperatura, 3: Unidade de controle de pH, 4: Adição de solução de NH_4OH, 5: bomba persitáltica, 6: CO_2/H_2 7: Unidade de resfriamento, 8: Condensador e 9: Produto. 92

Figura 4.8: Cromatograma típico de determinação de glicerol, butanol, 1,3-propanodiol e etanol obtido por CLAE - temperatura da coluna 45°C e detector RID (obtido no LADEBIO). 96

Figura 4.9: Cromatograma típico de determinação de ácido butírico, ácido lático e ácido acético obtido por CLAE - temperatura da coluna 45°C e detector UV (obtido no LADEBIO) 97

Figura 4.10: Cromatograma típico de determinação de glicerol, 1,3-propanodiol, ácido butírico, ácido lático e ácido acético obtido por CLAE – temperatura da coluna 65°C e detector RID (obtido na *The Ohio State University*). 98

Figura 4.11: Cromatograma típico de determinação de butanol, etanol e acetona obtido em CG (obtido na *The Ohio State University*). 99

Figura 4.12: Fluxograma das etapas da otimização do bioaproveitamento de glicerol por *Clostridium* spp. para produção de 1,3-propanodiol deste trabalho. Destacados em: azul os ensaios em frascos, laranja os ensaios em biorreator e verde os ensaios em frascos e biorreator. 100

Figura 5.1: Perfil cinético de consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), por *C. beijerinckii* DSM 791, em frascos a 80 rpm e 37°C. 105

Figura 5.2: Perfil cinético de consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), por *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 2152, em frascos a 80 rpm e 37°C. 105

Figura 5.3: Perfil cinético de consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), por *C. butyricum* INCQS 00635, em frascos a 80 rpm e 37°C. 106

Figura 5.4: Microscopia ótica de células de *C. beijerinckii* DSM 791 coradas pela técnica de Gram (aumento de 1.000x). 107

Figura 5.5: Diagrama de Pareto para produção de 1,3-propanodiol por *C. beijerinckii* DSM 791 a partir do delineamento experimental de *Plackett-Burman*. 109

Figura 5.6: Diagrama de Pareto relacionando a significância dos fatores envolvidos com a produção de 1,3-propanodiol por meio do delineamento fatorial fracionado (2^{6-2}). 111

Figura 5.7: Superfície de resposta da otimização das concentrações de K_2HPO_4 e glicerol em função de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) (g/L), para formulação do meio ótimo para fermentação de glicerol. 115

Figura 5.8: Superfície de resposta da otimização das concentrações de K_2HPO_4 e glicerol em função de RPS (%), para formulação do meio ótimo para fermentação de glicerol. 116

Figura 5.9: Superfície da função *Desirability* para otimização das concentrações de K_2HPO_4 e glicerol. 117

Figura 5.10: Cinética de fermentação nas condições otimizadas em frascos, favorecendo o consumo de glicerol e a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) por *C. beijerinckii* DSM 791 a 37°C e 80 rpm. 118

Figura 5.11: Perfil cinético de crescimento bacteriano, consumo de glicerol, produção de ácidos orgânicos e 1,3-propanodiol (1,3-PDO), por *C. beijerinckii* DSM 791 em biorreator agitado mecanicamente (100 rpm) a 37°C. 119

Figura 5.12: Comparação entre os métodos enzimático e CLAE de determinação de glicerol. 120

Figura 5.13: Correlação entre os métodos enzimático e CLAE de quantificação de glicerol. 121

Figura 5.14: Otimização do pH em batelada alimentada com meio otimizado por *C. beijerinckii* DSM 791, conduzidas em biorreator mecanicamente agitado (100 rpm), 37°C em 72 horas. 123

Figura 5.15: Efeito da concentração de glicose sobre produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), ácidos e RPS na fermentação propanodiólica conduzida em frascos a 37°C, 80 rpm, 30 g/L de glicerol por 72 h. 126

Figura 5.16: Cinética de fermentação de *C. beijerinckii* DSM 791, a 37°C, utilizando-se glicose primeiramente e glicerol na sequência, como fontes de carbono, em biorreator agitado mecanicamente (100 rpm). 126

Figura 5.17: Perfil cinético de fermentação propanodiólica em batelada simples por *C. beijerinckii* DSM 791, utilizando meio otimizado, com extrato de levedura, a 37°C, em biorreator mecanicamente agitado (100 rpm) e pH controlado entre 5,5 e 6,0. 129

Figura 5.18: Perfil cinético de fermentação propanodiólica em batelada simples por *C. beijerinckii* DSM 791, a 37°C, utilizando meio otimizado, substituindo o extrato de levedura por milhocina (30,0 g/L), em biorreator mecanicamente agitado (100 rpm) e pH controlado entre 5,5 e 6,0. 130

Figura 5.19: Cinética de produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) por batelada alimentada em biorreator agitado mecanicamente com C. beijerinckii DSM 791, em meio otimizado contendo glicerol como substrato, 30,0 g/L de milhocina e pH controlado entre 5,5 e 6,0. 134

Figura 5.20: Sistema utilizado no ensaio de batelada sequencial, formado pelo biorreator mecanicamente agitado (100 rpm) conectado ao biorreator onde as células ficam imobilizadas (FBB), com controle de temperatura (37°C) e pH (entre 5,0 e 6,0). 137

Figura 5.21: Perfil do sistema de bateladas sequenciais com células de *C. beijerinckii* DSM 791 imobilizadas em FBB, utilizando meio otimizado com 20 g/L de glicerol e 30 g/L de milhocina, a 37°C e pH controlado entre 5,5 e 6,0. 138

Figura 5.22: Rendimento e produtividade em cada ciclo da batelada sequencial, em biorreator FBB com *C. beijerinckii* DSM 791. 138

Figura 5.23: Gel da digestão enzimática para verificação da construção do plamídeo por PCR. E: EcoRV, S: SacII e M: marcador. 140

Figura 5.24: Gel da PCR para verificação da inserção plasmidial. 1: *C. beijerinckii* A1, 2: *C. beijerinckii* DSM 791 (controle negativo), 3: plasmídeo (pMTL82151-gldA-dhaKLM) e M: Marcador. 141

Figura 5.25: Gel da RT-PCR para confirmação da expressão dos genes glicerol desidrogenase (*gldA*) e dihidroxiacetona quinase (*dhaKLM*) na recombinante. M: Marcador, A e B: *C. beijerinckii* DSM 791 (controle negativo), C e D: *C. beijerinckii* A1. 142

Figura 5.26: Comparação da atividade enzimática da GDH entre *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1. 143

Figura 5.27: Cinética de produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) em biorreator mecanicamente agitado, em batelada simples, com *C. beijerinckii* A1, meio otimizado com 30,0 g/L de glicerol e 30 g/L de milhocina e pH controlado entre 5,5 e 6,0. 145

Figura 5.28: Cinética de produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) em biorreator mecanicamente agitado, em batelada alimentada, com *C. beijerinckii* A1, meio otimizado com 30 g/L de milhocina e pH controlado entre 5,5 e 6,0. 146

Figura 5.29: Perfil ciinético da fermentação por *C. beijerinckii* DSM 791 utilizando biorreator mecanicamente agitado, em meio otimizado com 75 g/L de glicerina e 30 g/L de glicerol, 37°C, 100 rpm e pH controlado entre 5,5 e 6,0. 149

Figura 5.30: Perfil ciinético da fermentação por *C. beijerinckii* A1 utilizando biorreator mecanicamente agitado, em meio otimizado com 75 g/L de glicerina e 30 g/L de glicerol, 37°C, 100 rpm e pH controlado entre 5,5 e 6,0. 150

Figura 5.31: Perfis de crescimento de células de *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1, em biorreator mecanicamente agitado, com glicerol (G) e glicerina (GN) como fonte de carbono e extrato de levedura (E.L.) ou milhocina (os demais) como fonte de nitrogênio. 151

Figura 5.32: Sistema de extração líquido-líquido de 1,3-propanodiol do meio de cultivo, em tubos graduados com a indicação das respectivas fases obtidas com o efeito *salting-out*. 156

Figura 5.33: Superfície de resposta da otimização das concentrações de etanol e K_3PO_4 para o coeficiente de partição (K) pelo sistema de extração de 1,3-propanodiol por *salting-out*. 161

Figura 5.34: Superfície de resposta da otimização das concentrações de etanol e K_3PO_4 para o rendimento de recuperação (Y) pelo sistema de extração de 1,3-propanodiol por *salting-out*. 161

Figura 5.35: Evolução dos resultados obtidos neste trabalho para otimização da fermentação propanodiólica a partir de glicerol, por *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1. 164

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Produção brasileira de biodiesel de 2011 a 2015 B100 em bep. 31

Tabela 2.2: Dados de importação de 1,3-propanodiol no Brasil, no período de 2006 a 2015. 43

Tabela 2.3: Microrganismos geneticamente modificados para produção de 1,3-propanodiol, empregando glicerol como única fonte de carbono e diferentes estratégias. 57

Tabela 4.1: Composição do meio RCM utilizado na hidratação e manutenção de *Clostridium* spp.. 71

Tabela 4.2: Composição dos meios de ativação e propagação para *Clostridium* spp. 72

Tabela 4.3: Composição do meio de produção empregado nos experimentos de *screening* de *Clostridium* spp.. 74

Tabela 4.4: Fatores e níveis usados no delineamento de *Plackett-Burman* na otimização do meio de produção para *C. beijerinckii* DSM 791. 76

Tabela 4.5: Fatores e níveis usados no delineamento fatorial fracionado (2^{6-2}) na otimização do meio de produção para *C. beijerinckii* DSM 791. 77

Tabela 4.6: Fatores e níveis usados no DCCR na otimização do meio de produção para *C. beijerinckii* DSM 791. 77

Tabela 4.7: Composição dos diferentes meios de produção utilizados no cultivo de *C. beijerinckii* DSM 791. 80

Tabela 4.8: Grau de redutibilidade de cada componente da fermentação propanodiólica utilizados nos balanços estequiométrico e redox. 83

Tabela 4.9: Condições empregadas na amplificação da sequência de DNA por PCR para a construção da recombinante. 86

Tabela 4.10: Composição do meio *Luria-Bertani* LB, utilizado para o cultivo de *E. coli* em frascos e em placas. 88

Tabela 4.11: Condições empregadas na amplificação do RNAm pela RT-PCR. 89

Tabela 4.12: Fatores e níveis usados no DCCR para otimização da extração de 1,3-propanodiol por *salting-out*. 94

Tabela 5.1: Ensaios de ativação das linhagens em frascos, a 80 rpm, 37°C, em meio RCM com 5,0 g/L de glicerol, durante 24 h. 102

Tabela 5.2: Ensaios de propagação das linhagens em frascos, a 80 rpm, 37°C, em meio RCM com 5,0 g/L de glicerol, durante 24 h. 103

Tabela 5.3: Ensaios de produção das linhagens em frascos, a 80 rpm, 37°C, em meio RCM com 12,0 g/L de glicerol, durante 24 h. 104

Tabela 5.4: Matriz de ensaios do delineamento de *Plackett-Burman* com os respectivos resultados para produção de 1,3-propanodiol e substrato residual. 108

Tabela 5.5: Matriz de ensaios do delineamento fatorial fracionado (2^{6-2}) com os respectivos resultados para produção de 1,3-propanodiol, substrato residual e relação C/N. 110

Tabela 5.6: Matriz de ensaios do DCCR com os respectivos resultados para produção de 1,3-propanodiol e RPS. 113

Tabela 5.7: Tabela da ANOVA para otimização das concentrações de K_2HPO_4 e glicerol para a variável de resposta 1,3-propanodiol (g/L). 114

Tabela 5.8: Tabela da ANOVA para otimização das concentrações de K_2HPO_4 e glicerol para a variável de resposta RPS (%). 114

Tabela 5.9: Validação do modelo previsto pela função *Desirability* para otimização do meio de cultura com *C. beijerinckii* DSM 791. 118

Tabela 5.10: Variáveis de resposta de fermentações utilizando-se 10,0 g/L de glicerol como fonte de carbono em frascos, a 80 rpm, 37°C em 24 h. 122

Tabela 5.11: Avaliação do consumo de diferentes concentrações de glicerol em frascos a 37°C, 80 rpm e meio otimizado por *C. beijerinckii* DSM 791 durante 96 h. 124

Tabela 5.12: Variáveis de resposta de fermentações utilizando-se 10,0 g/L de glicerol e 10,0 g/L de glicose como fonte de carbono em frascos, a 80 rpm, 37°C por 24 h. 125

Tabela 5.13: Composição média da milhocina de 100 diferentes lotes de acordo com LIGGETT & KOFFLER (1997). 128

Tabela 5.14: Efeito da concentração de milhocina em fermentações em frascos, a 37°C e com concentração inicial de glicerol de 30,0 g/L por *C. beijerinckii* DSM 791, durante 72 h. 128

Tabela 5.15: Variáveis de resposta de fermentações em batelada simples em meios otimizados com extrato de levedura e milhocina, em biorreator agitado mecanicamente (100 rpm) a temperatura de 37ºC e pH controlado entre 5,5 e 6,0. 131

Tabela 5.16: Influência da presença de ácido lático exógeno durante a fermentação propanodiólica em frascos, por *C. beijerinckii* DSM 791, a 37°C, 80 rpm e 30,0 g/L de glicerol inicial. 132

Tabela 5.17: Avaliação da inibição do consumo de glicerol por *C. beijerinckii* DSM 791, em frascos, utilizando 30,0 g/L de glicerol, meio otimizado com milhocina), durante 72 h, a 37°C e 80 rpm. 135

Tabela 5.18: Avaliação da estabilidade do plasmídeo em fermentações em frascos, com *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1, a 37°C, 80 rpm, utilizando o meio otimizado com 30,0 g/L de glicerol, 30 g/L de milhocina e 20g/L de $CaCO_3$, durante 72 h. 144

Tabela 5.19: Produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol e glicerina por *Clostridium* spp. em bateladas simples e alimentada. 152

Tabela 5.20: Ensaios de recuperação de 1,3-propanodiol e solventes do meio de fermentação por *gas stripping* (vazão da bomba de 1,2 L/minuto). 154

Tabela 5.21: Coeficiente de partição (K) para extração de 1,3-propanodiol do meio de cultivo por *salting-out*. 157

Tabela 5.22: Rendimento de recuperação Y (%) para extração de 1,3-propanodiol do meio de cultivo por *salting-out*. 157

Tabela 5.23: Matriz de ensaios do DCCR para extração de 1,3-propanodiol por *salting-out*, com os respectivos resultados para otimização de K e Y. 158

Tabela 5.24: Tabela de ANOVA do DCCR para otimização das concentrações de K_3PO_4, etanol e 1,3-propanodiol para o coeficiente de partição (K). 159

Tabela 5.25: Tabela de ANOVA do DCCR para otimização das concentrações de K_3PO_4, etanol e 1,3-propanodiol para o rendimento de recuperação (Y). 160

Tabela 5.26: Validação do modelo previsto pela função *Desirability*, nas condições otimizadas: 3,4 g/g de sal, 2,8 g/g solvente e 23,0 g/L 1,3-propanodiol, para extração de 1,3-propanodiol por *salting-out.* 162

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,3-PDO: 1,3-propanodiol;
2-DM: 2-metil-1,3-dioxano;
3-HPA: 3-hidroxipropionaldeído;
Abs: absorvância;
Acetil-CoA: acetil-coenzima A;
ack: acetato quinase;
adc: álcool descarboxilase;
adhE: álcool desidrogenase;
aldh: aldeído desidrogenase;
ADP: adenosina difosfato;
ALICEWEB: sistema de análise de comércio exterior;
ANOVA: Análise de Variância;
ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis;
ATCC: *American Type Culture Collection*;
ATP: adenosina trifosfato;
bah: butiraldeido desidrogenase;
bep: barris equivalentes de petróleo;
bcd: butiril-CoA desidrogenase;
bdh: butanol desidrogenase;
bdhD: 2,3-butanodiol desidrogenase;
bp: *base pairs*;
buk: butirato quinase;
C-mol: carbono-mol;
catP: denominação do gene de resistência a antibiótico;
CG: cromatografia gasosa;
CGM: *clostridial growth medium*;
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência;
C/N: relação carbono/nitrogênio;
C_P: concentração de produto no condensado;
D: valor *Desirability*;
DCCR: Delinemaneto Central Composto Rotacional;
dha: dihidroxiacetona;
dhaB: glicerol desidratase (gene);
DHAK: dihidroxiacetona quinase (enzima);
dhaK, dhaKLM: dihidroxiacetona quinase (gene);

dhaT: 1,3-propanodiol desidrogenase (gene);
DNA: ácido desoxiribonicleico;
DSM 791: *Clostridium beijerinckii* DSM 791;
DSMZ: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*;
EF: eficiência de fermentação;
E.L.: extrato de levedura;
EPA: *Environmental Protection Agency*;
EUA: Estados Unidos da America;
F: valor F de Fisher;
FBB: *fibrous bed bioreactor* ou biorreator de leito fibroso;
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz;
FOB: *Free On Board* (preço sem frete incluso);
G: glicerol;
gap: gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase;
GDH: glicerol desidrogenase (enzima);
GDHt: glicerol desidratase (enzima);
GL: graus de liberdade;
gldA: glicerol desidrogenase (gene);
glk: glucoquinase;
GN: glicerina;
gpm: fosfogliceratomutase;
hdg: hidrogenase;
K: coeficiente de partição;
LADEBIO: Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos;
LB: Luria-Bertani;
ldh: lactato desidrogenase;
mm: milímetros;
m/v: relação massa/volume;
NAD+: nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado);
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (reduzido);
NCM: Nomenclatura Comum do Mercosul;
nm: nanômetros;
orf2: denominação da sequência de codificação;
PBS: solução salina tamponada de fosfato;
PBT: polibutileno tereftalato;
PCR: reação em cadeia com polimerase;
PDDH: 1,3-propanodiol desidrogenase (enzima);

PD&I: pesquisa desenvolvimento e inovação;
PEP: fosfoenolpiruvato;
PET: polietileno tereftalato;
pfo: oxiredutase piruvato-ferredoxina;
pgK: fosfogliceratoquinase;
pH: potencial hidrogeniônico;
pMTL82151-gldA-dhaKLM: denominação do plasmídeo construído;
pta: fosfotransacetilase;
ptb: fosfotransbutirilase;
Pthl: tiolase promotora;
PTT: politereftalato de trimetileno;
pyk: piruvato quinase;
Q_P: produtividade volumétrica;
RCM: *Reinforced Clostridial Medium*;
RID: detector de índice de refração;
RNA: ácido ribonucleico;
RPS: redução percentual de substrato;
RT-PCR: transcriptase reversa-reação em cadeia com polimerase;
S: taxa de *stripping*;
SacII: sítio de restrição do plasmídeo;
SD: sequência Shine-Dalgarno;
SR: substrato residual;
TCA: ciclo do ácido cítrico;
td: tempo de duplicação;
thl: tiolase;
tpi: triosefosfato isomerase;
USP: United States pharmacopeia;
UV: ultra violeta;
U$: dólar americano;
v/v: relação volume/volume;
Y: porcentagem de recuperação;
$Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato;
$Y_{X/S}$: rendimento de células em relação ao substrato;
μ_x: taxa específica de crescimento.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO DO TEMA DA TESE 22

2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO 26

2.1 GLICEROL E GLICERINA 26

2.1.1 Obtenção, Produção e Composição da Glicerol 27

2.1.2 Mercado, Produtos e Aplicações de Glicerol 34

2.2 1,3-PROPANODIOL 38

2.2.1 Obtenção e Composição de 1,3-propanodiol 38

2.2.2 Mercado, Produtos e Aplicações de 1,3-propanodiol 40

2.3 BACTÉRIAS *Clostridium* spp. 44

2.3.1 Origem e Morfologia 44

2.3.2 Metabolismo do Consumo de Glicerol por *Clostridium* spp. 44

2.4 ENGENHARIA METABÓLICA DE BACTÉRIAS 50

2.4.1 Engenharia Metabólica Aplicada à Produção de 1,3-propanodiol partir de Glicerol 56

2.5 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL OBTIDO POR FERMENTAÇÃO 58

2.5.1 Recuperação de 1,3-propanodiol por *Gas stripping* 62

2.5.2 Extração Líquido-Líquido de 1,3-propanodiol – Efeito *Salting-out* 63

2.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS 64

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 65

3.1 OBJETIVO GERAL 66

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA TESE 66

4 MATERIAIS E MÉTODOS 67

4.1 SUBSTRATO, REAGENTES E MICRORGANISMOS 67

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR 68

4.3 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO PROCESSO 68

4.4 PREPARO E COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO 70

4.4.1 Meios de Hidratação e Estoque das Linhagens 71

4.4.2 Meios de Ativação e Propagação 72

4.5 SCREENING DA ASSIMILAÇÃO DE GLICEROL POR *Clostridium* spp. VISANDO À PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL 73

4.6 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR *C. beijerinckii* DSM 791 74

4.6.1 Validação do Meio Ótimo de Produção 78

4.6.2 Comparação do Meio Otimizado com Outros Meios Tradicionalmente Empregados para *Clostridium* spp. 79

4.7 OTIMIZAÇÃO DO pH PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR *C. beijerinckii* DSM 791 80

4.7.1 Aumento da Concentração de Glicerol Adicionando ao Meio 81

4.8 ADIÇÃO DE GLICOSE COMO CO-SUBSTRATO 81

4.9 SUBSTITUIÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA POR MILHOCINA 82

4.9.1 Influência do Ácido Lático 82

4.10 EMPREGO DE BATELADA ALIMENTADA EM BIORREATOR MECANICAMENTE AGITADO 83

4.11 EFEITO DA ADIÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL NO MEIO DE FERMENTAÇÃO 84

4.12 EMPREGO DE BATELADA SEQUENCIAL EM BIORREATOR DE LEITO FIBROSO (FBB) 84

4.13 ENGENHARIA METABÓLICA DE *C. beijerinckii* DSM 791 PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL 85

4.13.1 Obtenção da Recombinante - *C. beijerinckii* A1 85

4.13.2 Análise da Expressão do Gene por Transcrição Reversa (RT)-PCR 88

4.13.3 Determinação da Atividade Enzimática da GDH 89

4.13.4 Verificação da Estabilidade do Plasmídeo 90

4.13.5 Fermentações com *C. beijerinckii* A1 90

4.14 PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL USANDO GLICERINA COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO 91

4.15 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL 91

4.15.1 Recuperação de 1,3-propanodiol por *Gas stripping* 91

4.15.2 Extração Líquido-Líquido de 1,3-propanodiol – Efeito *Salting-out* 92

4.16 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS 94

4.16.1 Método Espectrofotométrico para Quantificação de Glicerol 94

4.16.2 Método Cromatográfico para Quantificação de Glicerol 96

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 101

5.1 *SCREENING* DA CAPACIDADE DE ASSIMILAÇÃO DE GLICEROL POR *Clostridium* spp. VISANDO A PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL 102

5.2 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR *C. beijerinckii* DSM 791 107

5.2.1 Validação do Meio Ótimo de Produção 116

5.2.2 Comparação do Meio Otimizado com Outros Meios Tradicionalmente Empregados para *Clostridium* spp. 121

5.3 OTIMIZAÇÃO DO pH PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR *C. beijerinckii* DSM 791 122

5.3.1 Aumento da Concentração de Glicerol Adicionando ao Meio 124

5.4 ADIÇÃO DE GLICOSE COMO CO-SUBSTRATO 124

5.5 SUBSTITUIÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA POR MILHOCINA 127

5.5.1 Influência do Ácido Lático 131

5.6 EMPREGO DA BATELADA ALIMENTADA EM BIORREATOR AGITADO MECANICAMENTE 133

5.7 EFEITO DA ADIÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL NO MEIO DE FERMENTAÇÃO 135

5.8 EMPREGO DA BATELADA SEQUENCIAL EM BIORREATOR DE LEITO FIBROSO (FBB) 136

5.9 ENGENHARIA METABÓLICA DE *C. beijerinckii* DSM 791 PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL 139

5.9.1 Obtenção da Recombinante - *C. beijerinckii* A1 140

5.9.2 Análise da Expressão do Gene por Transcrição Reversa (RT)-PCR 142

5.9.3 Determinação da Atividade Enzimática da GDH 143

5.9.4 Verificação da Estabilidade do Plasmídeo 144

5.9.5 Fermentações com *C. beijerinckii* A1 145

5.10 PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICERINA 149

5.11 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL 153

5.11.1 Recuperação de 1,3-propanodiol por *Gas stripping* 154

5.11.2 Extração Líquido-Líquido de 1,3-propanodiol – Efeito *Salting-out* 155

5.12 CONSIDERAÇÕES FINAIS 163

6 CONCLUSÕES 165

REFERÊNCIAS 169

ANEXOS 194

Capítulo 1

APRESENTAÇÃO DO TEMA DA TESE

As indústrias vêm buscando soluções sustentáveis para produção de energia, substâncias químicas e combustíveis. As principais forças motrizes que impulsionam a utilização de tecnologias renováveis são as preocupações com o aquecimento global, a busca por segurança energética e a volatilidade dos preços de matérias primas de origem fóssil. O desenvolvimento de processos biotecnológicos para obtenção de combustíveis e produtos químicos é uma maneira de garantir o suprimento futuro destes e atenuar problemas ambientais (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012; CHATZIFRAGKOU et al., 2014).

Em 2012, as energias renováveis representaram 13,2% do suprimento mundial de energias primárias. De acordo com o *International Energy Agency* (IEA), em 2013, as energias renováveis foram responsáveis por quase 22% da geração mundial de eletricidade, e, em 2020, essa porcentagem deverá ser para 26%. (RENEWABLE ENERGY, 2015).

O biodiesel é um dos biocombustíveis que aparecem como parte de um elenco de respostas à substituição dos combustíveis fósseis (MATA, MARTINS & CAETANO, 2013) e seu emprego já é mandatório em alguns países, dentre eles o Brasil (7% de biodiesel no diesel). O biodiesel é obtido principalmente por reação de transesterificação alcalina, método mais utilizado devido ao maior rendimento, produzindo como subproduto uma grande quantidade de glicerina (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

Em comparação com substratos convencionais utilizados em concepções tecnológicas que envolvem o conceito de Biorefinaria, como glicose e sacarose, o

glicerol apresenta as vantagens de ser um substrato barato e sustentável. Bactérias anaeróbias *Clostridium* spp. são capazes de metabolizar o glicerol por diferentes rotas metabólicas levando à obtenção de uma série de produtos de interesse, dentre eles o 1,3-propanodiol (YAZDANI & GONZALEZ, 2007; SILVA, MACK & CONTIERO, 2009).

O 1,3-propanodiol é um importante produto químico, majoritariamente utilizado na produção de polímeros (poliésteres, poliéteres e poliuretanos) e como um intermediário para a síntese de compostos heterocíclicos. O campo de aplicação de 1,3-propanodiol é amplamente abrangente, desde a produção de tintas, resinas, lubrificantes e anticongelantes até cosméticos (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012; LEE et al., 2015).

A demanda do mercado de 1,3-propanodiol ($C_3H_8O_2$) tem aumentado rapidamente, resultado do aumento da produção de politereftalato de trimetileno (PTT), usado na fabricação de tapetes e fibras especiais e têxteis. Até 2021, este mercado deverá crescer a uma taxa 10,4% ao ano, chegando a U$ 620 milhões (MARKETS&MARKETS, 2016). A atual produção do 1,3-propanodiol por vias químicas, tais como a hidrólise de acroleína e a reação de óxido de etileno com monóxido de carbono e hidrogênio, requerem altas pressões e o uso de catalisadores caros, além de gerarem intermediários poluentes (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012; DE SOUZA, ROSSI & AYUB, 2014; CHATZIFRAGKOU et al., 2014).

A rota bioquímica para obtenção de 1,3-propanodiol é particularmente atraente, uma vez que usa substratos renováveis, ocorre em condições normais de pressão e não conduz à geração de subprodutos tóxicos. Portanto, se trata de um processo sustentável que auxilia na mitigação do aquecimento global, quando comparado ao processo de obtenção a partir de matérias primas fósseis (SAXENA et al., 2009; LI, LESNIK & LIU, 2013; KUBIAK et al., 2012).

Há um interesse mundial pela bioprodução de 1,3-propanodiol, empregando substratos como a glicerina, um subproduto de baixo valor na indústria de biodiesel. A viabilidade econômica desse processo é dependente do preço do substrato, portanto, o uso de glicerina para a produção de 1,3-propanodiol poderia tornar este processo altamente competitivo (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

Para que Processos Biotecnológicos possam despertar o interesse comercial, seja na criação de um processo novo ou na otimização de um já existente, é essencial entender os fatores que afetam significativamente a sua competitividade. Bioprocessos devem ser periodicamente reavaliados, para incorporação de inovações tecnológicas, a fim de aumentar seu desempenho e lucratividade (PEREIRA, BON & FERRARA, 2008).

A utilização de ferramentas como a engenharia metabólica incorpora grande grau de inovação ao desenvolvimento de tecnologias para a bioprodução de 1,3-propanodiol. Grupos de pesquisas do mundo todo investigam diferentes estratégias, visando entender as complexas vias regulatórias, envolvidas no metabolismo desta heterofermentação, difíceis de manipular e controlar (HEAP et al., 2009; YU, 2015).

Anteriormente, o custo de produção de 1,3-propanodiol era muito dependente do custo do substrato (DECKWER, 1995; HERMANN & PATEL, 2007). No entanto, com a disponibilidade de substratos abundantes como o glicerol, o custo de processamento a jusante passa a ter maior impacto no custo total de produção, chegando à até 70% (XIU & ZENG, 2008). Portanto, a recuperação de 1,3-propanodiol, ao final do processo de fermentação, configura outra etapa de fundamental relevância para a bioprodução deste poliol.

Diante do exposto, o presente trabalho objetiva desenvolver um processo fermentativo para produção de 1,3-propanodiol, empregando bactérias *Clostridium* spp. que utilizem como substrato o glicerol, bem como o melhoramento da produção por meio da otimização das condições de processo, do uso de ferramentas de engenharia metabólica, além de propor uma estratégia de *downstream* para a recuperação do produto principal.

A presente tese de doutorado foi dividida em seis capítulos e está estruturada da seguinte forma: inicia-se com este capítulo 1 que trata da apresentação do tema, seguido pelo capítulo 2 com o referencial teórico que apresenta: (i) o panorama da produção de glicerina no Brasil, suas aplicações e as principais bactérias capazes de convertê-lo em produtos de interesse para a indústria química; (ii) as principais aplicações e demanda do 1,3-propanodiol (iii) o potencial de produção deste poliol por *Clostridium* spp.; (iv) o emprego da engenharia metabólica para melhoria do processo fermentativo; bem como, (v) as formas de recuperação de 1,3-propanodiol do meio de cultivo.

Em seguida, no capítulo 3, estão apresentados a justificativa e os objetivos da tese. No capítulo 4, estão descritas todas as metodologias experimentais e analíticas utilizadas para a execução do trabalho, de forma detalhada. Na sequência, no capítulo 5, apresentam-se os resultados obtidos experimentalmente e a discussão dos mesmos, comparando-os, quando procedente, com os resultados reportados na literatura. Por fim, no capítulo 6 relata-se as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

O desenvolvimento desta tese possibilitou a comunicação dos seguintes trabalhos de produção científica e tecnológica:

Artigos em periódicos:

WISCHRAL D.; BARCELOS C. A.; PEREIRA N.; PESSOA F. L. P. 1,3-propanediol: Statistical optimization of medium to improve production by *Clostridium beijerinckii* DSM 791. **Journal of Advances in Biotechnology**, v.5, n.2, p. 614-623, 2015.

WISCHRAL D.; ZHANG J.; CHENG C.; LIN M.; DE SOUZA L. M.; PESSOA F. L.; PEREIRA N.; YANG S.T. Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v.212, p. 100-110, 2016.

Trabalhos em eventos:

WISCHRAL D.; BARCELOS C. A.; PEREIRA N.; PESSOA F. L. P. Avaliação da capacidade de linhagens de *Clostridium* em consumir diferentes fontes de carbono. XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos & X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Foz do Iguaçú, Paraná – Brasil, 2013.

WISCHRAL D.; PEREIRA N.; PESSOA F. L. P. Aproveitamento de glicerol oriundo da produção de biodiesel. 7º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Aracaju, Sergipe – Brasil, 2013.

WISCHRAL D.; BARCELOS, C. A.; PEREIRA JR N.; PESSOA F. L. P. Optimization of culture medium to improve glycerol consumption and 1,3-propanediol production by *Clostridium beijerinckii* DSM 791. 37th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. San Diego, Califórnia – USA, 2015.

WISCHRAL D.; PEREIRA N.; PESSOA F. L. P. Otimização do pH para produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium beijerinckii* DSM 791. 8º Congresso Brasileiro de P&D em petróleo e gás. Curitiba, Paraná – Brasil, 2015.

Capítulo 2

LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1 GLICEROL E GLICERINA

O glicerol foi primeiramente descoberto em 1779 por Scheele, por meio do aquecimento de uma mistura de óxido de chumbo com azeite de oliva. A glicerol ocorre naturalmente em formas combinadas, como nos triglicerídeos, em todos os óleos graxos animais e vegetais, sendo isolado quando estes óleos são saponificados com hidróxido de sódio ou potássio, no processo de manufatura de sabões (PINTO & MOTA, 2014).

A matéria prima para a fabricação de explosivo a base de nitroglicerina é o glicerol. Inventada por Sobrero em 1846, a nitroglicerina em seu estado natural líquido é muito volátil e extremamente perigosa de manusear. Em 1866, o glicerol logo se tornou um recurso militar estratégico quando Nobel inventou a dinamite, ao descobrir que era possível misturar nitroglicerina com rocha sedimentar para formar uma massa moldável (CIRIMINNA et al., 2014).

No período a Primeira Guerra Mundial, a demanda por glicerol excedeu a oferta da indústria de sabão, portanto por razões de segurança militar foram construídas plantas industriais para fabricação glicerol tanto na Europa como nos Estados Unidos, nas quais o glicerol era produzido via fermentação microbiana a partir de açúcares (WANG, ZHUGE & FANG, 2001).

O termo glicerol se aplica ao componente químico puro, 1,2,3-propanotriol de fórmula molecular $C_3H_8O_3$. Este poliol é um líquido incolor, viscoso com temperatura de ebulição de 290°C (AYOUB & ABDULLAH, 2012; PINTO & MOTA, 2014). O

termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados. Em condições ambientais o manuseio de glicerina em suas três formas, dinamite, industrial e de fármaco, é absolutamente seguro. São os processos de nebulização e compressão que a tornam explosiva (MEIQ, 2006). Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente e diferem entre si por seu conteúdo de glicerol e outras características, tais como odor e impurezas (PERRY, GREEN & MALONEY, 1997; AYOUB & ABDULLAH, 2012).

O termo 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 básico e remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo (CGEE, 2010; MOTA, SILVA & GONÇALVES, 2009).

A glicerina purificada (glicerina farmacêutica) tem diversas aplicações nos setores de cosméticos, higiene pessoal, alimentos, medicamentos e fumo. Com relação aos seus derivados, a glicerina ainda apresenta aplicações limitadas, sendo as principais na produção de explosivos, como a nitroglicerina, e na formação de resinas alquídicas. No entanto, em face da sua crescente disponibilidade, estimulada pelos programas de produção de biodiesel em larga escala, há um intenso trabalho de PD&I focado na busca por novas aplicações para a glicerina (CGEE, 2010; MOTA, SILVA & GONÇALVES, 2009; CIRIMINNA et al., 2014).

2.1.1 Obtenção, Produção e Composição da Glicerol

O glicerol é produzido industrialmente pelos seguintes processos: a) como subproduto na fabricação de sabão, b) pela hidrólise da epicloridrina, c) por oxidação catalítica do propeno e d) pela reação de ácido peracético com álccol alílico (MEIQ, 2006; AYOUB & ABDULLAH, 2012).

Desde 1949, o glicerol tem sido produzido comercialmente pela síntese do propeno (Figura 2.1). A etapa inicial é a cloração, a alta temperatura, envolvendo radicais livres como intermediários, para formar o cloreto de alila. Este é então reagido com ácido dando origem a um produto de adição à dupla (haloidrina). Por fim, o tratamento da haloidrina com excesso de base leva a produção de glicerol (PINTO & MOTA, 2014). Durante mais de 60 anos este processo de produção de glicerol, atendeu a 25% da demanda mundial de glicerol (CIRIMINNA et al., 2014).

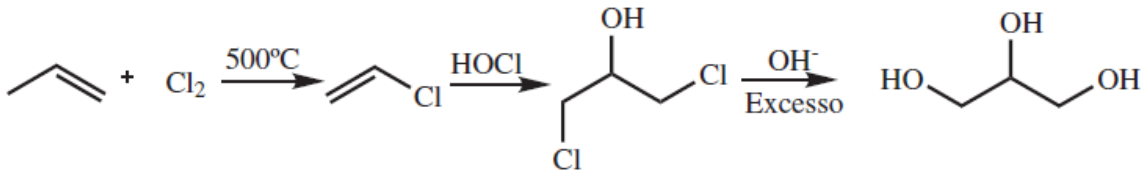

Figura 2.1: Obtenção de glicerol a partir da síntese de propeno. Fonte: PINTO & MOTA (2014).

Algumas espécies de algas unicelulares do gênero *Dunaliella* são capazes de produzir triglicerídeos e glicerol. A capacidade da célula de prosperar em ambientes hipersalinos depende da sua capacidade de produzir glicerol intracelular, pois o glicerol tem a função de regulador osmótico (CHEN, JIANG & WU, 2009a).

O glicerol, por ser o principal co-produto da reação de transesterificação, da produção do biodiesel, é gerado em grande escala. Óleos vegetais e gorduras animais são triglicerídeos constituidos por álcool de ácidos graxos saturados e insaturados e glicerol, como é possível observar na figura 2.2, onde R1, R2 e R3 são grupos alquila ou alquenila (PERRY, GREEN & MALONEY, 1997; PINTO & MOTA, 2014; CIRIMINNA et al., 2014).

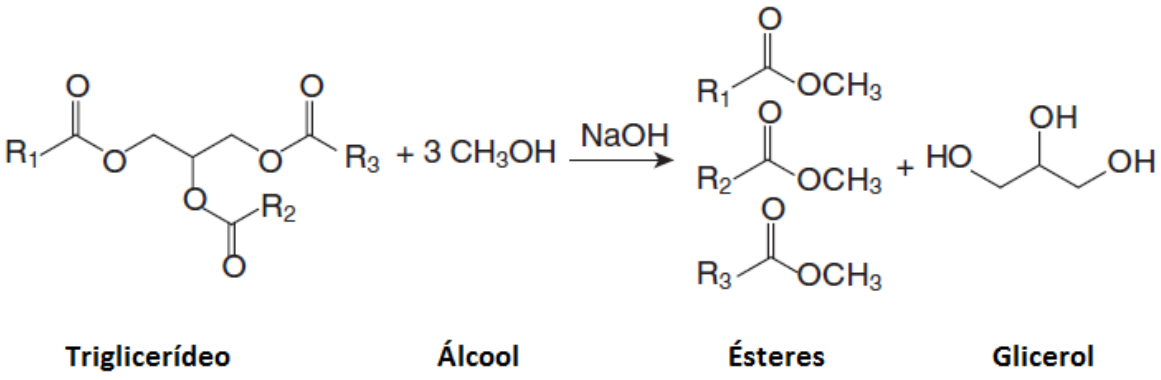

Figura 2.2: Reação de transesterificação de triglicerídeo que leva a obtenção de ésteres (biodiesel) e glicerol. Fonte: PINTO & MOTA (2014).

Geralmente, quando há ácidos graxos diferentes, o triacilglicerol é considerado misto. Sob ação de um catalisador básico (NaOH ou KOH) e na presença de metanol ou etanol, o óleo sofre uma transesterificação formando três moléculas de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos, que constituem o biodiesel em sua

essência, liberando uma molécula de glicerol (PERRY, GREEN & MALONEY, 1997; SILVA, MACK & CONTIERO, 2009; CGEE, 2010; PINTO & MOTA, 2014; CIRIMINNA et al., 2014).

A composição da glicerina obtida da produção de biodiesel, por reação de trasesterificação utilizando metanol, é variável, pode conter de 77% a 90% de glicerol, 5,3% a 14,2% de água, até 1,7% de metanol, além de 4,2% a 5,5% de NaCl ou 0,8% a 6,6% de K_2SO_4 dependendo do catalisador empregado (CHATZIFRAGKOU & PAPANIKOLAOU, 2012). A presença dessas impurezas na glicerina, dependendo da concentração, podem inibir o crescimento microbiano durante os processos fermentativos (GONZÁLEZ-PAJUELO, ANDRADE & VASCONCELOS, 2004; CHATZIFRAGKOU et al., 2010).

No Brasil, em torno de 90% de todo biodiesel é produzido a partir de óleo de soja (PINTO, 2016). A matriz energética brasileira é uma das “mais limpas”, mais de 45% da energia total consumida no país vem recursos renováveis, em comparação com 15% de outros países desenvolvidos. Isso traz uma vantagem estratégica para o país no atual cenário mundial, onde as questões de segurança energética e ambientais são uma preocupação (DA COSTA, PEREIRA & ARANDA, 2010).

O Brasil tem 30 anos de experiência, na produção de biocombustíveis, possui conhecimento tecnológico, incentivo político e áreas agrícolas disponíveis sem qualquer necessidade de transformar em plantações a Região Amazônica ou qualquer outras áreas direcionadas para produção de alimentos (DA COSTA, PEREIRA & ARANDA, 2010). Além das questões globais, os biocombustíveis apresentam vantagens relativas ao meio ambiente local. Por não possuírem enxofre em sua composição, sua queima não provoca emissão de óxidos de enxofre (SO_2 e SO_3), poluentes danosos à qualidade do ar e responsáveis pela chamada chuva ácida (MOTA, SILVA & GONÇALVES, 2009).

Em 2004, o Governo Federal instituiu o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, que instituiu que este biocombustível seja adicionado ao diesel fóssil (MENDES & COSTA, 2010). O biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira, no ano de 2005, pela Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005, com a adição do biodiesel ao diesel mineral consumido no país. Na ocasião o governo federal entendeu ser estratégico para o Brasil promover um combustível renovável que pudesse fomentar o desenvolvimento regional e reduzir a necessidade de barreiras

para importação de diesel (MENDES & COSTA, 2010; DA COSTA, PEREIRA & ARANDA, 2010).

Entre os anos de 2005 e 2007, a mistura de 2% (B2) no diesel comercializado foi autorizada de forma não compulsória (período voluntário). O período de obrigatoriedade começou em janeiro de 2008 com a mistura a 2% (B2), tendo de passar a 5% até 2013. No segundo semestre de 2008, o governo elevou a mistura para 3% (B3), e no segundo semestre de 2009 para 4% (B4). Embora inicialmente a mistura a 5% (B5) estivesse prevista para vigorar somente em 2013, durante o ano de 2009 esse prazo foi revisto, antecipando a meta de B5 para janeiro de 2010 (MENDES & COSTA, 2010).

Se, por um lado, estas ações colocam o Brasil a vanguarda do uso de combustíveis alternativos no planeta, elas também reforçam a necessidade de se encontrar utilizações comerciais para os co-produtos da produção do biodiesel, como a glicerina. A cada 90 m^3 de biodiesel produzidos por transesterificação são gerados, aproximadamente, 10 m^3 de glicerina (GONZALEZ et al., 2004; JOHNSON & TACONI 2007; MOTA, SILVA & GONÇALVES, 2009; CHATZIFRAGKOU & PAPANIKOLAOU, 2012; WANG & YANG, 2013; KUMAR et al. 2015).

Em 2009, MOTA, SILVA & GONÇALVES relataram que, no Brasil, as projeções da produção de glicerina seriam de 100 mil toneladas por ano, com a entrada do B3 em 2008 e cerca de 250 mil toneladas a cada ano, a partir de 2013, com a introdução do B5.

Conforme é possível observar, na tabela 2.1, com os dados publicados pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) em 2015 a produção de biodiesel foi de 24.978.032 bep (1bep = 0,159 m^3), o que equivale a 3.971.507 m^3. O que significa que o excedente de glicerina gerado em 2015 foi de 441.279 m^3 (ANP, 2016).

Atualmente existem 53 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no Brasil, o que corresponde a uma capacidade total autorizada de 20,4 milhões de litros por dia. O mapa de distribuição dessas plantas pode ser observado na figura 2.3 (ANP, 2016).

Há uma nova planta de biodiesel autorizada para construção em Estrela/RS e 1 planta de biodiesel autorizada para aumento da capacidade de produção em Palmeiras de Goiás/GO. Com a finalização das obras e posterior autorização para operação, a capacidade total de produção de biodiesel autorizada poderá ser

aumentada em 805 m^3/dia, que representa um acréscimo de 4% na capacidade atual (ANP, 2016).

Tabela 2.1: Produção brasileira de biodiesel de 2011 a 2015 B100 em bep. Fonte: ANP, 2016.

Período	2011	2012	2013	2014	2015
Janeiro	1.182.061	1.224.432	1.436.949	1.555.647	2.027.203
Fevereiro	1.121.513	1.361.467	1.305.203	1.525.913	1.926.003
Março	1.481.100	1.401.211	1.463.893	1.724.546	2.047.158
Abril	1.271.218	1.156.970	1.608.781	1.606.456	2.058.794
Maio	1.398.750	1.351.404	1.560.205	1.538.582	2.149.668
Junho	1.469.097	1.363.312	1.499.982	1.595.626	2.043.943
Julho	1.585.347	1.461.279	1.653.695	1.922.050	2.163.899
Agosto	1.572.895	1.614.079	1.570.841	1.995.392	2.182.576
Setembro	1.484.315	1.600.227	1.603.215	1.983.546	2.095.983
Outubro	1.509.143	1.594.984	1.763.581	2.040.247	2.278.547
Novembro	1.504.726	1.556.314	1.682.273	2.008.679	2.059.657
Dezembro	1.375.824	1.554.037	1.359.927	2.213.816	1.944.600
Total do Ano	16.955.989	17.239.715	18.508.546	21.710.500	24.978.032

O Plenário da Câmara aprovou em março de 2016 o Projeto de Lei 3834/15, do Senado, que aumenta o percentual de biodiesel adicionado ao diesel vendido ao consumidor final. Até então, eram 7% de biodiesel ao diesel. Pelo novo projeto, esse percentual será de 8% até um ano após a edição da lei, e chegará a 10% passados 36 meses de vigor da lei. A proposta ainda vai à sanção presidencial (CAMARA NACIONAL, 2016; UBRABIO, 2016).

O texto aprovado permite ainda que o percentual chegue a 15% se testes e ensaios em motores validarem a utilização da mistura e desde que se tenha o aval do Conselho Nacional de Política Energética. Esse Conselho também poderá autorizar que seja adicionado ainda mais biodiesel, de maneira voluntária, no combustível para transporte público, navegação interior, equipamentos de extração mineral, geração de energia elétrica, tratores e demais aparelhos agrícolas (CAMARA NACIONAL, 2016; UBRABIO, 2016).

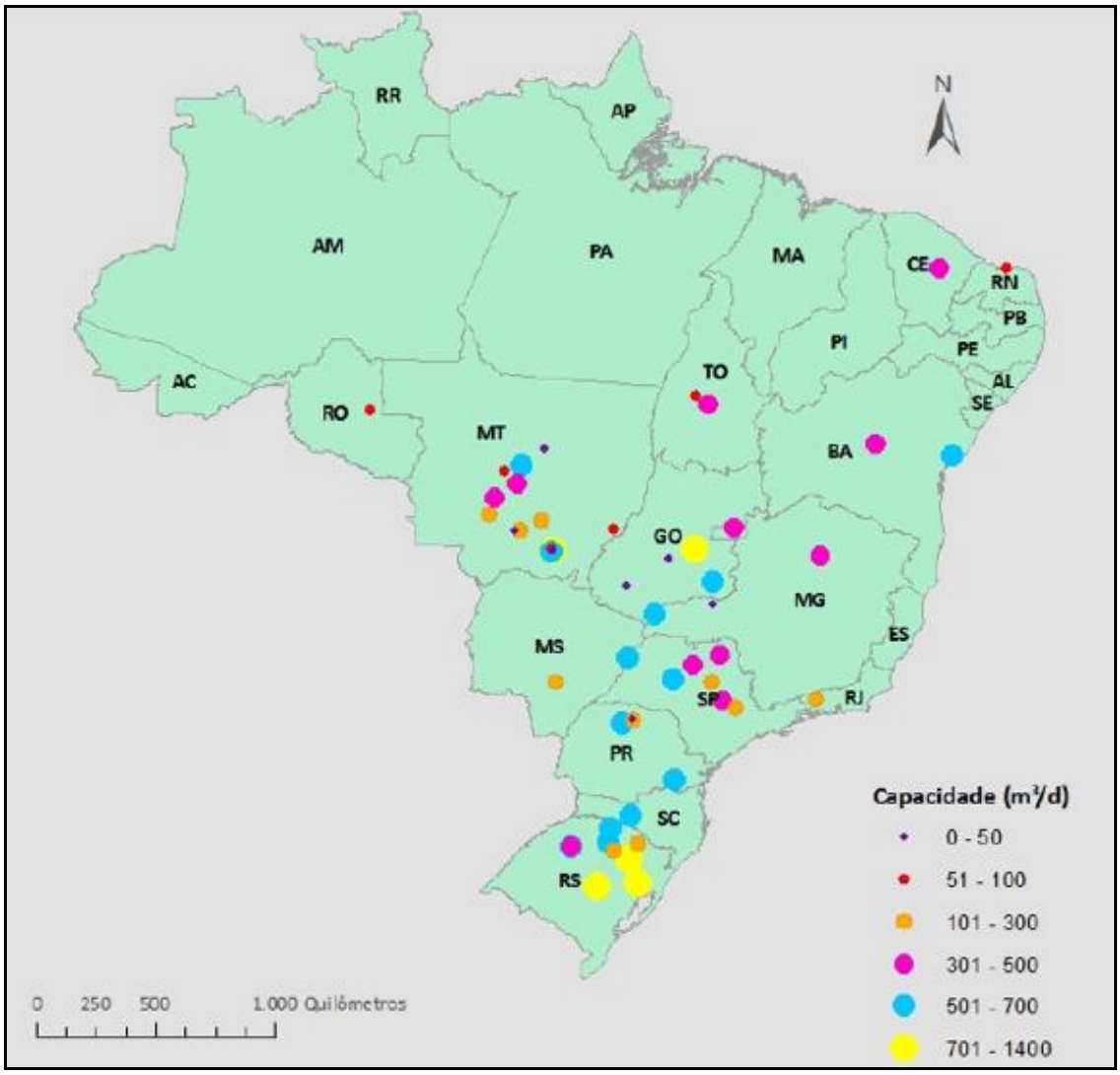

Figura 2.3: Mapa de plantas de biodiesel autorizadas por capacidade de produção. Fonte: PINTO, 2016.

A produção global de glicerina de biodiesel passou de 200 mil toneladas em 2003 para 600 mil toneladas em 2006, progredindo para mais de 2 milhões de toneladas em 2011 e 2012 (CIRIMINNA et al. 2014). A produção de biodiesel vem crescendo não só no Brasil mas em todo o mundo. De acordo com o Departamento de Informações sobre Energia dos EUA, a União Europeia produziu 111 milhões de litros de biodiesel em maio de 2013 (SAMUL, LEJA & GRAJEK, 2014).

Estudos na Europa, com o biodiesel produzido de canola, mostram que o uso do biodiesel reduz as emissões de gases de efeito estufa entre 40-60%. O programa de biodiesel da União Européia direciona-se para a substituição progressiva do diesel usado para transportes pelo biodiesel, de 2% em 2005, 5,75% em 2010 e 20% em 2020 (NAE, 2005). Nos EUA, de acordo com a *Environmental Protection*

Agency (EPA), a substituição de diesel por biodiesel leva a redução das emissões de gases de efeito estufa em mais de 50% (BIODIESEL MAGAZINE, 2016).

O governo dos EUA promulgou em 2007 uma lei, para defender o desenvolvimento de energias alternativas, a *Energy Independence and Security Act* (EISA). De acordo com o mandato previsto nesta lei o consumo anual dos diferentes biocombustíveis deve chegar a 36 bilhões de galões até 2022 (Figura 2.4), o que corresponde a 35 bilhões de galões de biocombustíveis e 1 bilhão de litros de biodiesel (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011).

Na figura 2.4, são considerados: (a) biocombustíveis convencionais quaisquer biocombustíveis, incluindo o etanol produzido a partir de milho; (b) biodiesel, o diesel produzido a partir de gordura animal e do óleo de soja e outros vegetais; (c) biocombustíveis avançados, os biocombustíveis celulósicos, biodiesel ou outros biocombustíveis feitos a partir de açúcar, amido ou um outro derivado do milho; e (d) biocombustíveis celulósicos, os combustíveis derivados de das partes estruturais das plantas (celulose, hemicelulose e lignina) e seus resíduos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011).

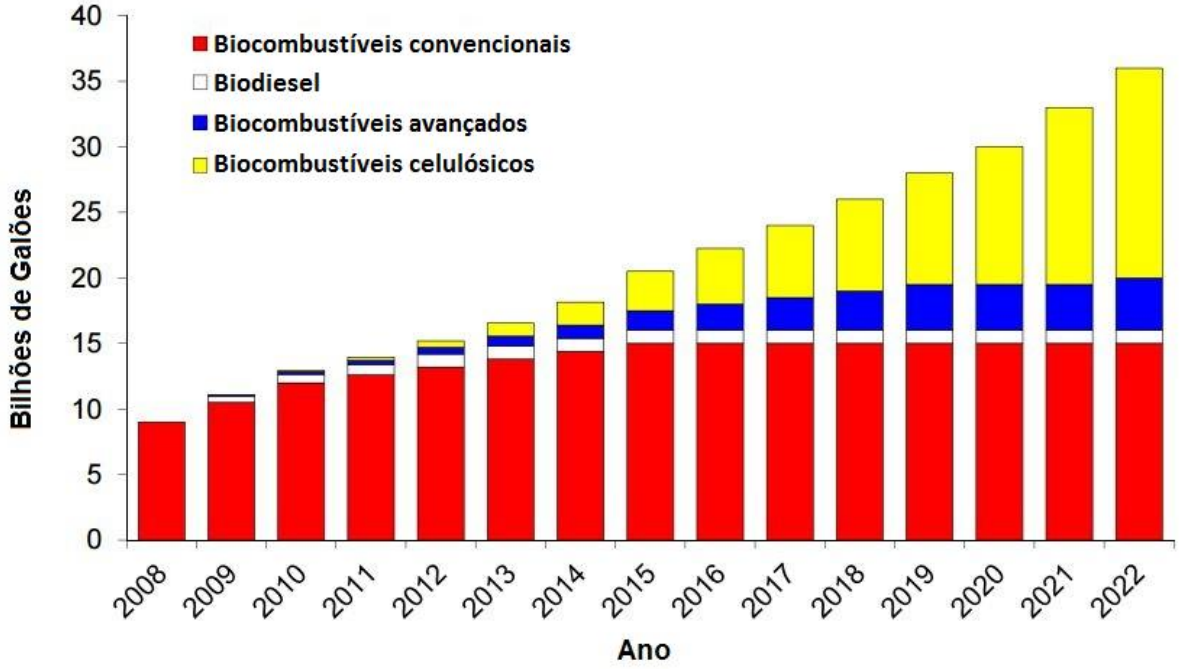

Figura 2.4: O consumo anual de biocombustíveis nos EUA estimado para o período de 2008 a 2022. Fonte: NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2011).

Os dados da previsão, visualizados na figura 2.4, concordam com os reais, pois a produção biodiesel nos Estados Unidos chegou a 1,27 bilhões de galões em 2014 e 2015, de acordo com a EPA (2016). Além disso, as importações aumentaram de 510 milhões de litros em 2014 para um número estimado de 670 milhões de litros em 2015, um salto de mais de 25% (BIODIESEL MAGAZINE, 2016).

2.1.2 Mercado, Produtos e Aplicações de Glicerol

As aplicações de glicerol são muito numerosas, mais de 1500 usos, nas indústrias de cosméticos, tintas, automóveis, alimentos, fumo, farmacêutica, papel e celulose, indústrias de couro e têxteis (MOTA, SILVA & GONÇALVES, 2009; SAMUL, LEJA & GRAJEK, 2014). Não se pode esquecer que quantidades apreciáveis de glicerol são produzidas na fermentação alcoólica, como produto de destilação do meio fermentado. A figura 2.5 mostra uma distribuição percentual de aplicações mais usuais da glicerol de acordo com MOTA, SILVA & GONÇALVES (2009), JOHNSON & TACONI (2007) e PAGLIARO et al. (2007). A classificação “Outros” corresponde a materiais de hidráulica, fluidos anticongelantes e anti-chama, além de produtos termoquímicos.

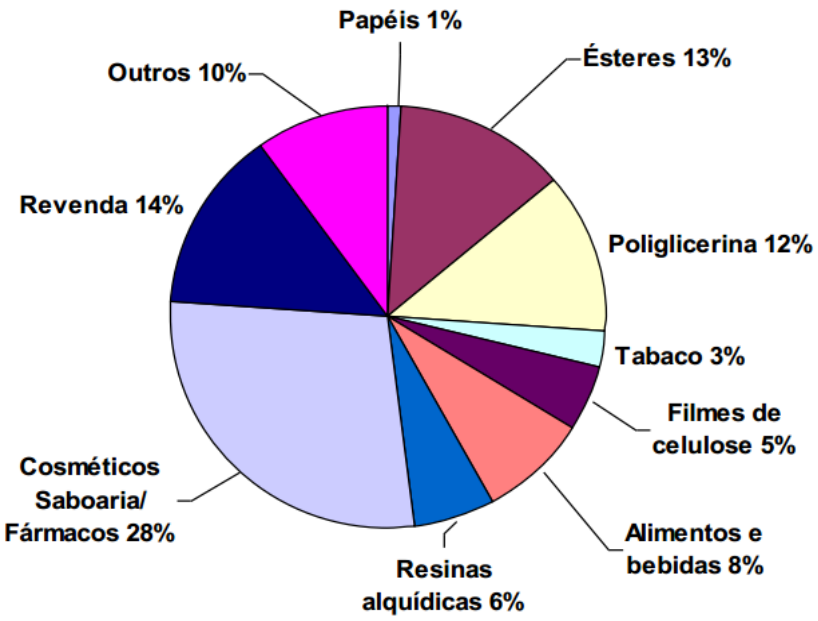

Figura 2.5: Distribuição percentual das principais aplicações de glicerol. Fonte: MOTA, SILVA & GONÇALVES (2009).

O glicerol é atualmente um dos ingredientes mais utilizados na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e anti-sépticos. Por ser não-tóxico, não-irritante, sem cheiro e sabor, o glicerol tem sido aplicado como emoliente e umectante em pastas de dente, cremes, loções, desodorantes, batons e maquiagens (NAE, 2005; AYOUB & ABDULLAH, 2012).

Aplicado também no processamento de fumo, o glicerol torna as fibras do fumo mais resistentes, é empregado na composição dos filtros de cigarros e como veículo de aromas. É capaz de amaciar e aumentar a flexibilidade das fibras têxteis e pode fazer parte da formulação de lubrificante de máquinas processadoras de alimentos, fabricação de tintas, resinas e dinamite (AYOUB & ABDULLAH, 2012).

O glicerol pode ainda ser usado como umectante e para conservar bebidas e alimentos tais como refrigerantes, balas, bolos, molhos, pastas de queijo e carne, e ração animal seca. Atualmente todas estas aplicações utilizam, principalmente, o sorbitol. É possível que o glicerol venha a tomar parte dos mercados de sorbitol, se os preços caírem nos próximos anos, em função da superprodução associada ao biodiesel. Do ponto de vista tecnológico, existem poucas aplicações para as quais a glicerina não poderia substituir o sorbitol, surgindo assim uma nova demanda de glicerol estimada em 300 mil toneladas por ano (NAE, 2005; AYOUB & ABDULLAH, 2012).

De acordo com CIRIMINNA et al. (2014), 16% da produção global de glicerol vai para consumo animal, adicionado nas rações para ruminantes. A glicerina também é adicionado na composição de cimentos para conferir maior resistência. Porém, há aplicações que exigem maior grau de pureza, como na indústria farmacêutica, o que pode tornar sua utilização pouco competitiva economicamente (CIRIMINNA et al. 2014; LEE et al. 2015).

A purificação da glicerina se dá por processos complexos e onerosos, necessários para que esse insumo alcance as exigências em grau de pureza necessária para utilização em cosméticos, produtos químicos, alimentícios e farmacêuticos. A tecnologia exigida para a purificação, além de ter custo elevado, é dominada por poucas empresas no Brasil (DINIZ, 2005). Em 2011, POSADA, HIGUITA & CARDONA estimaram o custo de purificação de glicerol (até 98% de pureza em peso) utilizando a combinação dos processos de neutralização,

centrifugação, evaporação e coluna de destilação, e concluíram que o menor custo para a purificação de glicerol foi de U$ 0,15 por quilo.

A purificação da glicerina, por refino, leva à obtenção de três classes de glicerol com diferentes graus de pureza (CIRIMINNA et al. 2014; LEE et al. 2015): (i) técnico: 95,5% de glicerol, utilizado como *building block* na indústria química, (ii) UPS: 96,0% de glicerol, utilizado em produtos alimentícios e farmacêuticos e (iii) Kosher: 99,5% de glicerol, utilizado em alimentos Kosher.

Já foram propostas algumas transformações químicas para converter a glicerina em insumo da cadeia petroquímica (plásticos) e em aditivos para o setor de combustíveis. Entre as principais, como pode-se observar na figura 2.6, estão:

(i) acetais, obtidos a partir de sua reação com aldeídos e cetonas, que podem ser usados na fabricação de aditivos, surfactantes e solventes;

(ii) éteres, obtidos a partir de eterificação, que fornece produtos de menor volatilidade e viscosidade, usados como aditivos e solventes,

(iii) mono e diésteres que são encontrados em gorduras que foram parcialmente hidrolisadas e são bastante utilizados como surfactantes;

(iv) monoacilgliceróis, compostos que estão sendo objeto de novos trabalhos de obtenção seletiva; para produção de surfactantes.

(v) acroleína e ácido acrílico, obtidos por desidratação, e que são, respectivamente, intermediário e matéria prima na produção de polímeros super absorventes e na produção de metionina para a indústria alimentícia;

(vi) propeno, obtido por hidrogenólise que é um monômero para a fabricação do polipropileno;

(vii) diversos compostos obtidos por oxidação, entre eles aqueles usados na fabricação de polímeros. Há várias outras transformações catalíticas, especialmente para produção de gás de síntese (MOTA, SILVA & GONÇALVES, 2009; CGEE, 2010; AYOUB & ABDULLAH, 2012).

A glicerina não só é barata e abundante, mas o seu maior grau de redução que de açúcares oferece a oportunidade de obter, via química e/ou fermentativa, produtos químicos reduzidos, tais como: ácido succínico, etanol, xilitol, ácido propiônico, ácido cítrico, ácido lático, dihidroxiacetona, hidrogênio, dicloro-2-propanol, acroleína e 1,3-propanodiol (PAGLIARO et al., 2007; FAN, BURTON & ZHOU, 2010; CGEE, 2010; LI, LESNIK & LIU, 2013; SAMUL, LEJA & GRAJEK, 2014; LEE et al. 2015). A conversão de glicerol em 1,3-propanodiol é um mercado

promissor que poderá crescer em função de uma maior oferta de glicerol, podendo se tornar uma nova plataforma química de poliésteres (FAN, BURTON & ZHOU, 2010).

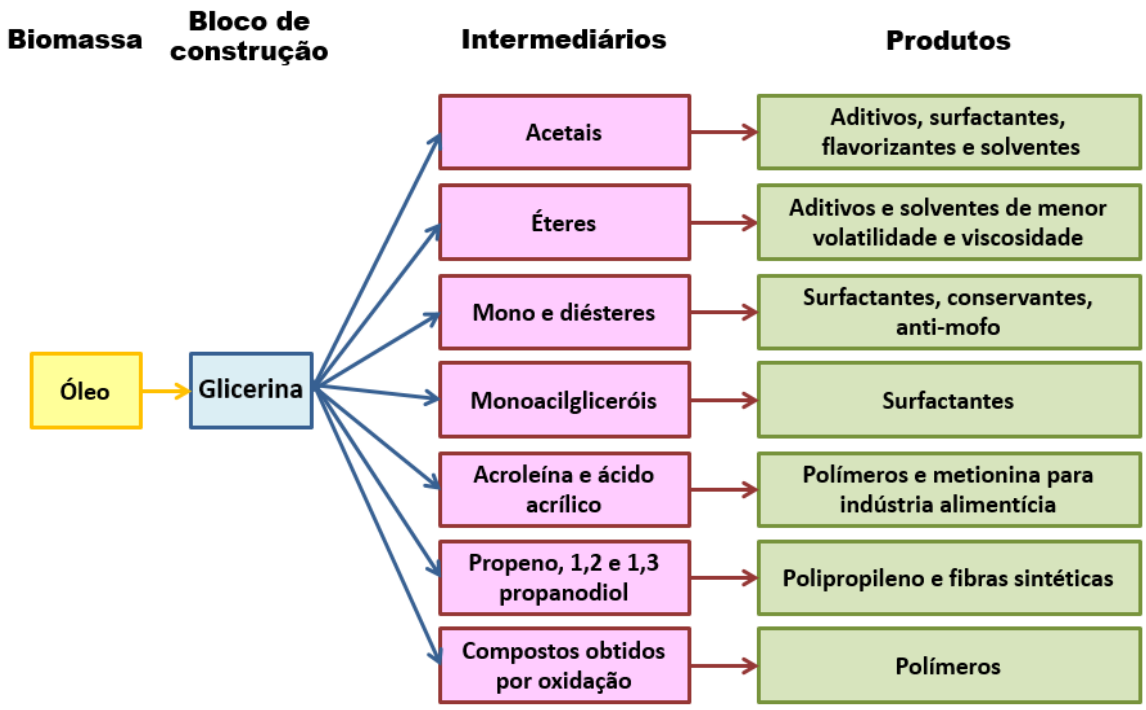

Figura 2.6: Glicerina como *building block* para obtenção de produtos químicos. Fonte: Adaptado MOTA, SILVA & GONÇALVES (2009) e AYOUB & ABDULLAH (2012).

A glicerina é um substrato com grande potencial para obtenção de uma série de metabólitos de interesse da indústria química (AMARAL et al., 2009). CLAUDE, HEMIN & HILL, (2000) relataram que o emprego de glicerol como substrato em fermentações pode ser competitivo se o seu preço for de até U$ 0,30 por quilo.

De acordo com AYOUB & ABDULLAH (2012), o preço global do glicerol pode variar de U$ 1,10 a U$ 3,30 por quilo, enquanto que o preço da glicerina pode variar de U$ 0,04 a U$ 0,33 por quilo. KUMAR et al. (2015) relataram que o preço de mercado do glicerol é de U$ 0,35 por quilo. De acordo com dados do sistema ALICEWEB, no Brasil, em 2015 o preço de exportação de glicerol (NCM: 29054500) foi de U$ FOB 0,46 por quilo enquanto que o da glicerina (NCM: 15200010) foi de U$ FOB 0,21 por quilo (SISTEMA ALICEWEB, 2016).

2.2 1,3-PROPANODIOL

2.2.1 Obtenção e Composição de 1,3-propanodiol

O 1,3-propanodiol (trimetileno glicol ou polipropileno glicol - $C_3H_8O_2$) é um composto alifático linear, líquido, incolor, inodoro, inócuo, miscível em água, álcool e éter, de baixa toxicidade e não inflamável. Este intermediário químico foi um dos primeiros produtos da fermentação microbiana conhecidos, descoberto em 1881 pelo químico Austríaco August Freund, em cultura mista de fermentação por *Clostridium pasteurianum* (SILVA et al., 2014).

Historicamente, é um produto de alto preço na indústria química, que apresenta muitas propriedades desejáveis como, por exemplo, na participação de reações de policondensação (BIEBL et al., 1999; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012). Produtos obtidos pela polimerização de 1,3-propanodiol são caracterizados por uma boa biodegrabilidade, uma melhor especificidade e maior segurança industrial, além de serem mais baratos do que os produzidos a partir de 1,2-propanodiol, etilenoglicol ou butanodiol (SILVA, MACK & CONTIERO, 2009).

No entanto, até meados da década de 1990, o custo elevado e a limitada disponibilidade de 1,3-propanodiol restringiam sua aplicação como solvente e na produção de dioxanos. Esse cenário mudou (1995-1998) com o início da comercialização de poliéster a base de PTT. Este co-poliéster é um produto da condensação de 1,3-propanodiol e ácido tereftálico. Utilizado, principalmente, na fabricação de tapetes (CorterraW, Shell), fibras especiais (SoronaW, DuPont), monofilamentos e filmes (PAGLIARO et al., 2007; LI, LESNIK & LIU, 2013), podendo também ser usado como termoplástico para diversas áreas da engenharia e revestimentos.

Atualmente, a obtenção industrial de 1,3-propanodiol acontece por duas rotas químicas. A rota da empresa DuPont se inicia com a hidratação da acroleína a 3-HPA, seguida de uma segunda etapa de hidrogenação para obtenção do 1,3-propanodiol. A rota da empresa Shell utiliza o método de hidroformilação de etileno convertendo-o a óxido de 3-hidroxipropanal e este posteriormente extraído e hidrogenado para a produção de 1,3-propanodiol. No entanto, existem vários inconvenientes destes métodos químicos como: necessidade de alta pressão e temperatura, uso de catalisadores com custo elevado, formação de intermediários

tóxicos, utilizam materiais não renováveis, baixo rendimento e complexidade (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012; SAXENA et al., 2009; JOHNSON & TACONI, 2007; SILVA et al., 2014).

Pela rota química, a hidrogenólise de uma solução aquosa de glicerol a 180ºC e 80 bar, na presença de catalisadores de cobre, paládio ou rubídio, suportados em óxido de zinco (ZnO), carvão ativo ou óxido de alumínio (Al_2O_3), é capaz de produzir 1,2-propanodiol e 1,3-propanodiol com boa seletividade. Para uma boa seletividade ao 1,3-propanodiol, os estudos com o catalisador de carvão do ródio (Rh/C), em sulfolana como solvente apresentaram os melhores resultados (PINTO & MOTA, 2014).

Há um interesse mundial na produção deste composto por via biotecnológica, demostrado pelos esforços de empresas como a DuPont e Genencor. A rota bioquímica para produção de 1,3-propanodiol é particularmente atraente, uma vez que usa substrato renovável e o processo fermentativo ocorre em condição normal de pressão, evitando a geração de subprodutos tóxicos (SUN et al. 2003; MA et al., 2010; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

Não há microrganismos selvagens produtores de 1,3-propanodiol diretamente a partir de açúcares. As tentativas em utilizar açúcares como substratos são feitas por meio de consórcios microbianos ou de microrganismos geneticamente modificados para a conversão de açúcar em glicerol e então em 1,3-propanodiol (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

Uma das abordagens para incrementar a produção microbiana de 1,3-propanodiol a partir de glicerol é a otimização dos processos de conversão, por diferentes estratégias operacionais. Muitas espécies dos gêneros *Klebsiella* (SILVA, LIMA & CONTIERO, 2015), *Citrobacter* (MAERVOET et al., 2016), *Clostridium* (POWAŁOWSKA, 2015; WISCHRAL et al. 2015), *Lactobacillus* (VIVEK et al., 2016), *Enterobacter* (PRZYSTAŁOWSKA et al., 2015) e a espécie *Shimwellia blattae* (RODRIGUEZ et al., 2016) são relatadas como potenciais bioconversoras de glicerol em 1,3-propanodiol. Destas, *Enterobacter* spp. e *Clostridium* spp. parecem ser as melhores opções em termos de rendimento e produtividade (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

No entanto, algumas espécies como *K. pneumoniae* são patogênicas, necessitando precauções especiais de segurança, além de produzirem grandes quantidades de 2,3-butanodiol, etanol e ácido lático, reduzindo o rendimento de 1,3-

propanodiol e dificultando sua separação e purificação. Outras espécies, como, por exemplo, *C. butyricum* são difíceis de manipular geneticamente, devido à falta de ferramentas específicas de clonagem, além de produzirem grandes quantidades de ácidos butírico e acético, juntamente com o 1,3-propanodiol (CELIŃSKA 2010; SABRA, GROEGER & ZENG, 2015).

Dentre as bactérias do gênero *Clostridium*, existem espécies que parecem ser alternativas interessantes pelo seu potencial para produzir 1,3-propanodiol a partir de glicerol (KUBIAK et al., 2012), são elas: *C. diolis* (OTTE et al., 2009), *C. saccharobutylicum* (GUNGORMUSLER, GONEN & AZBAR, 2010a), *C. pasteurianum* (JENSEN et al., 2012) e *C. beijerinckii* (GUNGORMUSLER, GONEN & AZBAR, 2011a).

A desvantagem da espécie *C. pasteurianum* é a formação conjunta de butanol, etanol e acetona, o que dificulta os processos a jusante para remoção do 1,3-propanodiol, além de diminuir o rendimento pelo desvio de carbono. Já a espécie *C. beijerinckii,* possui a habilidade de consumir várias fontes de carbono (QURESHI et al., 2008; COMWIEN et al. 2015).

A espécie *C. beijerinckii* é de particular interesse devido a sua capacidade para produzir n-butanol como produto principal, quando a glicose é utilizada como fonte de carbono (LU, DONG & YANG, 2013), e 1,3-propanodiol como produto principal a partir de glicerol, como, por exemplo, pelas linhagens NRRL B-593 (GUNGORMUSLER, GONEN & AZBAR, 2011a) e DSM 791 (WISCHRAL et al., 2015). Porém, sua robustez metabólica não tem sido explorada com relação ao seu potencial de aplicação industrial.

2.2.2 Mercado, Produtos e Aplicações de 1,3-propanodiol

Buscam-se novas aplicações para os grandes volumes de glicerina disponíveis no mundo, dentre elas, a produção de intermediários para plásticos, como o 1,3-propanodiol (NAE, 2005). Atualmente, a maior parte do 1,3-propanodiol é produzido pela empresa DuPont Tate & Lyle e é destinado à produção de PTT, visando principalmente a indústria de tapetes dos EUA (LIU, WANG & ZHANG, 2013).

Na figura 2.7, pode-se observar o diagrama de blocos de aplicações de 1,3-propanodiol obtido a partir de glicerol por rota biotecnológica de acordo com *United*

States Department of Energy (2004). Além dos produtos e usos citados na figura 2.7, o 1,3-propanodiol pode ser utilizado como intermediário para a síntese orgânica de vários tipos de medicamentos (vitamina H e drogas imunossupressoras), repelentes de insetos e fragrâncias. Devido à diversidade de usos o 1,3-propanodiol, produzido a partir de glicerol por rota biotecnológica, não só oferece vantagens únicas de desempenho, mas também pode reduzir a pegada ambiental de seus produtos por ser de origem biodegradável (CAROLE, PELLEGRINO & PASTER, 2004; MUSKA & ALLES, 2005; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

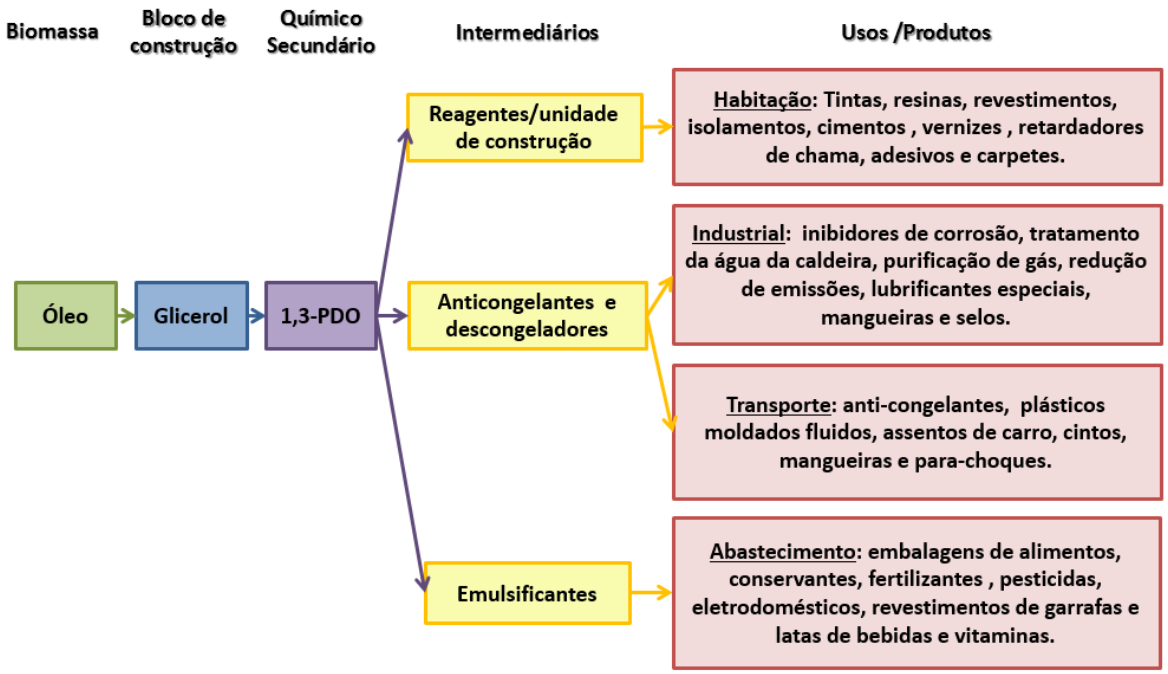

Figura 2.7: 1,3-propanodiol, obtido a partir de glicerol por rota biotecnológica, como *building block* em diferentes segmentos industriais. Fonte: Adaptado *United States Department of Energy* (2004).

Tecidos produzidos a partir de PTT apresentam baixa eletricidade estática, solidez da cor, boa recuperação do estiramento e resistência a manchas. O uso de 1,3-propanodiol em poliuretano termoplásticos (TPU) também pode levar a uma estabilidade térmica e hidrolítica, bem como estabilidade dimensional. O 1,3-propanodiol pode ainda ser utilizado para modificar o poliéster, o que é desejável para a produção de revestimentos em pó, melhorando a flexibilidade sem prejudicar outras propriedades chave, como a estabilidade ao tempo em formulações de fluidos refrigerantes de motores, permitindo maior estabilidade térmica, menor corrosão e

toxicidade, quando comparado aos agentes de refrigeração à base de etilenoglicol (CAROLE, PELLEGRINO & PASTER, 2004; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012; JOHNSON & TACONI, 2007). As propriedades de solventes, adesivos, laminados, resinas, detergentes e cosméticos, também podem ser melhoradas pela adição de 1,3-propanodiol (ZENG & BIEBL, 2002).

A demanda de 1,3-propanodiol está em rápido crescimento, novos produtos estão sendo desenvolvidos a partir de polímeros sintetizados a partir dele, oferecendo uma oportunidade significativa para o desenvolvimento de novos processos a custos competitivos para a produção de 1,3-propanodiol, permitindo assim sua entrada no mercado de bioprodutos (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

O mercado mundial de 1,3-propanodiol deverá crescer de U$ 310,5 milhões em 2014 para U$ 621,2 milhões até 2021, a uma taxa composta de crescimento anual de 10,4%. As principais empresas do mercado de 1,3-propanodiol incluem DuPont Tate & Lyle Bio Products Company, LLC (EUA), *Metabolic Explorer* SA (França), Zhangjiagang Glória Biomaterial Co. Ltda (China) e *Zouping Mingxing Chemical* Co. Ltda (China) (MARKETS&MARKETS, 2016).

A transição do processo petroquímico para o processo biotecnológico é planejada pela DuPont para um futuro próximo, com o mesmo nível de preços do *nylon* 6, projetando um mercado potencial de 230 mil toneladas para o PTT renovável em 2020 (BASTOS, 2007; CAROLE, PELLEGRINO & PASTER, 2004).

A rota bioquímica para produção de 1,3-propanodiol, a partir da conversão de açúcares (glicose do milho), com baixo custo, foi recentemente desenvolvida por meio da parceria entre as empresas Genencor International e a DuPont. Neste caso, a glicose é convertida em glicerol e, depois, em 1,3-propanodiol por *E. coli* geneticamente modificada (que contém todas as enzimas requeridas para a conversão dos açúcares). Depois, o produto é separado, purificado e polimerizado. O PTT, resultante deste processo, pode ser usado na indústria de vestuário, tapeçaria e resinas especiais, apresentando propriedades superiores ao *nylon* e ao PET, nas aplicações em fibras, e ao PET (e ao PBT, outro poliéster alifático-aromático), quando usado como resina (CAROLE, PELLEGRINO & PASTER, 2004; LIU, WANG & ZHANG, 2013).

As empresas *Explorer* (França) e *SK Chemicals* (Coréia do Sul) anunciaram recentemente um acordo comum para fabricar 1,3-propanodiol a partir de glicerina.

Plantas para produção biotecnológica de 1,3-propanodiol a partir de glicerol também foram construídas na China. No entanto, não está claro se essas plantas estão em operação (SABRA, GROEGER & ZENG, 2015).

Por meio da tabela 2.2 é possível observar os dados de importação de 1,3-propanodiol no Brasil, disponibilizados pelo sistema ALICEWEB, para o período entre 2006 e 2015. De acordo com os dados, houve exportação de 1,3-propanodiol apenas em 2010, totalizando US$ FOB 1.0961,00 e 3.000 kg (SISTEMA ALICEWEB, 2016). Há, portanto, um déficit na balança comercial com relação a esse produto, pois houve importação na maioria dos anos, de 2006 a 2015, e exportação apenas em 2010.

Tabela 2.2: Dados de importação de 1,3-propanodiol no Brasil, no período de 2006 a 2015. Fonte: SISTEMA ALICEWEB, 2016.

Ano	Importação (US$ FOB)	Quantidade (kg)	Preço (US$ FOB/kg)
2006	71	1	71,00
2007	0	0	0,00
2008	49.054	23.502	2,09
2009	0	0	0,00
2010	1.714	401	4,27
2011	23.083	3.613	6,39
2012	222.891	5.256	42,41
2013	34.058	3.041	11,20
2014	6.557	599	10,95
2015	60	1	60,00

Esses dados concordam com os estudos prévios, que indicam a necessidade de se desenvolver a indústria de produção de 1,3-propanodiol de forma a atender a demanda nacional. A partir dos dados de importação, apresentados na tabela 2.2, é possível também obter o perfil do comportamento do preço de importação de 1,3-propanodiol no período de 2006 a 2015, em US$ FOB/kg. Em 2006, ano em que houve a menor importação em termos de quantidade (kg), o preço de importação foi de US$ FOB 71,00/kg.

2.3 BACTÉRIAS *Clostridium* spp.

2.3.1 Origem e Morfologia

Classicamente são conhecidos vários gêneros de bactérias Gram-positivas formadoras de endoesporos, que se diferenciam pela morfologia celular, forma e disposição dos esporos, relação com o oxigênio e metabolismo energético. As bactérias *Clostridium* spp., além de Gram-positivas, são classificadas como anaeróbias e fermentadoras (HATHEWAY, 1990; HEAP et al., 2009; MORANDI et al. 2015).

O fato de possuírem capacidade de produzir um esporo de resistência, é uma grande vantagem ecológica em um meio como o solo, habitat natural de *Clostridium* spp., onde as características físicas e químicas variam constantemente. As formas esporuladas podem permanecer viáveis por tempos muito longos, bastando que sejam estabelecidas as condições favoráveis para que retornem a atividade (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

Clostridium spp. são isoladas de fontes naturais como leguminosas, raízes de hortaliças, de trigo e de centeio, associadas à parte vital e não com material em decomposição (BIEBL et al., 1992; POWAŁOWSKA, 2015). Essa propriedade facilita a sua conservação nos laboratórios para utilizar na preparação de inóculos. Especialistas afirmam que os esporos conservados nesses substratos podem estar viáveis mesmo após trinta anos (LIMA et al., 2001).

É conhecida uma grande diversidade de mecanismos produtores de energia em *Clostridium* spp.. De fato, a separação do gênero em subgrupos se baseia primariamente nas propriedades e natureza do substrato que fermentam (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004). Os clostrídios são muito sensíveis à presença de organismos estranhos, que competem por nutrientes e espaço. Por isso, os meios são submetidos à esterilização após o preparo, pois é preciso garantir condições que permitam seu desenvolvimento como organismo único no processo (LIMA et al., 2001).

2.3.2 Metabolismo do Consumo de Glicerol por *Clostridium* spp.

Desde que foi observada pela primeira vez no século 19, a rota metabólica

para a conversão de glicerol em 1,3-propanodiol vem sendo foco de estudos nas áreas de química, enzimologia, genética, fisiologia microbiana e engenharia bioquímica (ZENG & BIEBL, 2002).

Os clostrídios são anaeróbios por excelência e severamente afetados pela presença de oxigênio, embora não sejam eliminados quando expostos por curtos períodos de tempo (até 6 horas), por isso, os cultivos devem ser conduzidos em ambientes anaeróbios (LIMA et al., 2001).

O metabolismo das espécies solventogênicas de *Clostridium*, como por exemplo, *C. acetobutylicum* e *C. beijerinckii*, é caracterizado por uma série de reações bioquímicas em que polissacarídeos, hexoses e pentoses, são convertidos a piruvato, adenosina trifosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). Essas espécies utilizam o piruvato na fase acidogênica para a produção de intermediários, como o acetato e o butirato, produzidos na fase exponencial do crescimento e pode reassimilá-los ao final da fase exponencial, levando à produção de acetona e butanol (VASCONCELOS, GIRBAL & SOUCAILLE, 1994; SAINT-AMANS et al. 2001; NAKAMURA & WHITEDY, 2003; QURESHI & EZEJI, 2008).

De maneira geral, *Clostridium* spp. apresentam atividade em valores de pH entre 4,7 a 8,0, contudo, apresentam melhor atividade em meios ácidos. Não há inibição total, mas a produção de solventes pode ser prejudicada nos valores limites. Os efeitos tóxicos parecem ser devidos a uma concentração crítica de íons de hidrogênio no interior das células e não propriamente ao pH do meio (LIMA et al., 2001).

As etapas bioquímicas que levam à síntese de ácido butírico e butanol a partir de açúcares são bem conhecidas. A glicose se converte a piruvato em então a acetil-CoA. Em seguida, utilizando o NADH derivado da rota glicolítica, o acetil-CoA é reduzido a produtos de fermentação. A proporção dos diferentes produtos será influenciada pela duração e condições da fermentação (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

A queda do pH no decorrer da fermentação é causada pela formação de ácidos, e este pode voltar a se elevar com a transformação dos ácidos em solventes, sendo que ao final da fermentação o pH retorna ao valor inicial. A temperatura é um importante fator a ser considerado na produção, devendo ser regulada de acordo com a espécie de microrganismo utilizado no processo fermentativo (LIMA et al., 2001).

Na figura 2.8, é representada a rota metabólica bacteriana para obtenção de ácidos orgânicos e solventes a partir de glicerol bem como a indicação das enzimas e os genes chave. É possível observar duas rotas metabólicas uma que resulta na produção de 1,3-propanodiol pela reação de desidratação (via redutiva, destacada em verde) e a outra que resulta na produção de CO_2, H_2, ácidos, butanol, acetona e etanol (via oxidativa, destacada em amarelo) (CELIŃSKA, 2010; VENKATARAMANAN et al., 2011; KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012; MAERVOET et al., 2014).

As enzimas chave e os genes envolvidos no metabolismo de glicerol ou glicose por bactérias estão identificadas na rota metabólica apresentada na figura 2.8. Destacadas em vermelho, as enzimas chave para a produção de 1,3-propanodiol, são: dihidroxiacetona quinase (DHAK); glicerol desidrogenase (GDH); glicerol desidratase (GDHt) e 1,3-propanodiol desidrogenase (PDDH) (VENKATARAMANAN et al., 2011; MAERVOET et al., 2011; ZANG et al., 2009).

Os genes responsáveis por cada etapa, destacados em azul, são: acetato quinase (*ack*); álcool descarboxilase (*adc*); álcool desidrogenase (*adhE*); aldeído desidrogenase (*aldh*); butiraldeido desidrogenase (*bah*); butiril-CoA desidrogenase (*bcd*); butanol desidrogenase (*bdh*); 2,3-butanodiol dehydrogenase (*bdhD*); butirato quinase (*buk*); glicerol desidratase (*dhaB*); dihidroxiacetona quinase (*dhaK*); 1,3-propanodiol desidrogenase (*dhaT*); frutose bifosfato aldose (*fba*); gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gap*); glicerol desidrogenase (*gldA*); glucoquinase (*glk*); fosfoglicerato mutase (*gpm*); hidrogenase (*hdg*); lactato desidrogenase (*ldh*); 6-fosfato quinase (*pfk*); piruvato formato liase (*pfl*); fosfoglicose isomerase (*pgi*); fosfoglicerato quinase (*pgK*); piruvato ferredoxina oxidorredutase (*pfo*); fosfotransacetilase (*pta*); fosfotransbutirilase (*ptb*); piruvato quinase (*pyk*); succinato desidrogenase (*sdh*); tiolase (*thl*) e triosefosfato isomerase (*tpi*) (VENKATARAMANAN et al., 2011; MAERVOET et al., 2011; ZHANG et al., 2009).

Estas bactérias utilizam glicerol por meio de duas vias paralelas: redutiva e oxidativa. A via redutiva usa glicerol desidratase (GDHt, *dhaB*) e 1,3-propanodiol desidrogenase (PDDH, *dhaT*) para a desidratação glicerol a 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), seguido por redução de aldeído levando a produção de 1,3-propanodiol, com o poder redutor (NADH) gerado na via oxidativa (SUN et al., 2003; MAERVOET et al., 2011; VENKATARAMANAN et al., 2011).

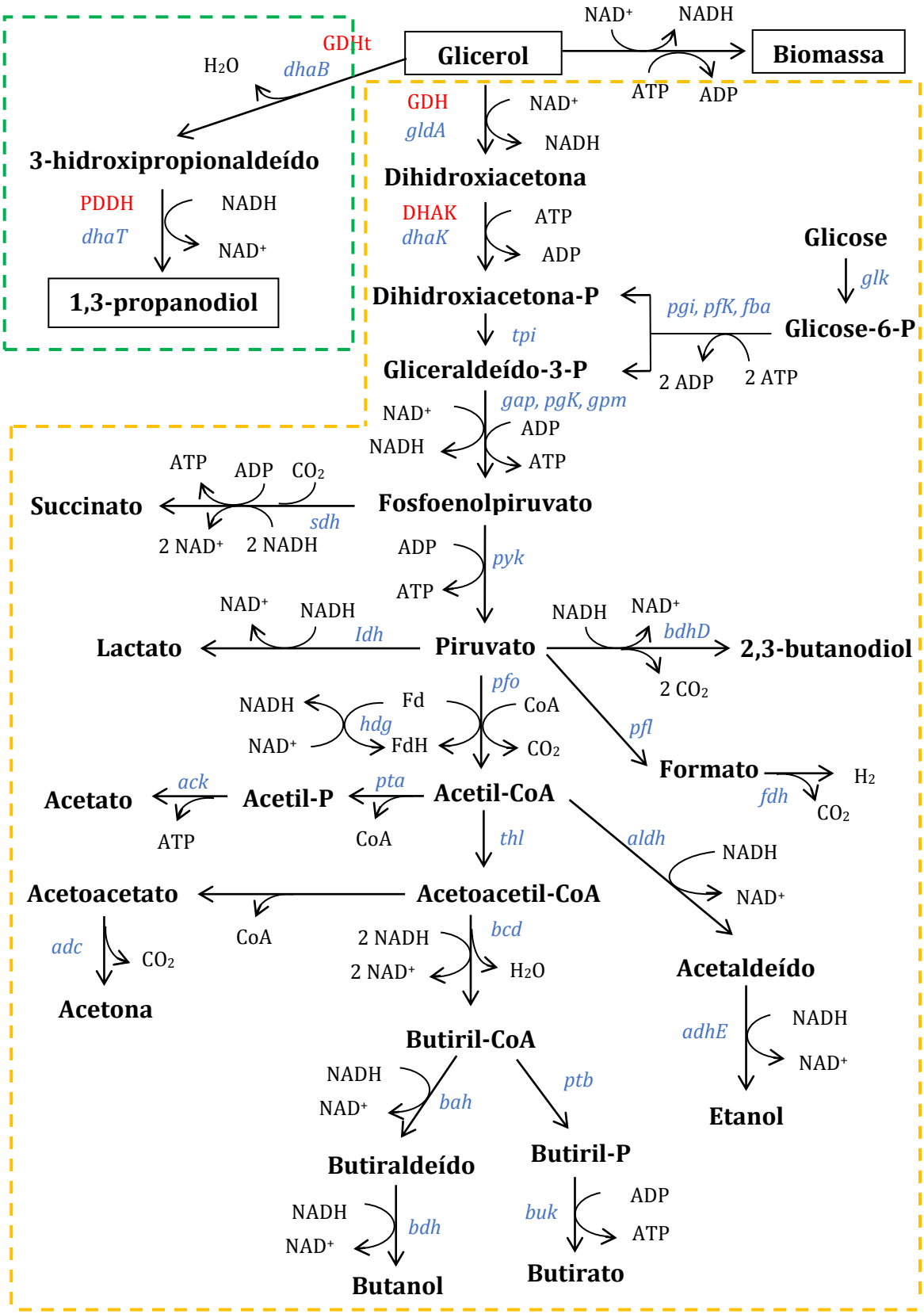

Figura 2.8: Rotas metabólicas para síntese de 1,3-propanodiol, ácidos orgânicos e solventes por bactérias. Destacados em: verde a via redutiva, amarelo a via oxidativa, vermelho as enzimas e azul os genes. Adaptado: ZHANG et al. (2009); VENKATARAMANAN et al. (2011) e MAERVOET et al. (2011).

A glicerol desidrogenase (GDH, *gldA*) e dihidroxiacetona quinase (DHAK, *dhaK*) são utizadas na via oxidativa para produzir fosfoenolpiruvato (PEP), ATP e NADH. PEP é então convertido em piruvato e, em seguida, para diversos ácidos orgânicos (ácido acético, butírico e lático), álcoois (2,3-butanodiol, etanol, butanol e acetona), ácido fórmico, H_2 e CO_2, dependendo da espécie e condições de crescimento (SUN et al., 2003; MAERVOET et al., 2011; VENKATARAMANAN et al., 2011).

De acordo com NAKAMURA & WHITEDY (2003), a glicerol desidratase (GDHt, *dhaB*) é uma enzima B12 dependente, que catalisa a conversão de glicerol a 3-HPA. Como consequência do ciclo catalítico, a coenzima B12 é inativada permanecendo firmemente ligada à desidratase, cessando a catálise. Uma enzima auxiliar, a glicerol desidratase reativase, facilita a dissociação da B12 inativada para formar a glicerol desidratase livre da coenzima B12 (apoenzima). A apoenzima então se religa à coenzima B12 e a conversão de glicerol a 3-HPA recomeça. Múltiplos genes que codificam estas e outras atividades funcionalmente relacionadas, estão agrupados no *regulon dha* (dihidroxiacetona).

Na última década, o *regulon dha* ganhou um grande interesse devido à sua ocorrência natural em organismos que produzem 1,3-propanodiol e por seu papel crucial na produção deste composto a partir de glicerol. Localizado em um cluster no cromossomo, o *regulon dha* é uma unidade genética formada por um grupo de genes que codificam as enzimas responsáveis pelo metabolismo anaeróbio de glicerol: *dhaB*, *dhaT*, *gldA* e *dhaK* (Figura 2.8). Esses genes, já identificados em *Clostridium* spp. e *Klebsiella* spp., atuam de forma coordenada durante o metabolismo de glicerol (SUN et al., 2003). FORAGE & LIN (1982) mostraram que as quatro enzimas do *regulon dha* são expressas coordenadamente e a expressão é induzida por dihidroxiacetona (DHA) ou por glicerol (SUN et al., 2003; GONZALEZ et al., 2005; MAERVOET et al., 2014).

O NADH desempenha um papel central no metabolismo celular dos microrganismos ao funcionar como cofator em mais de 300 reações (BERRÍOS-RIVERA, BENNETT & SAN, 2002). O rendimento de 1,3-propanodiol a partir de glicerol é determinado principalmente pela disponibilidade de NADH produzido na via oxidativa, a mesma que leva à formação de subprodutos (SAINT-AMANS et al. 2001; CELIŃSKA 2010). Os subprodutos derivados do piruvato competem por NADH com a biossíntese de 1,3-propanodiol, resultando na diminuição de

rendimento deste. Porém, a variedade de subprodutos é necessária para o ajuste fino do balanço redox intracelular. Os fatores genéticos do microrganismo, bem como as condições de cultivo influenciam a qualidade e quantidade dos produtos secundários formados (CELIŃSKA 2010; MAERVOET et al., 2014).

A taxa de NADH/NAD+ tem efeito regulador sobre a expressão de alguns genes e na atividade de certas enzimas. Por exemplo, uma alta taxa de NADH/NAD+ resulta numa expressão aumentada do gene álcool desidrogenase (*adhE*), que catalisa a formação de etanol durante a fermentação (DE GRAEF et al., 1999). Portanto, atingir o equilíbrio da taxa NADH/NAD+ é importante para a melhoria da produção, rendimento e produtividade da biossíntese de metabólitos de interesse (ZENG & BIEBL, 2002).

A concentração intracelular de NADH pode ser aumentada por meio da manipulação do ciclo do ácido cítrico (TCA). Quando o ciclo TCA ocorre em condições anaeróbias uma maior quantidade de NADH é formado: quatro moléculas de NADH por molécula de glicose. Contudo, a partir de glicerol para a produção de 1,3-propanodiol, um único ciclo do TCA é ativo, na via redutiva, que consome NADH ao invés de produzir (WHITE, 1995).

Deve também ser mencionado que o acúmulo de 1,3-propanodiol pode implicar na acumulação de 3-HPA, tóxico para a célula, uma vez que a reação inversa também é catalisada pela enzima PDDH (ZHENG et al., 2006; CELIŃSKA, 2010). Além disso, o próprio acúmulo de 1,3-propanodiol pode ser inibitório para o crescimento das células. De acordo com CELIŃSKA (2010) o efeito inibitório de 1,3-propanodiol não está relacionado com a pressão osmótica, mas sim com a alteração da estrutura das membranas celulares podendo causar seu rompimento.

De acordo com BIEBL et al. (1992), a estequiometria típica para obtenção de 1,3-propanodiol por *Clostridium* spp., a partir de glicerol, pode ser descrita de acordo com a equação:

$$\textbf{10 glicerol} \longrightarrow \textbf{2 acetato + 1 butirato + 6 1,3-propanodiol + 4 } CO_2 \textbf{ + 2 } H_2$$

O rendimento máximo teórico utilizando glicerol como a única fonte de carbono é de 0,72 mol de 1,3-propanodiol/mol de glicerol (BIEBL et al., 1992; ZENG & BIEBL, 2002; MAERVOET et al., 2011), ou seja, 0,60 g de 1,3-propanodiol/g de glicerol. De acordo com BIEBL et al. (1992) e ZENG, BIEBL & DECKWER (1997), por ser uma

heterofermentação, o rendimento pode oscilar já que é influenciado pela rota metabólica favorecida no processo, o que significa que quanto mais 1,3-propanodiol é produzido mais essa rota é favorecida em detrimento da outra, a produtora de ácidos e solventes. Lembrando ainda que, cerca de 5% do glicerol é utilizado para a produção de biomassa, quando este é a única fonte de carbono disponível (DROZDZYNSKA, LEJA & CZACZYK, 2011).

2.4 ENGENHARIA METABÓLICA DE BACTÉRIAS

Processos biotecnológicos são particularmente atrativos, uma vez que utilizam matérias primas renováveis e não produzem subprodutos tóxicos ao meio ambiente. No entanto, existem limitações no metabolismo microbiano em termos de rendimento, concentrações de produto e produtividade, além de dificuldades com o pré-tratamento dos substratos e com a recuperação do produto a partir do meio de cultivo. Essas limitações podem ser significativamente reduzidas com a aplicação da engenharia metabólica (LI, LESNIK & LIU, 2013).

A engenharia metabólica pode ser definida como um conjunto de ferramentas usadas para melhorar a formação de um determinado produto ou propriedades celulares específicas, por meio da modificação dirigida de reação(ões) bioquímica(s) ou da introdução de novas rotas com o uso da tecnologia do DNA recombinante. Geralmente, duas etapas podem ser distinguidas para o processo de engenharia metabólica: a determinação da topologia da via de interesse e a identificação de etapas que limitam a velocidade da reação desejada. Esses gargalos podem ser ultrapassados por meio do emprego de engenharia genética da via de interesse, ou manipulação de genes que podem influenciar no rendimento dessa via (CELIŃSKA, 2010).

Embora a fermentação tenha um menor rendimento em termos de conservação de energia, se comparada com o processo metabólico de respiração, apresenta significativas amplicações biotecnológicas devido à diversidade dos produtos que podem ser gerados, dependendo dos vários fatores genéticos e/ou ambientais. Essas características permitem o desenvolvimento de uma plataforma robusta para a engenharia metabólica. O acúmulo de certos produtos da fermentação pode inibir o crescimento celular, por exemplo, etanol, butanol e outros álcoois podem levar ao rompimento das membranas celulares (HUFFER et al.,

2011). Outros produtos, tais como ácidos orgânicos, afetam o pH de homeostase das células bacterianas.

Em comunidades microbianas naturais, produtos e subprodutos da fermentação são continuamente excretados e podem ser utilizados como fontes de carbono por outras espécies na mesma comunidade. No entanto, em um recipiente fechado, o acúmulo de produtos e subprodutos pode inibir drasticamente o crescimento celular, bem como o reduzir o rendimento da fermentação. A modificação genética de linhagens bacterianas, para melhorar a sua tolerância e direcionar a formação de produtos, pode ser utilizada e representa uma área de pesquisa importante na biotecnologia microbiana moderna (WANG, CHEN & QUINN, 2012).

A transferência de genes de um organismo para outro nem sempre é simples, por exemplo, genes eucarióticos possuem mecanismos (introns e exons) que os procariotos não possuem. Além disso, os códons que codificam os aminoácidos também podem diferir entre os organismos. Portanto, o gene que é transferido entre os organismos tem de ser adaptado às utilizações adequadas ao códon do organismo hospedeiro (AHMED & KHOSA, 2010).

Entre os diversos sistemas disponíveis para a modificação genética de linhagens, a produção de proteína heteróloga, empregando a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é um dos mais atraentes. Este sistema tem a capacidade de crescer rapidamente e com densidade elevada em substratos de baixo custo, disponibilidade cada vez maior de vetores de clonagem e linhagens hospedeiras mutantes, fácil transformação por eletroporação e conjugação, além de ser relativamente estável com antibióticos (MAKRIDES, 1996; BANEYX, 1999; LÜTKE-EVERSLOH, 2014).

Segmentos de DNA circulares e extracromossomicos naturalmente ocorrentes, são denominados plasmídeos. Linhagens selvagens de *E. coli*, isoladas de diversas fontes, podem abrigar diversos plasmídeos. Muitas vezes, estes plasmídeos são portadores de genes que especificam novas atividades metabólicas que são vantajosas para a bactéria hospedeira. Estas atividades, que variam de acordo com a substância orgânica catabolisada, podem dotar as células hospedeiras com, por exemplo, resistência a antibióticos, metais pesados ou bacteriófagos. (WATSON, 2003; VOET & VOET 2011).

A digestão enzimática de plasmídeos gera vários fragmentos, a sobreposição

das extremidades desses fragmentos dá origem aos plasmídeos artificiais. As primeiras moléculas de DNA recombinante foram plasmídeos artificiais, estas moléculas podem ser replicadas de forma autonoma, e, portanto, propagadas, em células bacterianas hospedeiras, desde que ainda possuam uma sinalização local onde a replicação de DNA pode começar (origem de replicação) (GARRETT & GRISHAM, 2001; WATSON, 2003).

As sequências de DNA exógenas podem ser inseridas em plasmídeos artificiais, os quais são transportados para dentro da célula (por exemplo, *E. coli*), onde as sequências serão propagadas como parte do plasmídeo. Isto é, estes plasmídeos podem servir como vetores de clonagem para transportar os genes. Os plasmídeos úteis como vetores de clonagem possuem três características comuns: um replicador (origem de replicação), um marcador de seleção (por exemplo gene que confere resistência a um antibiótico ou outras caracteristicas) e um local de clonagem. Tipicamente, o local de clonagem é a sequência de nucleotídeos, na qual ocorre a inserção do DNA exógeno, de forma que a capacidade do plasmídeo de se replicar não seja prejudicada e marcadores essenciais não sejam inativados (GARRETT & GRISHAM, 2001; VOET & VOET 2011).

A clivagem do plamídeo, no sítio de restrição pela nuclease, permite a inserção do fragmento de DNA exógeno. As extremidades do plasmídeo linearizado são unidas às extremidades do fragmento de modo que, quando o círculo é fechado novamente, obtem-se o plasmídeo recombinante (Figura 2.9) (GARRETT & GRISHAM, 2001).

Os plasmídeos recombinantes são moléculas de DNA híbridas, ou seja, sequências de DNA de plasmídeo acrescidas de sequências exógenas (chamadas inserções). Estas moléculas híbridas são também chamadas de construções quiméricas ou plasmídeos quiméricos. A presença de sequências de DNA exógenas não afeta adversamente a replicação do plasmídeo. Portanto, os plasmídeos recombinantes podem ser propagados em bactérias assim como o plasmídeo original (AHMED & KHOSA, 2010; WATSON, 2003).

A construção de plasmídeos recombinantes requer a união entre as extremidades do DNA exógeno e do plasmídeo linearizado. Esta ligação é facilitada se as extremidades do plasmídeo e do DNA exógeno forem complementares. Uma maneira de gerar tais extremidades é clivar o DNA com enzimas de restrição, pois elas fazem cortes em locais específicos (HEAP et al., 2009; VOET & VOET 2011).

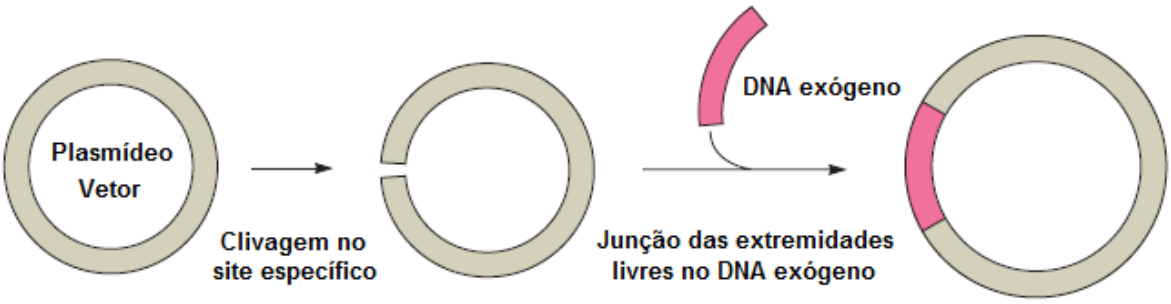

Figura 2.9: Inserção de DNA exógeno em um vetor para formação do plasmídeo recombinante. Fonte: GARRETT & GRISHAM (2001).

Uma vez emparelhadas as extremidades do DNA, as ligações na estrutura açúcar-fosfato do DNA podem então ser refeitas pela DNA ligase, obtendo-se novamente um plasmídeo circular. DNA ligase é uma enzima que liga covalentemente os grupos OH e PO_4 adjacentes. O inconveniente desta estratégia é que quaisquer pares de extremidades complementares podem se emparelhar. Assim, moléculas de plasmídeo podem hibridizar com eles mesmos ou com os fragmentos de DNA exógeno. Uma forma de eliminar as sequências de DNA indesejadas é por meio de marcadores de seleção, destinados a identificar apenas as bactérias que contêm os plasmídeos de interesse (GARRETT & GRISHAM, 2001).

A construção de um plasmídeo recombinantes requer vários elementos cuja configuração deve ser cuidadosamente considerada para garantir os mais elevados níveis de síntese de proteínas (MAKRIDES, 1996). HEAP et al. (2009) projetaram um sistema simples e otimizado contendo diferentes combinações de sítios de restrição para bactérias Gram-positivas e marcadores de seleção, além de todos os componentes necessários para a transformação do plasmídeo por conjugação (Figura 2.10). Neste sistema cada plasmídeo tem exatamente um módulo de cada um dos quatro tipos: AscI, FseI, PmeI e SbfI, que estão sempre presentes na mesma ordem. Cada módulo deve ser acompanhado pelo par correto de sítios de restrição (HEAP et al., 2009).

Este esquema de base, figura 2.10, define um sistema denominado pMTL80000-pMTL89999. Ao longo dos últimos anos, a expressão de genes utilizando vetores pMTL80000 tem sido amplamente utilizada e tornou-se uma técnica altamente eficaz na engenharia metabólica de bactérias *Clostridium* spp. (HEAP et al. 2009).

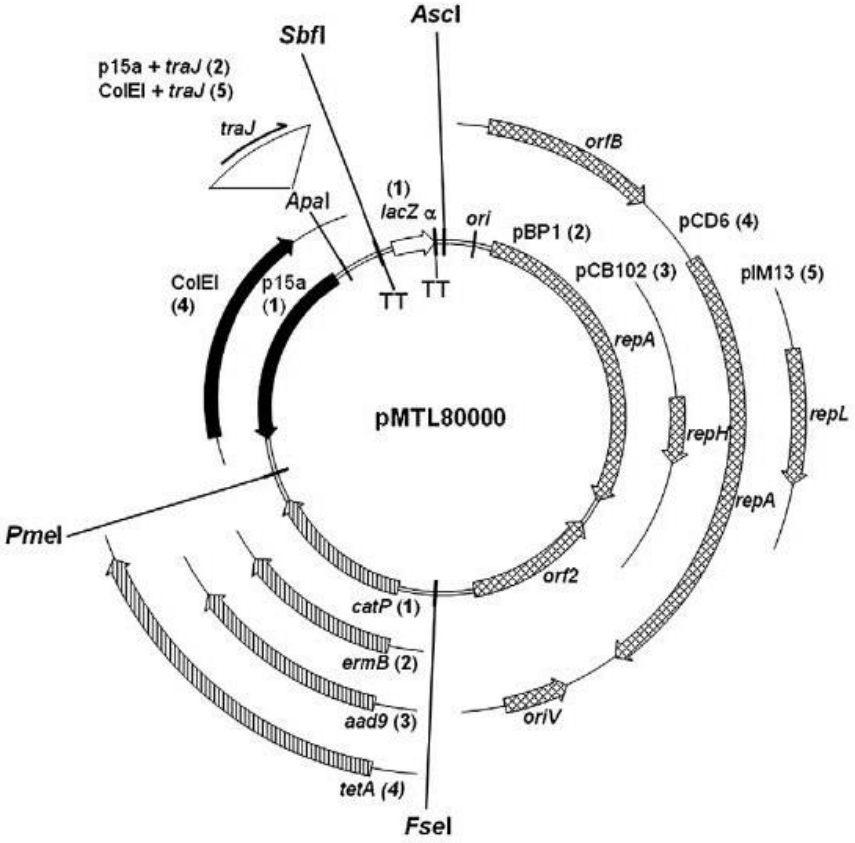

Figura 2.10: Módulos disponíveis nos plasmídeos da série pMTL80000 para a construção de recombinantes. Fonte: HEAP et al. (2009).

No sistema descrito por HEAP et al. (2009), cada módulo (AscI, FseI, PmeI e SbfI) é identificado por um número de 0 a 5. A combinação dos módulos presentes num plasmídeo define a designação do plasmídeo. Por exemplo, o plamídeo pMTL82151 é constituído, a partir do vetor pMTL8000, pelos módulos: pBP1 (2), *catP* (1), ColE1+*traJ* (5) e *lacZ* (1) que são as sequências de genes responsáveis, respectivamente, por: replicação Gram+, resistência a antibiótico + sequência de codificação (CDS), replicação Gram- e promotor + ribossoma-local (RBS) + expressão de genes de interesse (HEAP et al. 2009).

Construída a sequência desejada, a replicação ou amplificação da quantidade do segmento específico de DNA é feita por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (AHMED & KHOSA, 2010), Figura 2.11. Esta técnica consiste em incubar a sequência de DNA de interesse com dNTPs (desoxinucleótido trifosfatos), DNA polimerase (*Taq* DNA polimerase = enzima oriunda da bactéria termoresistente *Thermus aquaticus*) e os dois oligonucleótidos selecionados como iniciadores da síntese de DNA. Estes iniciadores ou *primers* são responsáveis por direcionar a

atividade da DNA polimerase na síntese de novas cadeias complementares, e localizam-se nas extremidades específicas do segmento de DNA de interesse e são adicionados em quantidades excessivas (1.000 vezes ou mais) ao meio reacional (GARRETT & GRISHAM, 2001; VOET & VOET 2011).

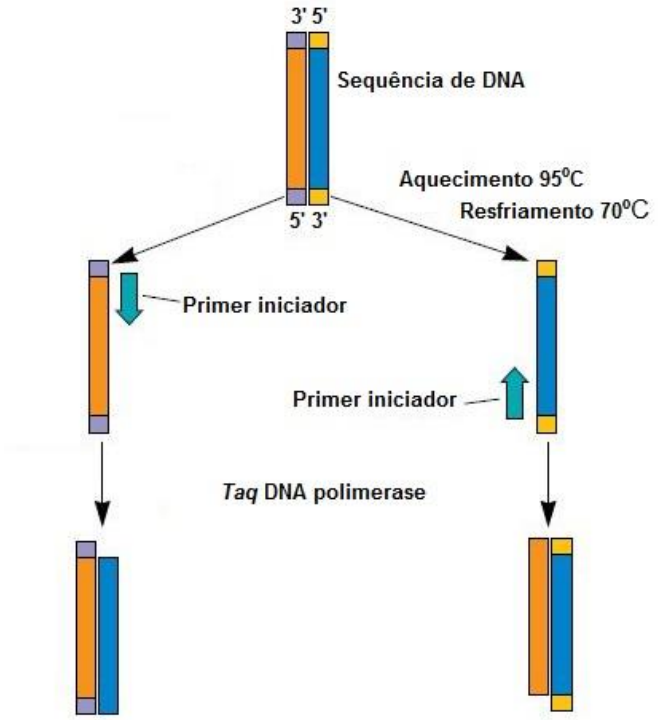

Figura 2.11: Representação de um ciclo da PCR para amplificação de determinada sequência de DNA. Fonte: GARRETT & GRISHAM (2001).

A dissociação das fitas de DNA, durante a PCR, ocorre devido à desnaturação pelo calor (95ºC). Em seguida, a temperatura é reduzida para permitir que os *primers* se emparelhem aos respectivos segmentos complementares, e que a DNA polimerase sintetize as fitas complementares, e então outro ciclo de aquecimento/resfriamento se inicia (Figura 2.11). A cada ciclo da PCR a quantidade de sequências de DNA é duplicada, sendo que este processo pode ser automatizado por meio do uso de termocicladores (GARRETT & GRISHAM, 2001; VOET & VOET 2011). A reação da transcriptase reversa seguida da PCR (RT-PCR), é uma variação do método básico da PCR e é utilizada quando se deseja amplificar o RNA (por exemplo RNAm). A transcriptase reversa (RT) é utilizada para sintetizar, a partir de uma sequência de RNA, uma cadeia complementar de DNA que servirá como molde para os ciclos da PCR (GARRETT & GRISHAM, 2001).

O potencial da tecnologia do DNA recombinante resulta em parte do fato de

que, virtualmente, qualquer sequência de DNA pode ser clonada e amplificada seletivamente. A única limitação prática é o tamanho do segmento de DNA exógeno - a maioria dos plasmídeos com inserções maiores do que 10 kpb não são replicadas de forma eficiente (GARRETT & GRISHAM, 2001; WATSON, 2003).

2.4.1 Engenharia Metabólica Aplicada à Produção de 1,3-propanodiol partir de Glicerol

A engenharia do metabolismo de produção microbiana de 1,3-propanodiol abrange tanto produtores naturais como microrganismos que adquiriram esta capacidade. Dentre os produtores naturais destacam-se as espécies dos gêneros *Klebsiella* e *Clostridium* apresentarem maior rendimento e produtividade se comparadas a espécies de outros gêneros (WANG, CHEN & QUINN, 2012; MAERVOET et al., 2014).

No entanto, as empresas DuPont e Genencor® International Inc. optaram por uma linhagem geneticamente modificada de *E. coli*, que é um organismo fácil de modificar, amplamente utilizado em biotecnologia industrial, ao invés de utilizar um produtor natural (MAERVOET et al., 2012a). De acordo com ZENG & BIEBL (2002), experimentos para expressar genes da via redutiva da rota metabólica de síntese de 1,3-propanodiol em *E. coli* tem sido bem sucedidos. Da mesma forma, grandes esforços tem sido feitos para desenvolver bioprocessos e linhagens modificadas para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012; MAERVOET et al., 2011; SAXENA et al., 2009).

Na tabela 2.3 é possível observar os microrganismos que vem sendo geneticamente manipulados para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol. Até agora, a maioria dos estudos tem focado no uso de *Klebsiella pneumoniae* (XU et al., 2009) e *Clostridium butyricum* (WILKENS et al., 2012). No entanto, de acordo com OTTE et al. (2009), *Clostridium diolis* DSM 15410, geneticamente modificada, produziu 1,3-propanodiol em elevadas concentrações (78 g/L) com um rendimento de 0,5 g/g e a produtividade de 2,8 $g/L.h^{-1}$.

A utilização de glicose como co-substrato durante a fermentação de glicerol para produção de 1,3-propanodiol é realizada por algumas bactérias, dentre elas *K. pneumoniae*. A via de assimilação de glicose é indicada na figura 2.8, a supressão da enzima *tpi* (responsável pela conversão de dihidroxiacetona-P em gliceraldeído-

3-P) aumentou o rendimento de 1,3-propanodiol em quase 40% em fermentações usando a de glicose como co-substrato (NAKAMURA & WHITEDY 2003; SABRA, GROEGER & ZENG, 2015).

Tabela 2.3: Microrganismos **geneticamente modificados** para produção de 1,3-propanodiol, empregando glicerol como única fonte de carbono e diferentes estratégias.

Linhagem	Estratégia	1,3-PDO (g/L)	Q_P (g/L.h^{-1})	$Y_{P/S}$ (g/g)	Referência
C. diolis DSM 15410	*genome shuffling*	78,5	2,82	0,53	OTTE et al., 2009
K. pneumoniae	*E. coli yqhD*	7,9	0,44	0,40	SEO et al., 2010
	yqhD, Δ*dhaD*, Δ*dhaK*	7,7	0,26	0,44	
K. pneumoniae ME-308	*E. coli* yqhD	67,6	1,69	0,52	ZHU et al., 2009
E. coli	*dhaBCE*, *dhaF*, *dhaG*, *dhaT*	10,6	0,06	0,33	PRZYSTAŁOWSKA et al., 2015
K. pneumoniae ATCC 10082	*dhaT*, *dhaD*	23,6	1,18	0,49	CHEN, LIU & LIU, 2009b
K. pneumoniae J2B	Δ*ldhA*	58,0	1,30	0,35	DURGAPAL et al., 2014
Lactobacillus panis PM1	*yqhD*	16,2	0,11	0,72	KANG et al., 2014
Citrobacter freundii AD970	*Shimwellia blattae* PDOR	35,6	0,42	0,40	CELIŃSKA et al., 2015

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, Q_P: produtividade e $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato.

A maioria dos autores que aplicam a engenharia metabólica e a modificação genética de bactérias para produção 1,3-propanodiol a partir de glicerol concentram esforços na via redutiva do metabolismo (CHEN, LIU & LIU, 2009; ZHU et al., 2009b; MAERVOET et al. 2011; KANG, KORBER & TANAKA, 2014; PRZYSTAŁOWSKA et al., 2015; CELIŃSKA et al. 2015) ou no bloqueio de determinadas etapas da via oxidativa (SEO et al., 2010; MAERVOET et al. 2011; MAERVOET et al. 2014).

Ao alterar o equilíbrio da via redutiva, por meio do aumento das atividades enzimáticas das reações envolvidas, pode ocorrer o acúmulo do intermediário tóxico 3-HPA, além da inibição do crescimento e da produção de 1,3-propanodiol antes da completa depleção do substrato. Várias estratégias têm sido relatadas para equilibrar os cofatores e para reduzir o acúmulo de 3-HPA aumentando assim o rendimento de 1,3-propanodiol, a partir de glicerol. Entre elas, as mais importantes são a regeneração do cofator, a eliminação de consumo não essencial de NADH e o aumento da atividade das enzimas que produzem o NADH (MAERVOET et al., 2016).

A empresa DuPont, desenvolveu uma via sintética para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicose, independente de glicerol. Essa via é formada pela via de síntese de glicerol de *S. cerevisiae* (catalisada por glicerol 3-fosfato desidrogenase e glicerol 3-fosfato fosfatase) e a via metabólica de conversão de glicerol a 1,3-propanodiol por *K. pneumoniae* (catalisada pela glicerol desidratase) integradas em *E. coli*. O último passo (formação de 1,3-propanodiol) é realizado por uma isoenzima, a 1,3-propanodiol oxidoredutase de *E. coli* (*yqhD*). O rendimento de 1,3-propanodiol pode ser aumentado para 135 g/L, com produtividade de 3,5 g/L.h^{-1} (NAKAMURA & WHITEDY, 2003).

2.5 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL OBTIDO POR FERMENTAÇÃO

Em que pesem as complexidades e particularidades dos Bioprocessos, podemos dividi-los em três estágios: a etapa que antecede a transformação é denominada de à montante (*upstream*), seguida da etapa de transformação propriamente dita e, finalmente, a etapa de à jusante (*downstream*). Os Processos de Separação e Purificação do Produto, outra parte integrante de um bioprocesso e que também definem o seu êxito, é a seção de recuperação de produto (processo de *downstream*). Nesta fase, informações sobre aspectos citológicos e fisiológicos do microrganismo são de grande valia, pois indicarão não apenas a geração como também a localização do produto (PEREIRA, BON & FERRARA, 2008).

A seleção do processo de separação será influenciada pela complexidade do próprio bioprocesso e pelo valor do produto. Caso necessário, a separação deverá ocorrer em série, a fim de se atingir o grau de pureza requerida (extratos

enzimáticos brutos ou enzima purificada) e/ou a forma final exigida para um dado produto (produto cristalizado, liofilizado, líquido concentrado, prensado). Basicamente, a sequência de operações, pela qual o meio contendo a biomolécula a ser separada deve passar para a obtenção de um produto de alta pureza, constitui-se de quatro etapas: (i) remoção de material insolúvel (particulado), (ii) isolamento primário, (iii) purificação, e (iv) isolamento final do produto (PEREIRA, BON & FERRARA, 2008).

Dentro da concepção de processo integrado, a associação de determinadas características do agente biológico (células ou enzimas), bem como das particularidades do sistema reacional, com os processos de *downstream* tem sido uma tendência no desenvolvimento e melhoria da operacionalidade de Bioprocessos. A associação de sistemas reacionais com a separação simultânea do produto(s) como, por exemplo, a imobilização de enzimas em suportes de colunas cromatográficas, os sistemas de fermentação acoplados a módulos de membrana e outros à destilação a vácuo, podem trazer benefícios técnicos e econômicos para a operação e a viabilidade dos Bioprocessos (PEREIRA, BON & FERRARA, 2008).

A produção microbiana de 1,3-propanodiol apresenta um misto de oportunidades. Embora tenha algumas vantagens sobre a síntese química em termos de sustentabilidade, confiabilidade e benefícios ambientais, o grau de pureza necessário para o uso final do composto tem um grande impacto sobre o seu preço e, portanto, sobre sua viabilidade comercial. Assim, a purificação de 1,3-propanodiol deve ser considerada como parte integrante do processo global de produção (DECKWER, 1995; HERMANN & PATEL, 2007).

Inicialmente, o custo do 1,3-propanodiol produzido por via microbiana era dependente do custo do substrato (DECKWER, 1995; HERMANN & PATEL, 2007). No entanto, com a notável redução no preço do glicerol, o custo de processamento a jusante passou a responder pela maior parte do custo total de produção, entre 50% e 70% (XIU & ZENG, 2008; ANAND, SAXENA & MARWAH, 2011).

Vários métodos de purificação de 1,3-propanodiol foram descritos em uma série de estudos anteriores. O primeiro método proposto por MALINOWSKI (2000) foi o de extração reativa. Esse método consiste em primeiro converter o 1,3-propanodiol em uma substância sem grupos hidroxila e depois recuperá-lo por meio de extração líquido-líquido. Em outro método, apresentado por HAO, LIU & LIU (2005), propionaldeído, butiraldeído e isobutiraldeído foram usados como reagentes,

bem como extratores para formar o 1,3-dioxano, um derivado do 1,3-propanodiol.

Todos estes processos são bastante complexos e há necessidade adicional de regenerar o 1,3-propanodiol a partir do seu derivado, podem ocorrer reações entre o acetaldeído e alguns subprodutos ou proteínas, reduzindo a eficiência. Além da própria complexidade, o custo dos produtos químicos utilizados tornam o processo de extração inviável (SILVA et al., 2014).

O método de pervaporação por membranas, com base na zeólita ZSM-5, utilizado por LI et al. (2001) apresentou alguns inconvenientes, tais como um fluxo baixo e baixa seletividade. No caso de ser selecionado o processo de destilação para a separação do produto, é preferível optar pela destilação a vácuo ao invés da tradicional, pois a diminuição do ponto de ebulição leva à economia de energia. No entanto, a necessidade de dessalinização e desproteinização antes da evaporação, pode inviabilizar o processo (XIU & ZENG, 2008).

GONG e et al. (2004) e HAO, LIU & LIU (2005) avaliaram o potencial de aplicação da eletrodiálise antes da evaporação, mas o baixo rendimento em produto e o entupimento das membranas tornam este processo indesejável. Da mesma forma, a dessalinização da água do meio por eletrólise dá um baixo rendimento devido à perda de produto no efluente salino. Além disso, o tempo de vida das membranas de eletrólise pode ser reduzido devido ao entupimento das mesmas por biomacromoléculas como, por exemplo, proteínas, polissacáridos e ácidos nucleicos.

Uma situação similar também ocorre na ultrafiltração, nanofiltração, e nas membranas de pervaporação por zeólitas. Devido à baixa seletividade e capacidade da resina, a solução de 1,3-propanodiol não é normalmente concentrada, mas diluída utilizando cromatografia. Além disso, o meio ou matriz cromatográfica (resina, zeólita, carvão) têm de ser regenerados frequentemente, caso a alimentação não for feita com meio dessalinizado ou desproteinizado. O método de cromatografia parece ser menos adequado economicamente para a recuperação de 1,3-propanodiol (XIU et al., 2015).

Uma forma de combinar as etapas de separação e purificação em uma única unidade de operação é por meio do processo de adsorção. Com uma resina de permuta sulfonato, HILALY & BINDER (2002) foram capazes de separar 95% de 1,3-propanodiol com uma pureza de 87%. Este processo, no entanto, teve uma alta demanda de água, resultando em custos de energia elevada.

Outra possibilidade é a adsorção em resina de sílica ou em zeólitos beta. De um modo geral, ambos são muito seletivos, são fáceis de operar e o material de absorção pode ser recuperado. No entanto, a implementação em processos de grande escala é difícil devido à extesão da superfície de troca o que acarreta perda de pressão, além da tendência de incrustação. Além disso, para a recuperação do adsorvente é necessário incluir uma etapa de dessorção, aumentando os custos de processo (XIU & ZENG, 2008).

MALINOWSKI (1999) propôs a extração líquido-líquido, visto que a extração de 1,3-propanodiol em solventes não representava uma extração simples e eficiente. A extração reativa necessita de um pré-tratamento para a remoção de proteínas, etanol e sais, e de um pós-tratamento para a re-extração, hidrólise, ou destilação reativa. O pós-tratamento se faz necessário já que qualquer vestígio de aldeído no 1,3-propanodiol é prejudicial para a polimerização na produção de PTT.

Embora existam patentes de uma série de solventes de extração, o 1,3-propanodiol, em meio diluído, não dissolve em solventes hidrofóbicos, exceto quando se adiciona uma grande quantidade de solventes em um meio concentrado (XIU & ZENG, 2008).

CHO et al. (2006) utilizaram o acetato de etila na separação de fases de 1,3-propanodiol, onde a fase de acetato de etila, a qual continha o 1,3-propanodiol foi, subsequentemente, purificada por cromatografia. O coeficiente de partição obtido para o produto alvo foi inferior a 1,9. Além da baixa eficiência de separação esse processo requer a manipulação de grandes quantidades de solventes.

O processo convencional de extração líquido-líquido requer a manipulação de grandes quantidades de solventes e, em particular, a extração de 1,3-propanodiol e a eficiência de separação são muito baixas. Portanto, outras estratégias de processamento para separação mais promissoras deverão ser aplicados para resolver o problema de separar 1,3-propanodiol a partir de um sistema aquoso diluído (XIU & ZENG, 2008).

A adição concomitante de etanol e de sulfato de amônio ao meio de fermentação, à base de glicerol, forma um sistema aquoso de duas fases possibilitando a separação de 1,3-propanodiol. Neste sentido, XIU et al. (2007) demonstraram que 1,3-propanodiol pode ser recuperado de meios de fermentação pelo efeito de *salting-out*, que consite em um sistema de extração líquido-líquido. Esta técnica tem sido amplamente aplicada na separação de biomacromoléculas,

tais como proteínas e ácidos nucleicos (KULA, KRONE & HUSTEDT, 1982).

A complexidade do meio de fermentação é um obstáculo importante na concepção de um processo a jusante simples, barato e eficiente para a recuperação de 1,3-propanodiol. Sua purificação representa um desafio tecnológico e continua a ser uma barreira econômica para uma produção microbiana eficiente (ANAND, SAXENA & MARWAH, 2011).

2.5.1 Recuperação de 1,3-propanodiol por *Gas stripping*

Entre todas as técnicas de recuperação de produto, a de *gas stripping* é uma opção econômica e favorável devido à sua simplicidade de operação (QURESHI & BLASCHEK, 2001). O *gas stripping* remove seletivamente substâncias voláteis, por meio de arraste por gás, tais como butanol e acetona, e não retira os nutrientes do meio de cultivo, nem prejudica as células da fermentação (DÜRRE, 1998).

Os efeitos do gás sobre a cinética de fermentação e a estabilidade do processo a longo prazo foram avaliados e discutidos por LU, DONG & YANG (2013). Segundo os autores esta técnica é simples e não requer aparelhos caros. O gás pode ser pulverizado pelo fermentador/biorreator e o produto pode ser condensado e recuperado em um condensador. A concentração de produto na corrente de condensado é maior se comparada com a concentração do produto no meio de fermentação (QURESHI & BLASCHEK, 2001; LU, DONG & YANG, 2013).

Além disso, a técnica oferece outras vantagens como a possibilidade de recuperação do produto integrada com a fermentação, utilização dos gases gerados na fermentação como gases de extração e a possibilidade de operar na mesma temperatura da fermentação (DÜRRE, 1998; LEE et al., 2008; LU, DONG & YANG, 2013). Como não requer o uso de membranas, não há problemas com a diminuição da eficiência ao longo do tempo como em outros sistemas, por exemplo: pervaporação e técnicas de adsorção (VANE, 2008).

A técnica de *gas stripping* tem sido aplicada com êxito na fermentação acetobutanólica para aumentar a produção de butanol, diminuindo a inibição pelo produto (QURESHI & BLASCHEK, 2001; QURESHI, SAHA & COTTA, 2007; VANE, 2008; LU, DONG & YANG, 2013; LU et al., 2015).

2.5.2 Extração Líquido-Líquido de 1,3-propanodiol – Efeito *Salting-out*

Sistemas de extração líquido-líquido, apresentando o efeito de *salting-out*, foram relatados pela primeira vez em 1973, nos quais ocorreu a formação de uma fase superior rica em acetona e uma fase inferior rica em sal, quando os sais foram introduzidos na solução aquosa de acetona. Em comparação com sistemas tradicionais de extração líquido-líquido (solventes orgânicos imiscíveis em água), uma característica importante do *salting-out* é a elevada polaridade da fase do topo (metanol, etanol, acetona ou acetonitrilo) (GREVE & KULA, 1990; MALINOWSKI, 1999).

O efeito de *salting-out* de sais inorgânicos (por exemplo, sulfato de amônio) é geralmente utilizado para remover proteínas de uma mistura aquosa, como o meio de fermentação (XIU, ZHANG & LI, 2007; GAO et al., 2007; LI et al., 2009; AYDOGAN et al., 2010; LI, TENG & XIU, 2010; DAI, ZHANG & XIU, 2011). Esta técnica vem sido estudada e, aparentemente, é útil para a extração de solutos polares tais como álcoois solúveis e ácidos em água (MALINOWSKI, 1999). Os solventes orgânicos hidrofílicos, utilizados para obtenção do efeito *salting-out*, são fáceis de recuperar por evaporação e oferecem menos riscos em termos de toxicidade e fatores cancerígenos quando comparados com os solventes tradicionais e as extrações reativas (LOUWRIER, 1998).

Resultados publicados por XIU & ZENG (2008) mostraram que os sistemas de extração líquido-líquido, com efeito *salting-out*, podem ser usados para extrair 1,3-propanodiol a partir do meio de fermentação, com maior coeficiente de partição (4,77) e recuperação de produto (93,7%). Para a obtenção desses resultados, os autores utilizaram 46% (v/v) de etanol e sulfato de amônio saturado. Além disso, foi possível remover células e proteínas dos meios de fermentação simultaneamente, com uma taxa de remoção de 99,7% e 79,0%, respectivamente.

Os sistemas de extração com efeito *salting-out* apresentam grande rendimento, excelente resolução e separação rápida das fases, operação contínua, baixo consumo de energia, alta eficiência e *scale-up* simples. Adicionalmente, a possibilidade de reciclo dos componentes formadores de fases (solvente orgânico hidrofílico e sal) fazem do *salting-out* um método de extração a jusante promissor e sustentável (JIANG et al., 2009; LI et al., 2009; SUN et al., 2009).

2.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A produção de bioenergia é uma medida de extrema importância para enfrentar os sérios desafios ambientais relacionados com os efeitos das mudanças climáticas globais. Alguns dos fatores que têm despertado grande interesse pelos biocombustíveis são: menor custo, autossuficiência em relação aos países exportadores de petróleo, redução do volume de emissões de gases do efeito estufa, incertezas a respeito da disponibilidade futura de recursos não renováveis e tensões geopolíticas em regiões produtoras de combustíveis fósseis (DA COSTA, PEREIRA & ARANDA, 2010).

Um dos principais fatores que regem a viabilidade econômica de qualquer bioprocesso é o custo do substrato, neste caso o glicerol. A demanda crescente de energia deverá estimular a expansão da indústria de biocombustíveis, que busca por alternativas mais limpas, biodegradáveis e inesgotáveis. Isto significa uma maior disponibilidade de glicerol, subproduto da indústria de biodiesel, para conversão em produtos de alto valor agregado. Embora a União Européia seja líder mundial na produção de biodiesel, não é o único com enorme capacidade de produção, também manifestada pelos países em desenvolvimento como Brasil, Argentina e China. O uso de estratégias de engenharia de bioprocessamento como cultivo descontínuo alimentado, contínuo com/sem reciclagem celular, culturas mistas e células e/ou enzimas imobilizadas merecem investigação e esforços de desenvolvimento (KAUR, SRIVASTAVA & CHAND, 2012).

A recuperação e purificação de 1,3-propanodiol representam um desafio tecnológico e um obstáculo econômico para uma eficiente produção deste produto químico em larga escala, por rota biotecnológica. Tecnologias estudadas até agora apresentaram limitações em termos de rendimento e consumo de energia. Para fazer frente a esses desafios, técnicas de separação clássicas precisam ser melhoradas ou combinadas com novas tecnologias. Fermentações extrativas e por pervaporação *in situ* podem ser promissoras. Além disso, o métodos de extração líquido-líquido com álcoois de cadeia curta ou solventes orgânicos hidrofílicos também merece atenção (XIU & ZENG, 2008).

É possível alcançar viabilidade econômica para a produção biotecnológica de 1,3-propanodiol desde que se tenha disponibilidade de glicerol a baixo preço e se desenvolvam estratégias de engenharia de bioprocessos e recuperação do produto.

Capítulo 3

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A glicerina é o principal subproduto da indústria do biodiesel, o qual, é comumente produzido a partir da transesterificação de gorduras animais e óleos vegetais. Uma das inúmeras aplicações desse abundate subproduto é como substrato na bioindústria para a obtenção de 1,3-propanodiol e outros produtos químicos de interesse.

Por sua vez, o 1,3-propanodiol é um produto químico industrialmente utilizado como intermediário na produção de polímeros, cosméticos, alimentos, lubrificantes e medicamentos. Recentemente, a demanda de mercado para o 1,3-propanodiol aumentou devido ao crescimento da produção de politereftalato de trimetileno (PTT), usado na fabricação de tapetes, fibras têxteis, monofilamentos e filmes.

Algumas espécies de bactérias do gênero *Clostridium* são capazes de metabolizar o glicerol levando à produção de 1,3-propanodiol. No entanto, seleção da linhagem adequada, bem como a otimização das condições e estratégias de cultivo são de fundamental importância para um melhor aproveitamento do substrato, maximização da produção e minimização dos custos e perdas.

Tendo estabelecido um processo fermentativo eficiente, a recuperação do produto passa a ser o principal desafio para que a bioprodução de 1,3-propanodiol possa ser economicamente competitiva.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho são:

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo fermentativo para produção de 1,3-propanodiol por fermentação submersa, empregando espécie de bactéria do gênero *Clostridium* que utilize como substrato o glicerol.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA TESE

- Selecionar a linhagem mais promissora dentre as disponíveis de *Clostridium* spp. para o consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol;
- Otimizar a composição do meio de fermentação, utilizando planejamento experimental e análise estatística dos dados, visando a elaboração de um meio mínimo ótimo para produção de 1,3-propanodiol pela linhagem selecionada;
- Obter o pH ótimo para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol, pela linhagem selecionada, empregando o meio otimizado;
- Investigar a influência da adição de possíveis precursores do processo de fermentação como: o ácido lático, o emprego de glicose como co-substrato juntamente com o glicerol e a substituição ao extrato de levedura pela milhocina;
- Determinar a estratégia ideal de fermentação submersa (batelada simples, batelada alimentada ou batelada sequencial) buscando aumento do rendimento e produção;
- Aumentar a produtividade por meio da aplicação de estratégias de engenharia metabólica e modificação genética da linhagem selecionada;
- Verificar a fermentabilidade de glicerina para produção de 1,3-propanodiol, empregando as condições otimizadas com glicerol;
- Separar 1,3-propanodiol do meio de cultivo e otimizar as condições de recuperação visando coeficiente de partição e rendimento de recuperação máximos.

Capítulo 4

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos que compõe esta tese foram divididos em duas fases. A primeira fase, constituída de seleção da linhagem e otimização do meio de cultivo, foi realizada nas dependências do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da Escola de Química na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ.

A segunda fase de experimentos, que dá continuidade à primeira, são todos os demais experimentos: desde a comparação do meio otimizado com outros meios empregados para o cultivo de *Clostridium* spp., passando pela determinação da melhor estratégia de fermentação e engenharia metabólica da linhagem selecionada, até a recuperação do produto do meio de fermentação. Esta segunda fase foi realizada nos Laboratórios do Departamento de Química e Engenharia Biomolecular (*William G. Lowrie Department of Chemical and Biomolecular Engineering*) na *The Ohio State University*, Columbus – OH.

4.1 SUBSTRATO, REAGENTES E MICRORGANISMOS

Os substratos utilizados neste trabalho foram: glicerol 99,5% (Sigma-Aldrich), glicerina ~48% (m/v), obtida por reação de transesterificação de óleo para obtenção de biodiesel (*Englefield Oil Company*, Heath – OH, EUA), e glicose pura (Sigma-Aldrich). O meio *Reinforced Clostridial Medium* (RCM) foi adquirido da empresa *Becton Dickinson and Company*. A milhocina empregada neste trabalho, líquida a 24°C, obtida do processamento úmido de milho, foi proveniente da empresa *Cargill*

Corn Milling Inc., Eddyville – IA, EUA. Todos os demais reagentes foram obtidos das empresas Sigma-Aldrich e Fisher.

As linhagens de *Clostridium* spp. utilizadas neste trabalho foram as disponíveis no LADEBIO, previamente adquiridas liofilizadas dos bancos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) e *American Type Culture Collection* (ATCC):

- *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228;
- *Clostridium beijerinckii* DSM 1739;
- *Clostridium beijerinckii* DSM 791;
- *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 2152;
- *Clostridium beijerinckii* ATCC 35702;
- *Clostridium butyricum* INCQS 00635.

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A determinação da concentração celular de cada linhagem foi realizada por turbidimetria, em que a massa seca é relacionada com a absorvância dando origem a uma curva padrão. A massa seca foi determinada a partir de uma dada suspensão de células, pipetando-se 10 alíquotas de 1 mL da suspensão celular em 10 eppendorfs, mantidos em estufa a 65°C até que o peso constante fosse atingido.

Para elaboração da curva padrão, foram preparadas várias diluições a partir da mesma suspensão de células utilizada para determinação da massa seca. As diluições foram analisadas em espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC spectrophotometer no LADEBIO e Schimadzu UV 1601 na *The Ohio State University)* a 600 nm, utilizando-se água destilada como branco.

4.3 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO PROCESSO

A produtividade volumétrica que consiste na taxa de formação de produto, foi calculada pela equação (4.1) (AIBA, HUMPHREY & MILLIS, 1973).

$$Q_P = \frac{(P - P_0)}{t_F} \tag{4.1}$$

Onde,

Q_P: Produtividade volumétrica de produto (g/L.h^{-1});

P: Concentração final de produto (g/L);

P_0: Concentração inicial de produto (g/L);

t_f: Tempo de fermentação (h).

As eficiências dos experimentos foram calculadas pela equação (4.2), considerando o rendimento máximo teórico alcançável em fermentações de glicerol por *Clostridium* spp. de 0,60 g de 1,3-propanodiol/g de glicerol (AIBA, HUMPHREY & MILLIS, 1973; BIEBL et al., 1992; MAERVOET et al., 2011).

$$EF = \frac{P}{T} \times 100 \tag{4.2}$$

Onde,

EF: Eficiência de fermentação (%);

P: Concentração final de produto (g/L);

T: Concentração de produto teórica, considerando eficiência de 100% (g/L).

O fator de rendimento de produção foi calculado pela equação (4.3) (AIBA, HUMPHREY & MILLIS, 1973 e SCHMIDELL et al., 2001).

$$Y_{P/S} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)} \tag{4.3}$$

Onde,

$Y_{P/S}$: Fator de rendimento de produção (g/g);

P: Concentração final de produto (g/L);

P_0: Concentração inicial de produto (g/L);

S_0: Concentração inicial de substrato (g/L);

S: Concentração final de substrato (g/L).

A redução percentual de substrato (RPS) foi calculada pela equação (4.4) (AIBA, HUMPHREY & MILLIS, 1973).

$$RPS = \frac{(S_0 - S)}{S_0} \times 100 \quad (4.4)$$

Onde,

RPS: Redução percentual de substrato (%);

S_0: Concentração inicial de substrato (g/L);

S: Concentração final de substrato (g/L).

A taxa específica de crescimento foi calculada pela equação (4.5) (AIBA, HUMPHREY & MILLIS, 1973; SCHMIDELL et al., 2001).

$$\mu x = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} \quad (4.5)$$

Onde,

μx: Taxa específica de crescimento (h^{-1});

X: Concentração de células (g/L);

t: Tempo (h).

O tempo de duplicação foi calculado pela equação pela equação (4.6) (AIBA, HUMPHREY & MILLIS, 1973).

$$td = \frac{Ln2}{\mu x} \quad (4.6)$$

Onde,

td: Tempo de duplicação (h);

μx: Taxa específica de crescimento (h^{-1}).

4.4 PREPARO E COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO

A todos os meios de cultivo foi adicionado 1 mL/L de solução de resazurina previamente preparada na concentração de 1% (m/v). Essa solução atua como indicador da presença de oxigênio no meio. Após o preparo, os meios foram distribuídos em frascos de penicilina e aspergidos com N_2, durante 5 minutos, para obtenção de anaerobiose. Em seguida os frascos foram lacrados e esterilizados em

autoclave a 0,5 atm por 20 minutos.

Todos meios preparados em biorreator foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 30 minutos e aspergidos com N_2, durante 30 minutos após a esterilização e sempre que necessário (durante as alimentações e trocas de meio), para manutenção das condições anaeóbias do processo fermentativo.

4.4.1 Meios de Hidratação e Estoque das Linhagens

O meio utilizado para a hidratação das linhagens foi o *Reinforced Clostridial Medium* (RCM), cuja composição está descrita na tabela 4.1. O RCM é o meio de cultivo recomendado pela ATCC e utilizado para manutenção de *Clostridium* spp. pela maioria dos autores que trabalham com espécies desse gênero (BARBIRATO et al., 1996; BIEBL et al., 1992; CHATZIFRAGKOU et al., 2011; GONZALEZ et al., 2004; GÜNZEL, YONSEL & DECKWER, 1991; RODRIGUES & VINHAS, 2011; POWALOWSKA, 2015; WISCHRAL et al. 2015).

Tabela 4.1: Composição do meio RCM utilizado na hidratação e manutenção de *Clostridium* spp..

Componente	Concentração (g/L)
Peptona	10,00
Extrato de carne	10,00
Extrato de levedura	3,00
Cloreto de sódio	5,00
Cisteína	0,50
Acetato de sódio	3,00
Ágar	0,50
Glicose	5,00
Amido	1,00

A hidratação das células liofilizadas foi realizada em frascos de penicilina, com volume de meio (RCM) de aproximadamente 20 mL, previamente preparado, esterilizado e livre de oxigênio, mantido em estufa a 37°C até que ocorresse o crescimento celular, observado pela turvação do meio. Ao constatar que houve crescimento celular, a suspensão foi inoculada em um meio novo de RCM de maior

volume (50 mL), para propagação celular e posterior preparo dos estoques de manutenção das linhagens.

Após a hidratação, as células foram inoculadas sucessivamente em frascos de penicilina, em volumes crescentes deste mesmo meio, e mantidas em Shaker (*New Brunswick Scientific – Edison* N. J., USA) a 37ºC, 80 rpm por 5 dias. A suspensão celular foi centrifugada à 3.300 × g por 20 minutos a 10ºC e ressuspensa em metade do seu volume inicial de RCM, complementado com 30% (v/v) de glicerol, que atuou como agente crioprotetor durante o congelamento. Essa nova suspensão foi distribuída em criotubos e estocada a -80ºC. Para as etapas posteriores se utilizou o conteúdo de um criotubo como inóculo.

4.4.2 Meios de Ativação e Propagação

Os meios foram preparados, em frascos de 100 mL de volume nominal e 70 mL de volume reacional, conforme composição da tabela 4.2. A formulação continha os mesmos componentes do RCM com exceção de glicose e do amido que foram substituídos por glicerol.

Tabela 4.2: Composição dos meios de ativação e propagação para *Clostridium* spp.

Componente	Concentração (g/L)
Peptona	10,00
Extrato de carne	10,00
Extrato de levedura	3,00
Cloreto de sódio	5,00
Cisteína	0,50
Acetato de sódio	3,00
Ágar	0,50
Glicerol	5,00

Ao meio de ativação foi inoculado 1 mL de suspensão estoque (-80ºC) e esse sistema foi mantido a 37ºC, 80 rpm (Figura 4.1), até que fosse obtida uma suspensão com aproximadamente 2,0 g/L de células. Para a propagação, 10% (v/v) do cultivo de ativação foi transferido para um frasco de 100 mL contendo 50 mL de

meio previamemte preparado. Novamente, esse cultivo foi mantido a 37ºC e 80 rpm.

Figura 4.1: Ativação e propagação em frascos agitados (80 rpm) a 37°C, agitador rotatório fabricado pela *New Brunswick Scientific* – Edison N. J., U.S.A.

4.5 *SCREENING* DA ASSIMILAÇÃO DE GLICEROL POR *Clostridium* spp. VISANDO À PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

As linhagens de *Clostridium* spp., assim como os meios de ativação e propagação empregados nesse trabalho foram as previamente descritas, respectivamente, nos itens 4.1 e 4.4 desse capítulo.

A formulação do meio de produção, usado no *screening* das linhagens, foi baseada no levantamento dos nutrientes que apareciam com mais frequência nas publicações, relacionadas à utilização de glicerol por *Clostridium* spp. Adicionou-se 10,0 g/L de glicerol, como única fonte de carbono (Tabela 4.3).

Os meios preparados e foram distribuídos em frascos de penicilina, 100 mL de volume nominal e 70 mL de volume reacional. As fontes de fofatos foram autoclavadas separadamente dos demais componentes do meio para evitar a precipitação.

A inoculação da bactéria, em cada fase de preparação do inóculo, conforme LIMA et al. (2001), foi executada de acordo com o desenvolvimento da bactéria e pela queda de concentração do substrato, o glicerol. Quando a concentração celular chegou no meio da sua fase exponencial, e quando aproximadamente metade do glicerol inicial havia sido consumido, o inóculo foi transferido do frasco de ativação para o de propagação.

Tabela 4.3: Composição do meio de produção empregado nos experimentos de *screening* de *Clostridium* spp..

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	1,00
Acetato de sódio	0,01
KH_2PO_4	0,50
K_2HPO_4	0,50
$MgSO_4.7H_2O$	0,20
$MnSO_4.H_2O$	0,01
$FeSO_4.7H_2O$	0,01
Glicerol	12,00

Os perfis de crescimento, nas etapas de ativação e propagação, para cada linhagem, foram obtidos retirando-se alíquotas do meio a cada três horas para análise da concentração celular por turbidimetria e do consumo do glicerol pelo kit enzimático (TG Color - GPO/PAP AA, Wiener lab.).

As células foram inoculadas do meio de propagação para o meio de produção, 20% (v/v), no meio da fase exponencial de crescimento celular. Os perfis de crescimento e produção de cada linhagem, foram obtidos retirando-se alíquotas em intervalos regulares (a cada ~5 horas), para determinação da concentração celular por turbidimetria e quantificação da produção de 1,3-propanodiol e ácidos, por análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Ao final de cada cultivo de ativação, propagação e produção foi verificada a ausência de contaminação de por outros grupos bacterianos, de cada linhagem, utilizando a técnica de coloração de Gram. A linhagem com os melhores resultados de produção de 1,3-propanodiol, produtividade e RPS foi a selecionada para otimização do meio de fermentação.

4.6 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR *C. beijerinckii* DSM 791

Uma sequência de três planejamentos experimentais foi utilizada na otimização do meio de fermentação, visando melhorar a produção de 1,3-propanodiol e o consumo de glicerol por *C. beijerinckii* DSM 791. Os meios foram

preparados em frascos de penicilina de 100 mL e com volume reacional de 70 mL. Após ativação e propagação, adicionou-se 20% (v/v) de inóculo na etapa de produção e os cultivos foram mantidos a 37°C e 80 rpm.

A quantificação de substratos e produtos foi obtida por CLAE e a concentração celular por turbidimetria. O tratamento estatístico dos resultados foi realizado empregando-se o *software* STATISTICA, versão 6.0 (StatSoft, Inc.) incluindo análise de variância (ANOVA), para obtenção da significância de cada termo além de determinar as interações entre as variáveis dependentes e independentes.

A qualidade do modelo polinomial foi constatada pela determinação do coeficiente R^2, e a sua significância estatística verificada pelo teste-*F* considerando intervalo de confiança de 95% ou valor de *p* menor que 0,05 (MAEDA et al., 2009; RODRIGUES & VINHAS, 2011). Por causa do grande número de variáveis do meio de fermentação o primeiro delineamento experimental, de *Plackett-Burman* foi escolhido para identificar quais variáveis tem significância na produção de 1,3-propanodiol. Esse delineamento é baseado em um polinômio de primeira ordem, de acordo com a equação (4.7) (PLACKETT & BURMAN, 1946; MANGAYIL et al., 2015):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \qquad (4.7)$$

Onde,

Y: Variável de resposta;

β_0: Ponto de interceptação do modelo;

β_i: Coeficiente da equação linear;

X_i: Nível da variável independente.

A influência de doze componentes foi analisada: ureia, extrato de levedura, $C_2H_3NaO_2$, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, glicerol, ácido butírico, glicose e $CaCO_3$. Cada variável foi analisada em dois níveis, máximo e mínimo, codificados respectivamente como “−1” e “+1”, e três réplicas nos pontos centrais, codificados como “0” (Tabela 4.4) totalizando 19 ensaios. As concentrações utilizadas foram definidas com base no ponto central que foi estabelecido de acordo com as condições encontradas na literatura.

Tabela 4.4: Fatores e níveis usados no delineamento de *Plackett-Burman* na otimização do meio de produção para *C. beijerinckii* DSM 791.

	Fator (g/L)	Mínimo -1	Ponto central 0	Máximo +1
x_1	Ureia	0,50	1,50	3,00
x_2	Extrato de levedura	0,50	1,50	3,00
x_3	$C_2H_3NaO_2$	0,005	0,01	0,05
x_4	KH_2PO_4	0,10	0,50	1,50
x_5	K_2HPO_4	0,20	2,00	4,00
x_6	$MgSO_4.7H_2O$	0,10	0,20	0,40
x_7	$MnSO_4.H_2O$	0,005	0,01	0,02
x_8	$FeSO_4.7H_2O$	0,01	0,30	0,50
x_9	Glicerol	5,00	35,00	70,00
x_{10}	Ácido butírico	0,20	0,50	2,00
x_{11}	Glicose	0,00	6,00	12,00
x_{12}	$CaCO_3$	0,30	1,00	2,00

Selecionados os constituintes do meio, pelo delineamento *Plackett-Burman*, a segunda etapa da sequência de planejamentos foi um delineamento fatorial fracionado (2^{6-2}), para encontrar os fatores de influência significativa para a produção de 1,3-propanodiol. Assim, neste delineamento as variáveis independentes foram: extrato de levedura, $C_2H_3NaO_2$, K_2HPO_4, ureia, $MgSO_4.7H_2O$ e glicerol; e a variável dependente foi a produção de 1,3-propanodiol.

Cada variável foi analisada em 2 níveis, mínimo e máximo, codificados respectivamente como “−1” e “+1”, e três réplicas do ponto central codificadas como “0” (Tabela 4.5) totalizando 19 ensaios.

Com os resultados da segunda etapa da otimização do meio, um Delinemaneto Central Composto Rotacional (DCCR) foi utilizado para maximizar a produção de 1,3-propanodiol e RPS usando a metodologia de superfície de resposta. Os resultados do delineamento fatorial fracionado permitiram fixar as concentrações de extrato de levedura e $C_2H_3NaO_2$ para o DCCR em 0,5 g/L e 0,005 g/L, respectivamente.

Tabela 4.5: Fatores e níveis usados no delineamento fatorial fracionado (2^{6-2}) na otimização do meio de produção para *C. beijerinckii* DSM 791.

Fator (g/L)		Mínimo -1	Ponto central 0	Máximo +1
x_1	Ureia	0,00	0,50	1,00
x_2	Extrato de levedura	0,50	1,50	3,00
x_3	$C_2H_3NaO_2$	0,005	0,01	0,05
x_4	K_2HPO_4	0,20	2,00	4,00
x_5	$MgSO_4.7H_2O$	0,00	0,10	0,20
x_6	Glicerol	5,00	10,00	20,00

As variáveis independentes K_2HPO_4 e glicerol, definidas pelo delineamento fatorial fracionado, foram analisadas nos pontos de mínimo e máximo, pontos centrais e pontos axiais totalizando 12 ensaios. As concentrações de K_2HPO_4 e glicerol variaram respectivamente, de 0,5 g/L a 5,0 g/L e de 2,0 g/L a 12,0 g/L (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Fatores e níveis usados no DCCR na otimização do meio de produção para *C. beijerinckii* DSM 791.

Fator (g/L)		Axial -1,41	Mínimo -1	Ponto Central 0	Máximo +1	Axial +1,41
x_1	K_2HPO_4	0,50	0,90	2,60	4,30	5,00
x_2	Glicerol	2,00	3,50	7,00	10,50	12,00

O fundamento do método DCCR, para variáveis quantitativas, é a obtenção de funções de predição de primeira (linear) e segunda (quadrática) ordem para uma ou mais variáveis, de modo que permita examinar as características da superfície e decidir a ação apropriada (CALADO & MONTGOMERY, 2003). Uma equação polinomial, conforme a descrita na equação 4.8, foi proposta para descrever a relação matemática entre as variáveis dependentes e independentes (MANGAYIL et al., 2015).

$$Y = \beta_0 + \beta_1.x_1^2 + \beta_2.x_2^2 + \beta_3.x_1 + \beta_4.x_2 + \beta_5.x_1.x_2 \quad (4.8)$$

Onde,

Y: Variável de resposta;

β_n: Coeficientes;

x_n: Variáveis independentes.

4.6.1 Validação do Meio Ótimo de Produção

Para validar a condição ótima predita foi utilizada a função *Desirability* utilizando o programa Statistica 6.0. Esta função estatística busca a combinação dos fatores, de forma que todas as variáveis de resposta sejam maximizadas simultaneamente. O valor *Desirability* (D) tem uma amplitude que varia de 0 a 1, onde D=1 corresponde à plena obtenção dos objetivos e D=0 corresponde à impossibilidade de satisfação dos objetivos (CALADO & MONTGOMERY, 2003). As variáveis otimizadas por esta função foram K_2HPO_4 e glicerol.

Os ensaios de validação das condições ótimas apontadas pelo modelo, para *C. beijerinckii* DSM 791, foram realizadas a 37°C, em frascos de penicilina (em triplicata) e também em biorreator mecanicamente agitado. A formulação dos meios de ativação e propagação empregados estão descritas na tabela 4.2. A composição dos meios de produção utilizada nas validações foi aquela otimizada pela sequência de planejamentos: 10 g/L de glicerol, 0,5 g/L de extrato de levedura, 0,005 g/L de $C_2H_3NaO_2$ e 5 g/L de K_2HPO_4.

As condições utilizadas na validação em frascos foram: volume nominal de 100 mL, reacional de 70 mL e após ativação e propagação, adição de 20% (v/v) de inóculo na etapa de produção.

A validação em biorreator constituiu-se de ativação em frascos de penicilina, seguida de propagação e produção em biorreator. As condições da ativação foram: 100 mL de volume nominal, 70 mL de volume reacional e 10 % (v/v) de inóculo. A propagação foi feita em biorreator com capacidade nominal de 1,5 L, volume reacional de 1L e 100 rpm (Biostat B B. Braun Biotech. Int.). O período de propagação foi de 10 horas e, após esse período o meio foi transferido para frascos estéreis com posterior centrifugação à 2.800 × g por 10 minutos (Thermo Scientific Lynx 4000).

Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, deixando apenas a quantidade necessária para solubilizar as células e inocula-las em biorreator,

contendo 0,8 L de meio de produção (1,5 L volume nominal) e 100 rpm. Na figura 4.2 é apresentado o esquema dessa validação em biorreator.

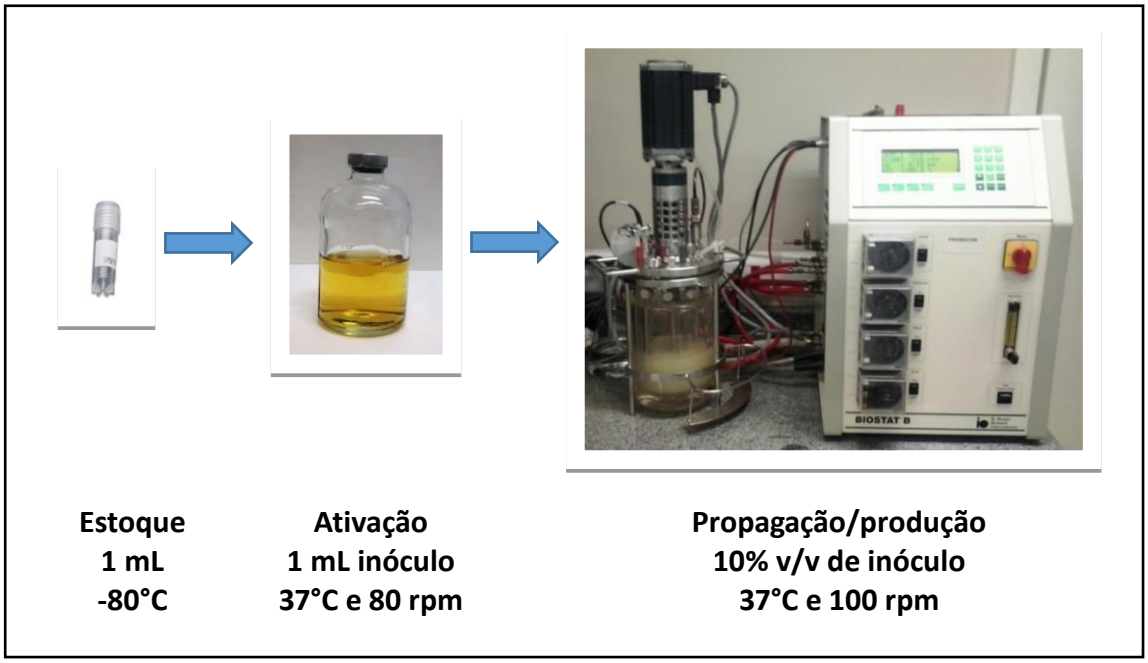

Figura 4.2: Etapas e condições do processo de obtenção de ácidos e 1,3-propanodiol em biorreator mecanicamente agitado por *C. beijerinckii* DSM 791 a partir de glicerol.

A quantificação da concentração de glicerol durante o processo fermentativo foi feita pelo método enzimático, assim possível a determinação do momento exato da passagem da etapa de propagação para produção. Ao final da fermentação, as amostras da etapa de produção, desta validação em biorreator, também foram analisadas em CLAE para o delineamento dos perfis de consumo de glicerol, formação de 1,3-propanodiol e ácidos e para comparar esses dois métodos de determinação de glicerol.

4.6.2 Comparação do Meio Otimizado com Outros Meios Tradicionalmente Empregados para *Clostridium* spp.

Utilizando glicerol como única fonte de carbono, foram conduzidos experimentos empregando as mesmas condições experimentais das fermentações em frascos da etapa anterior, para *C. beijerinckii* DSM 791, alterando-se apenas a

composição dos meios.

Comparou-se os resultados de produção de 1,3-propanodiol, rendimento, RPS e produtividade; do meio otimizado neste trabalho com outros meios tradicionalmente empregados para fermentações por *Clostridium* spp.: P2 (FORMANEK, MACKIE & BLASCHEK, 1997; AGUILAR & ARIAS, 2013) e CGM (HEAP et al., 2009; YU et al., 2015; XU et al., 2015). Na tabela 4.7 são apresentadas as composições desses meios.

Tabela 4.7: Composição dos diferentes meios de produção utilizados no cultivo de *C. beijerinckii* DSM 791.

Componente (g/L)	Otimizado	P2	CGM
Glicerol	10,00	10,00	10,00
Extrato de levedura	0,50	1,00	1,00
$C_2H_3NaO_2$	0,005	-	-
K_2HPO_4	5,00	0,50	0,50
KH_2PO_4	-	0,50	0,50
Acetato de amônio	-	2,20	-
Sais minerais[1]	-	+	-
Vitaminas[2]	-	+	-
Triptona	-	-	2,00
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	2,00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	0,10
Tracos de minerais[3]	-	-	+

[1] Sais minerais: 0,20 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,01 g/L NaCl.
[2] Vitaminas: 1,00 mg/L ácido p-amino-benzoico, 1,00 mg/L tiamina e 0,010 mg/L biotina.
[3] Traços de minerais: 1,00 g/L NaCl, 0,01 g/L $MnSO_4$, 0,004 g/L ácido p-aminobenzóico, 0,01 g/L $FeSO_4$ e 2,00 g/L asparagina.

4.7 OTIMIZAÇÃO DO pH PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR *C. beijerinckii* DSM 791

Com base nos resultados dos ensaios anteriores o meio otimizado foi o selecionado para ser empregado nas próximas etapas do trabalho. Os experimentos de otimização do pH foram conduzidos em biorreator mecanicamente agitado de volume nominal de 1 L e volume reacional de 500 mL, com *C. beijerinckii* DSM 791,

adição de 10% (v/v) de inóculo, a 37°C e 100 rpm.

A estratégia de fermentação empregada foi de batelada alimentada. Iniciou-se a fermentação com 10 g/L de glicerol e foram feitas duas alimentações de 10 g/L de glicerol cada, assim que o glicerol do meio foi totalmente consumido. As faixas de estudo do pH foram: 4,8 (sem controle de pH), 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,0; controlado por da adição de solução de NH_4OH.

4.7.1 Aumento da Concentração de Glicerol Adicionando ao Meio

Para melhorar a produção de 1,3-propanodiol por *C. beijerinckii* DSM 791, o rendimento, o RPS e a produtividade foram realizados experimentos em frascos utilizando formulação do meio otimizado, 20% (v/v) de inóculo, 37°C, 80 rpm, adicionando-se 20 g/L de $CaCO_3$, para manter o pH nos frascos entre 5,5 e 6,0, e variando-se a concentração de glicerol de 10,0 g/L a 60,0 g/L.

4.8 ADIÇÃO DE GLICOSE COMO CO-SUBSTRATO

A adição de glicose utilizando os diferentes tipos de meios também foi avaliada em frascos e em biorreator mecanicamente agitado. Em frascos de penicilina, duas séries de experimentos foram conduzidas, empregando-se as mesmas condições experimentais das fermentações em frascos da etapa anterior, para *C. beijerinckii* DSM 791, desta vez adicionado-se apenas glicose em diferentes concentrações.

Na primeira série de experimentos em frascos foram adicionadas 10,0 g/L de glicose aos meios: otimizado, P2 e CGM. Na segunda série de experimentos foi empregado apenas o meio otimizado com 30,0 g/L de glicerol e glicose nas concentrações de 0,0 g/L a 15,0 g/L.

Em biorreator mecanicamente agitado a adição de glicose foi avaliada adicionando-se inicialmente apenas glicose (~18 g/L) como fonte de carbono. Uma vez consumida totalmente a glicose, adicionou-se glicerol na concentração de ~22,0 g/L. As condições desta fermentação foram: 10% (v/v) de inóculo, volume nominal de 1 L, volume reacional de 0,5 L, 37°C e 100 rpm.

4.9 SUBSTITUIÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA POR MILHOCINA

A milhocina é um subproduto da indústria de moagem úmida do milho, já foi utilizada em as fermentações com *Clostridium* spp., como fonte de nitrogênio em substituição ao extrato de (PAREKH, FORMANEK & BLASCHEK, 1999; MADDIPATI et al., 2011).

Visando a melhora da produção, produtividade e RPS, avaliou-se a substituição do extrato de levedura por milhocina em fermentações de glicerol por *C. beijerinckii* DSM 791, em frascos e em biorreator mecanicamente agitado. Em experimentos realizados em frascos a concentração de milhocina adicionada foi otimizada, variando-se sua concentração de 0,0 g/L (0,5 g/L de extrato de levedura) a 90,0 g/L. Ao meio otimizado, adicionou-se 20 g/L de $CaCO_3$ para manutenção do pH entre 5,5 e 6,0; 30 g/L de glicerol como fonte de carbono, 20% (v/v) de inóculo, a 37°C e 80 rpm.

Em biorreator, foram conduzidos experimentos com *C. beijerinckii* DSM 791, utilizando extrato de levedura (0,5 g/L, concentração do meio otimizado no item 4.6) e milhocina (30 g/L, concentração otimizada em frascos); o pH foi mantido com a adição de NH_4OH, adicionou-se 30 g/L de glicerol, 20% (v/v) de inóculo, a 37°C e 80 rpm.

4.9.1 Influência do Ácido Lático

O ácido lático presente na milhocina tamém influenciar na fermentação. Avalivou-se portanto o efeito da adição de ácido lático, também em frascos, variando-se sua concentração de 0,0 g/L a 10,0 g/L, com *C. beijerinckii* DSM 791, empregando meio otimizado adicionado de 30 g/L de glicerol, 20% (v/v) de inóculo e 20 g/L de $CaCO_3$; a 37°C e 80 rpm.

A fim de melhor estudar o efeito da substituição do extrato de levedura por milhocina, os balanços estequiométrico e redox foram calculados para as fermentações com diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura e milhocina), pela relação C-mol/Cmol que consiste em uma metodologia proposta por VILLADSEN, NIELSEN & LIDÉN (2011). A equação estequiométrica/ balanço redox para o crescimento da biomassa (X) pode ser descrita por mol de carbono de glicose = CH_2O (fórmula mínima da glicose $C_6H_{12}O_6$), equação (4.9):

$$-CH2O - YO2 - YNH3 - YS - \cdots + YP + YX + YCO2 + YH2O = 0 \quad (4.9)$$

Onde,

Yc: Coeficiente de rendimento de cada componente (g/g);

S: Outros substratos que não glicose;

P: Produto;

X: Células.

Todas as taxas foram calculadas em função do consumo de 1 mol de carbono (C-mol). O grau de redutibilidade de cada componente da equação foi calculado multiplicando-se cada elemento pelas respectivas valências (Tabela 4.8). De acordo com VILLADSEN, NIELSEN & LIDÉN (2011) considera-se $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$ como a fórmula elementar para as células.

Tabela 4.8: Grau de redutibilidade de cada componente da fermentação propanodiólica utilizados nos balanços estequiométrico e redox.

Componente	Fórmula elementar	Fórmula (C-mol)	Grau de redutibilidade
Glicerol	$C_3H_8O_3$	$CH_{2,66}O$	4,67
1,3-propanodiol	$C_3H_8O_2$	$CH_{2,66}O_{0,66}$	5,34
Células	$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$	$CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$	4,20
Ácido lático	$C_3H_6O_3$	CH_2O	4,00
Ácido butírico	$C_4H_8O_2$	$CH_2O_{0,5}$	5,00
Ácido acético	$C_2H_4O_2$	CH_2O	4,00

4.10 EMPREGO DE BATELADA ALIMENTADA EM BIORREATOR MECANICAMENTE AGITADO

Em biorreator mecanicamente agitado realizou-se uma fermentação em batelada alimentada, volume nominal de 1 L e reacional de 0,5 L, com *C. beijerinckii* DSM 791 e adicionou-se 10% (v/v) de inóculo. Empregou-se o meio otimizado, com 30 g/L de glicerol, 30 g/L de milhocina, a 37°C, 100 rpm e pH controlado com a adição de NH_4OH.

4.11 EFEITO DA ADIÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL NO MEIO DE FERMENTAÇÃO

O efeito do 1,3-propanodiol exógeno na fermentação foi investigado em experimentos conduzidos em frascos com meio otimizado, 30 g/L de glicerol, com *C. beijerinckii* DSM 791, variando-se a concentração de 1,3-propanodiol adicionada de 0,0 a 50,0 g/L no início da fermentação, 20% (v/v) de inóculo, adicionando-se 20 g/L de $CaCO_3$, a 37°C e 80 rpm.O 1,3-propanodiol produzido foi calculado por diferença, ou seja, da concentração final da fermentação foi diminuído o 1,3-propanodiol adicionado no início.

4.12 EMPREGO DE BATELADA SEQUENCIAL EM BIORREATOR DE LEITO FIBROSO (FBB)

A estratégia de bateladas sequenciais foi investigada, utilizando-se o meio otimizado, com 20 g/L de glicerol, 30 g/L de milhocina, 10% (v/v) de inóculo, a 37°C, 100 rpm, pH 5,5 e empregando do *fibrous-bed bioreactor* (FBB), para *C. beijerinckii* DSM 791, manteve-se a condição de anaerobiose com injeção de N_2 por 20 minutos a cada batelada. O FBB consite em um sistema que associa o biorreator tradicional com a imobilização de células (Figura 4.3) (YANG & ZHAO, 2013).

Para construir o FBB, um pedaço de tecido de algodão (atoalhado), aproximadamente 27 cm × 25 cm, foi enrolado em espiral em conjunto com uma malha de aço inoxidável e acoplada dentro de uma coluna de vidro encamisada. Essa coluna foi conectada ao biorreator de forma que, com o auxílio de bombas peristálticas, o meio de cultura escoa de forma ascendente nessa coluna (YANG & ZHAO, 2013). O volume de trabalho nesse sistema foi de 700 mL e foi mantido a temperatura de 37°C, 100 rpm e pH entre 5,5 e 6,0.

O sistema se iniciou com a adição do cultivo de ativação 10% (v/v). A fermentação se inicia sem a circulação pelo FBB e após ~15 horas, quando a concentração de células atingiu cerca de 4,0 g/L, se iniciou a circulação do meio pelo FBB a uma taxa de 16 mL/minuto. Assim que todo o glicerol foi consumido o meio foi drenado (80% de todo volume reacional) e um novo meio foi bombeado para o sistema. A verificação do consumo do glicerol durante o processo foi feito por análise de CLAE. Durante esse processo as células fixadas no FBB foram usadas como ativação para cada batelada subsequente (YANG & ZHAO, 2013).

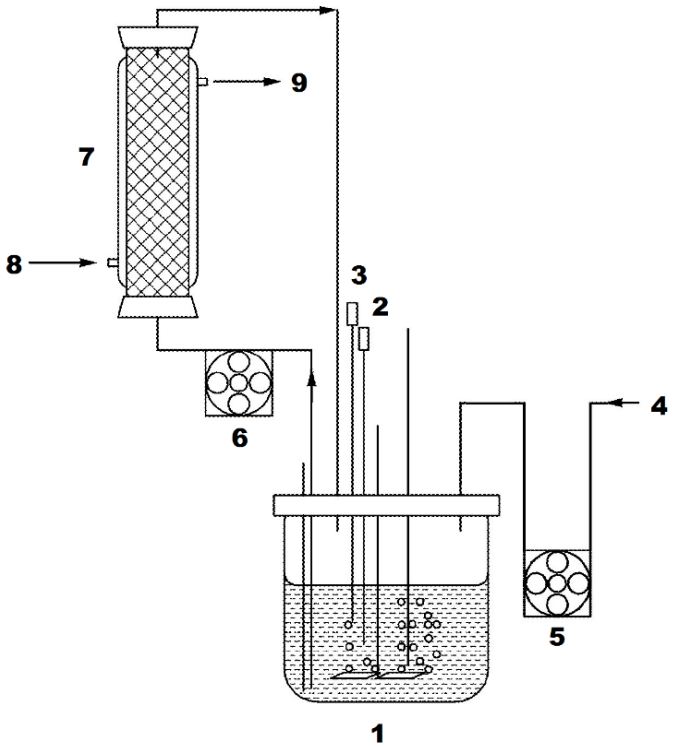

Figura 4.3: Sistema FBB. **1**: Fermentador, **2**: Unidade de controle de temperatura, **3**: Unidade de controle de pH, **4**: Adição de solução de NH_4OH, **5** e **6**: bombas peristáticas, **7** FBB, **8**: Entrada de água e **9**: Saída de água (YANG & ZHAO, 2013).

4.13 ENGENHARIA METABÓLICA DE *C. beijerinckii* DSM 791 PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL

4.13.1 Obtenção da Recombinante - *C. beijerinckii* A1

A primeira e segunda reações da via oxidativa, catalisadas pela glicerol desidrogenase (GDH) e dihidroxiacetona quinase (DHAK), geram o poder redutor necessário para a via redutiva de produção de 1,3-propanodiol (SUN et al., 2003). Logo, aumentando a expressão dessas enzimas, teoricamente, mais NADH será fornecido à produção de 1,3-propanodiol.

O trabalho desenvolvido, nesta etapa para a obtenção da recombinante, neste trabalho chamada de *C. beijerinckii* A1, foi a inserção de duas sequências de genes de interesse no plasmídeo pMTL82151, previamente construído por pesquisadores do grupo de pesquisa da *The Ohio State University*. Cada módulo deste plasmídeo, foi escolhido de modo a possibilitar a expressão de enzimas de bactérias Gram-

negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*Clostridium* spp.), tornando a aplicação do mesmo mais abrangente.

Os genes *gldA* e *dhaKLM*, clonados em *E.coli* CA434 foram amplificados por PCR (Termociclador Mastercycler Eppendorf), de acordo com os ciclos descritos na tabela 4.9, utilizando os *primers* descritos na figura 4.4. A sequencia de *gldA* foi ligada primeiramente a pMTL82151, digerido com BamHI e SacII, e então *dhaKLM* foi inserido no sítio SacII. A co-expressão destes dois genes foi conduzida por uma tiolase (*Pthl*) promotora de *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 *(Genebank* no. HM989902), o local original de ligação do ribossomo em cada gene foi substituído pela sequência "AGGAGG" para otimizar a expressão (YU et al., 2015). Esta sequência “AGGAGG” é um sítio de ligação ribossomal presente no RNA mensageiro procariótico, geralmente localizado em torno de 8 bases a montante do códon de iniciação “AUG”; e ajuda no recrutamento do ribossomo ao RNA mensageiro para iniciar a síntese de proteínas, alinhando o ribossomo com o códon de iniciação (SD).

Tabela 4.9: Condições empregadas na amplificação da sequência de DNA por PCR para a construção da recombinante.

Etapa		Temperatura (°C)	Tempo (s)
Desnaturação inicial		98	10
	Desnaturação	98	10
32 ciclos	Anelamento	55	20
	Extensão	72	180
Extensão final		72	300

O plasmídeo pMTL82151-gldA-dhaKLM foi construído em *E. coli* CA434 pela inserção sequencial dos genes, de *E. coli*, *gldA* (glicerol desidrogenase - GDH) e *dhaKLM* (dihidroxiacetona quinase - DHAK) no sitio de restrição SacII (Figura 4.5) do plasmídeo pMTL82151 (YU et al., 2012), utilizando o kit de clonagem de infusão Clontech (*Clontech Laboratories*, Inc., Mountain View, CA). Essa construção teve como objetivo aumentar a expressão desses genes e possivelmente a atividade das enzimas por eles codificadas.

rbs *gldA* FOR: ATTTAAATTTGGATCCAGGAGG AGGAGCAATTATGGACCGCA
Rev *gldA*: GAAACAGCTATGACCGCGGTTATTCCCACTCTTGCAGGAAACGC

rbs *DhaKLM* FOR: AGAGTGGGAATAA CC AGGAGG GAGCAAAATAATGAAAAAATTGATCAATG
Rev *DhaKLM*: GAAACAGCTATGACCGCGGTTAACCCTGACGGTTGAAACGTTGC

Figura 4.4: Sequência dos genes iniciadores. Destacados em: vermelho a sequência do plasmídeo, azul o sítio de restrição, branco a sequência Shine-Dalgarno (SD), verde o gene alvo e amarelo o fragmento de gene de *E.coli*.

As células transformadas de *E. coli* CA434 foram cultivadas e submetidas à PCR. Os fragmentos de DNA obtidos foram purificados em gel empregando High-Fidelity DNA Polymerase (*New England BioLabs Inc.*). Assim como feito por LI, TENG & XIU (2011), a confirmação do plasmídeo construído foi feita duas vezes, por meio de digestão pelas enzimas de restrição EcoRV e SacII. Confirmada a construção correta do plasmídeo em gel, a transformação/introdução do plasmídeo em *C. beijerinckii* DSM 791 foi feita pelo método de conjugação conforme descrito previamente por YU et al. (2015).

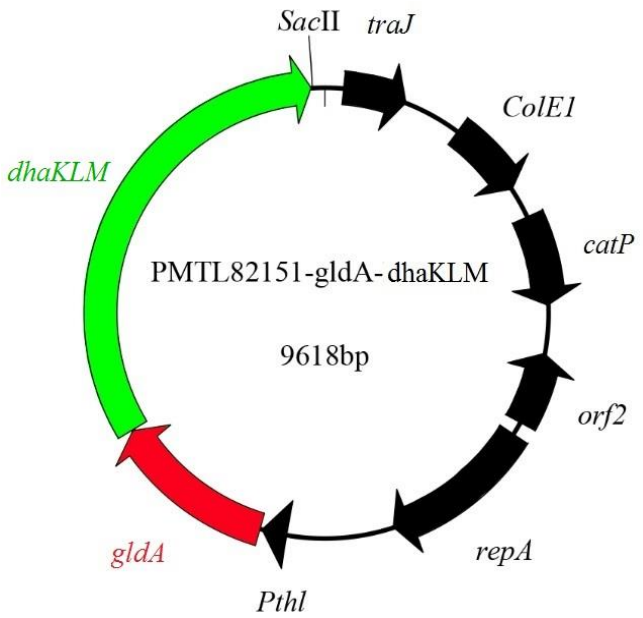

Figura 4.5: Mapa do plasmídeo com as sequências *gldA* (GDH) e *dhaKLM* (DHAK). SacII: site de restrição; *traJ* +*ColE1*: replicação Gram-; *catP*: gene de resistência a antibiótico; *orf2*: sequência de codificação (CDS); *repA*: replicação Gram+; *Pthl*: promotor de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755.

A transformação por conjugação é realizada por meio do cultivo aeróbio de *E. coli* CA434 portadora dos plasmídeos a serem transformados, em meio Luria-Bertani (LB) fornecido pela Fisher (Tabela 4.10) contendo 25 µg/mL cloranfenicol, a 37°C por um período de aproximadamente 20 horas (OD_{600} entre 1,5–2,0). A suplementação do meio LB com cloranfenicol é feita após esterilização sob temperatura máxima de 55°C.

Tabela 4.10: Composição do meio *Luria-Bertani* LB, utilizado para o cultivo de *E. coli* em frascos e em placas.

Componente	Concentração (g/L)
Triptona	10,00
Extrato de levedura	5,00
NaCl	10,00

As células de *E. coli* CA434 foram então centrifugadas à 4.000 × g por 2 minutos, lavadas com 1 mL de solução salina tamponada de fosfato (PBS) e misturadas com 200 µL de células de *C. beijerinckii* DSM 791 previamente ativadas em frascos, anaerobiamente, a 37°C durante, aproximadamente, 20 horas. A mistura foi pipetada para placas ágar, previamente preparadas com meio RCM ágar (com antibiótico), complementado de 5,0 g/L de glicerol e mantidas em câmara anaeróbia, por no mínimo 24 horas para garantir a ausência de oxigênio. Após inoculadas, as placas foram incubadas em câmara anaeróbia a 37°C por 8-24 horas.

As colônias obtidas foram coletadas, re-suspendidas em 1 mL de PBS e espalhadas em placas de meio RCM ágar (com antibiótico), com 5,0 g/L de glicerol e 30 µg/mL tianfenicol para seleção. As placas foram incubadas por 2-3 dias para obtenção das colônias. As recombinantes positivas foram confirmadas por análise da PCR, isoladas, selecionadas e estocadas a -80°C.

4.13.2 Análise da Expressão do Gene por Transcrição Reversa (RT)-PCR

A RT-PCR foi utilizado para confirmar a expressão dos genes *gldA* e *dhaKLM* na *C. beijerinckii* A1. Para a extração e purificação do RNAm, primeiramente, as células foram cultivadas em meio CGM contendo 20 g/L de glicerol como fonte de carbono e 30 ug/mL tianfenicol por 16 horas.

A partir das células coletadas, o RNAm foi extraído e purificado utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). As reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando o SuperScript III One-Step RT-PCR System Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), com os *primers* descritos na figura 4.6 e as condições na tabela 4.11. O RNA extraído das células de *C. beijerinckii* DSM 791 foi usado como controle negativo.

gldA FOR: CCAAAGCACTGGCACATTTC
Rev *gldA*: CGCCGGGACATCTTCTTTAATA

dhak FOR: GGAGAAGGTGTCGGTGAATTAG
Rev *dhak*: CTCTCTGGTGTGACGCATTT

Figura 4.6: Sequência de genes iniciadores para RT-PCR, para confirmação da expressão dos genes *gldA* e *dhaKLM*.

Tabela 4.11: Condições empregadas na amplificação do RNAm pela RT-PCR.

Etapa		Temperatura (°C)	Tempo (s)
Síntese de cDNA		65	1800
Desnaturação inicial		94	120
42 ciclos	Desnaturação	95	15
	Anelamento	65	60
	Extensão	68	60
Extensão final		68	300

4.13.3 Determinação da Atividade Enzimática da GDH

C. beijerinckii DSM 791 e *C. beijerinckii* A1 foram cultivadas em meio RCM, a 37°C, por 24 h. As células foram recolhidas, lavadas, re-suspensas em tampão de fosfato (20 mM, pH 7,5) e sujeitas a sonicação (Fisher Scientific o Sonic Dismembrator Modelo 100) para rompimento das membranas das células. O lisado celular obtido foi centrifugado à 13.000 × g durante 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido para medir a atividade da enzima GDH com o kit de determinação enzimática *Assay Procedure for Glycerol Dehydrogenase* (Sigma-Aldrich).

A quantificação enzimática da GDH pelo kit se inicia com a adição de 34 µL de lisado celular ou do tampão de fosfato (controle negativo) em 966 µL de solução de ensaio (pH 10), contendo: 0,20 M tampão de bicarbonato, 0,30 M glicerol, 10 mM de NAD^+ e 0,30 M sulfato de amônio. A mudança de OD_{340} (ΔOD), em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1609), a qual refletiu o aumento de NADH.

O resultado da análise é dado em U/mg, onde uma unidade (U) é definida como a atividade enzimática que leva à formação de um µM de NADH por minuto. A atividade específica é baseada na quantidade total de proteína determinada pelo ensaio de Bradford (BioRad Protein Assay), e o coeficiente de extinção de NADH (6,22), que pode ser calculado a partir da ΔOD, conforme a equação (4.10):

$$\text{Atividade enzimática (U/mg)} = \frac{\Delta\text{OD/min} \times 4.82 \times \text{diluição}}{Proteina\ (g)} \qquad (4.10)$$

4.13.4 Verificação da Estabilidade do Plasmídeo

A estabilidade do plasmídeo foi verificada, em ensaios em frascos com *C. beijerinckii* A1, em meio otimizado, adicionado de 30 g/L de glicerol, 30 g/L de milhocina (em substituição ao extrato de levedura), 20% (v/v) de inóculo, adicionando-se 20 g/L de $CaCO_3$ para manter o pH entre 5,5 e 6,0, a 37°C, 80 rpm, com e sem a adição do antibiótico (tianfenicol) ao meio de fermentação. Ensaios empregando as mesmas condições empregando *C. beijerinckii* DSM 791 foram feitos para controle.

4.13.5 Fermentações com *C. beijerinckii* A1

Em biorreator mecanicamente agitado foram realizadas bateladas simples e alimentada, volume nominal de 1 L e reacional de 0,5 L, com a linhagem recombinante, *C. beijerinckii* A1, e adicionou-se 10% (v/v) de inóculo. Empregou-se o meio otimizado, com 30 g/L de glicerol, 30 g/L de milhocina, a 37°C, 100 rpm e pH controlado com a adição de NH_4OH.

4.14 PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL USANDO GLICERINA COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO

Os perfis de consumo de glicerina por *C. beijerinckii* DSM 791, e sua recombinante, foram obtidos por experimentos em biorreator mecanicamente agitado, utilizando-se a estratégia de batelada simples e meio composto por 75,0 g/L de glicerina (~48% (m/v) de glicerol e pH 9.2), 30,0 g/L de milhocina, 5,0 g/L de K_2HPO_4, 0,005 g/L de $C_2H_3NaO_2$. O pH inicial foi ajustado em 6,0 com adição de solução de HCl 10 % (v/v) e controlado com a adição de NH_4OH, durante a fermentação.

O sistema foi autoclavado a 121°C por 30 minutos e antes da adição do inóculo de 16 horas a 10% (v/v), foi feita a troca de atmosfera com aspersão de N_2 por 30 minutos para garantir anaerobiose. Nas bateladas com a recombinante foram adicionadas 30 µg/mL de tianfenicol ao meio de cultivo, após esterilização. O pH foi controlado entre 5,5 e 6,0 pela adição de solução de NH_4OH.

4.15 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

4.15.1 Recuperação de 1,3-propanodiol por *Gas stripping*

O sistema integrado de fermentação e recuperação do produto por *gas stripping* (Figura 4.7) foi composto por 2 partes: o biorreator mecanicamente agitado (1 L de volume nominal e 500 mL de volume reacional) com controle de temperatura e pH; e o sistema de *gas striping* com uma bomba peristáltica, um condensador (*Pyrex Graham coil condenser* 30 mm-300 mm, Fisher) e um sistema de resfriamento (LU, DONG & YANG, 2013).

Todo o sistema foi purgado com nitrogênio (LU, DONG & YANG, 2013) antes da fermentação e início da operação de *gas stripping*. O gás que promove a remoção do produto de interesse é o produzido durante a própria fermentação, não havendo entrada de gás exógeno durante o processo de *gas stripping*.

A taxa de *stripping* em $g/L.h^{-1}$ foi caculada de acordo a seguinte equação (4.11):

$$S = \frac{Cp \times Vp}{Vc \times t} \tag{4.11}$$

Onde,

S: Taxa de *stripping* (g/L.h^{-1});

C_P: Concentração de produto no condensado (g/L);

V_P: Volume de condensado (L);

V_C: Volume nominal da coluna de destilação (L);

t: Tempo de *stripping* (h).

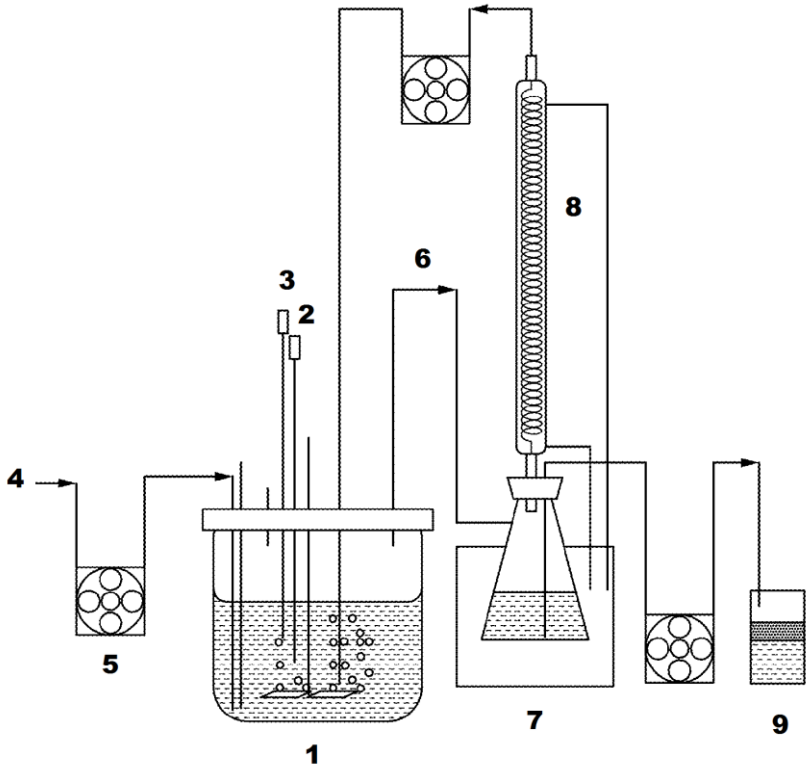

Figura 4.7: Sistema de *Gas stripping.* **1**: Fermentador, **2**: Unidade de controle de temperatura, **3**: Unidade de controle de pH, **4**: Adição de solução de NH_4OH, **5**: bomba persitáltica, **6**: CO_2/H_2 **7**: Unidade de resfriamento, **8**: Condensador e **9**: Produto (YANG & ZHAO, 2013).

4.15.2 Extração Líquido-Líquido de 1,3-propanodiol – Efeito S*alting-out*

O procedimento de *salting-out* consitiu em, primeiramente, misturar vigorosa e completamente o sal na solução de fermentado livre de células, contendo 1,3-propanodiol. A solução de 1,3-propanodiol foi previamente centrifugada durante 5

minutos, à 9.100 × g, para separação das células. Em seguida, foi adicionado o solvente, o qual foi misturado vigorosa e completamente. Por fim, a mistura foi deixada em repouso *overnight*, até separação completa, caracterizada pela formação de duas fases.

Para a aplicação da técnica de *salting-out* foram selecionados sete diferentes sais: K_2HPO_4, Na_2CO_3, K_2CO_3, $(NH_4)_2SO_4$, $NaHPO_4$, K_3PO_4 e $C_6H_5NaO_7$; e quatro solventes: metanol, etanol, isopropanol e acetona. Estes foram combinados entre si para determinação do melhor par sal-solvente para recuperação de 1,3-propanodiol do meio de cultivo.

As variáveis dependentes analisadas para seleção do melhor par sal/solvente foram: o coeficiente de partição (K) e a porcentagem de recuperação (Y). K é definido como a razão da concentração de 1,3-propanodiol na fase superior em relação à fase inferior, ou seja, o comportamento de separação do produto alvo nas duas fases, calculado de acordo com FU, SUN & XIU (2013), pela equação (4.12):

$$K = \frac{Ctopo}{Cbase} \tag{4.12}$$

Onde,

K: Coeficiente de partição;

C_{topo}: Concentração de 1,3-propanodiol na fase superior (g/L);

C_{base}: Concentração de 1,3-propanodiol no fase inferior (g/L).

O parâmetro "C_{topo}" foi determinado por análise em CLAE enquanto que "C_{base}" foi calculado por balanço de massa, devido à elevada concentração de sal nesta fase que impossibilita sua análise por CLAE.

A eficiência da separação ou porcentagem de recuperação (Y) foi calculada de acordo com FU, SUN & XIU (2013), pela equação (4.13):

$$Y = \frac{Ctopo \times Vtopo}{Ctopo \times Vtopo + Cbase \times Vbase} \tag{4.13}$$

Onde,

Y: Eficiência da separação (%);

C_{topo}: Concentração de 1,3-propanodiol na fase superior (g/L);

V_{topo}: Volume da fase superior (L);

C_{base}: Concentração de 1,3-propanodiol no fase inferior (g/L);

V_{base}: Volume da fase inferior (L).

Selecionado o melhor par sal/solvente, um DCCR foi delineado se utilizando o *software* Statistica 6.0 para otimização das condições experimentais e maximização de K e Y. As variáveis independentes: concentração de 1,3-propanodiol, quantidades de solvente e de sal foram analisadas nos pontos de mínimo e máximo, pontos centrais e pontos axiais (Tabela 4.12), totalizando 17 ensaios conduzidos a temperatura ambiente.

A ANOVA dos dados foi realizada por meio do *software* Statistica 6.0 e assim como para a otimização do meio de cultivo, uma equação polinomial foi proposta para cada variável dependente e a função *Desirability* para a maximização simultânea das variáveis de resposta (K e Y).

Tabela 4.12: Fatores e níveis usados no DCCR para otimização da extração de 1,3-propanodiol por *salting-out*.

Fator	Axial -1,68	Mínimo -1	Ponto Central 0	Máximo +1	Axial +1,68
1,3-PDO (g/L)	5,00	11,00	20,00	29,00	35,00
Etanol % g/g	16	20	26	32	36
K_3PO_4 % g/g	18	22	28	34	38

1,3-PDO: 1,3-propanodiol.

4.16 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

4.16.1 Método Espectrofotométrico para Quantificação de Glicerol

A quantificação do glicerol durante as etapas de ativação, propagação e produção foi realizada por método enzimático e por CLAE.

No método enzimático utiliza-se um kit de determinação de triglicerídeos (TG Color - GPO/PAP AA, Wiener lab.). O fundamento do método consiste de 4 reações:

$$\text{triglicerídeos} \xrightarrow{\text{lipase lipoprotéica}} \text{glicerol + ácidos graxos}$$

$$\text{glicerol + ATP} \xrightarrow{\text{glicerol quinase}} \text{glicerol-1-P + ADP}$$

$$\text{glicerol-1-fosfato + } O_2 \xrightarrow{\text{GPO}} H_2O_2 \text{ + dihidroxiacetonafosfato}$$

$$2\ H_2O_2 \text{ + 4-AF + clorofenol} \xrightarrow{\text{POD}} \text{quinonimina vermelha}$$

A coloração vermelha, obtida ao final das reações e quantificada por espectrofotometria a 505 nm, é proporcional à quantidade de glicerol presente na amostra. A concentração de glicerol foi calculada pela metodologia sugerida no kit enzimático e a concentração de triglicerídeos obtida foi convertida em glicerol, pelas equações (4.14) e (4.15):

Sabendo-se,

Massa molar do glicerol: 92,09 g/mol

Solução padrão do kit: Solução padrão de glicerol 2,26 mmol/L

De acordo com o método, o cálculo de triglicerídeos:

Triglicerídeo (g/L) = Abs Amostra x fator x diluição

$$fator = \frac{2g/L}{AbsPadrão} \tag{4.14}$$

Tem-se,

Concentração da solução padrão x massa molar do glicerol

0,00226 mol/L x 92,09 g/mol = 0,2081 g/L de glicerol.

0,2081 g/L de glicerol ---------- 2 g/L de triglicerídeo

x g/L de glicerol ---------- 1 g/L de triglicerídeo

x = 0,104

$$\boldsymbol{Glicerol\ (g/L) = Triglicerídeo\ (g/L) \times 0,104} \tag{4.15}$$

4.16.2 Método Cromatográfico para Quantificação de Glicerol

A concentração de glicerol, ácido butírico, ácido lático, ácido acético, butanol, 1,3-propanodiol e etanol, foram determinadas por CLAE, equipado com detector de índice de refração. Durante os estudos conduzidos no LADEBIO a quantificação de glicerol, butanol, 1,3-propanodiol e etanol foi realizada utilizando coluna Coluna Pl Hiplexh Agilent, detector RID e a concentração de ácido butírico, ácido lático e ácido acético foi determinada por meio da Coluna Pl Hiplexh Agilent com detector UV utilizando comprimento de onda 210 nm.

As figuras a seguir apresentam os cromatogramas típicos, obtidos na coluna a 65°C, das quantificações de glicerol, butanol, 1,3-propanodiol e etanol (Figura 4.8); ácido butírico, ácido lático, ácido acético (Figura 4.9).

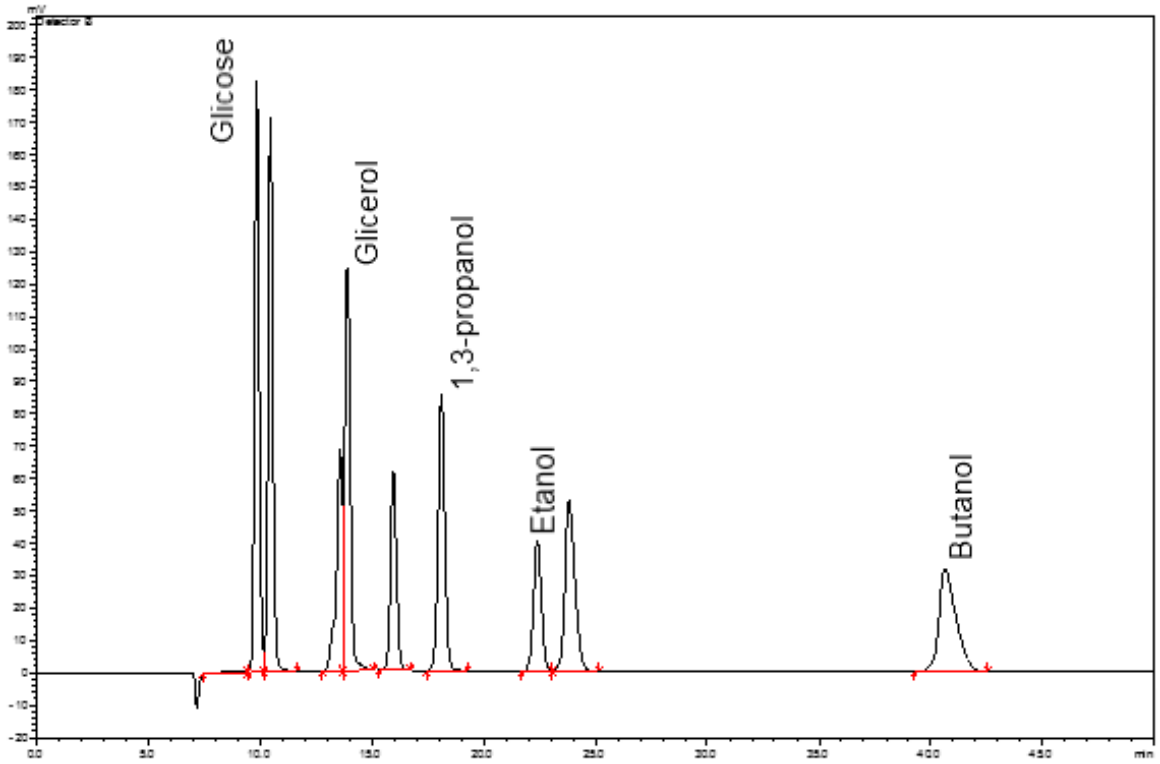

Figura 4.8: Cromatograma típico de determinação de glicerol, butanol, 1,3-propanodiol e etanol obtido por CLAE - temperatura da coluna 45°C e detector RID (obtido no LADEBIO).

As amostras foram centrifugadas (Eppendorf) à 9.100 × g por 10 minutos antes das análises por CLAE. A fase móvel foi água acidificada (5 mM de ácido sulfúrico), fluxo de 0,6 mL/minuto, bombeamento isocrático, volume de injeção de 20

µL, temperatura da coluna de 45°C, as amostras foram analisadas em série, a concentração dos padrões aproximadamente 10,0 g/L, tempo de corrida de 50 minutos.

As concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos de concentrações conhecidas (aproximadamente 10,0 g/L). Os reagentes para obtenção dessas soluções padrão foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

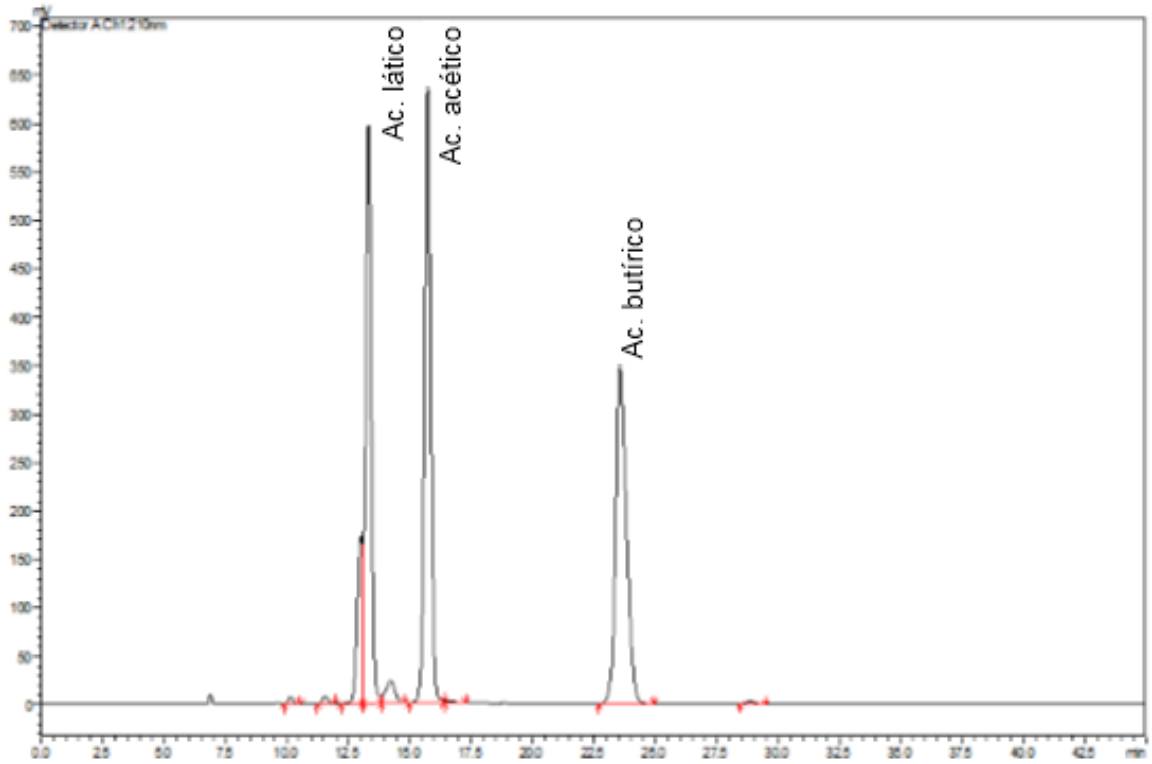

Figura 4.9: Cromatograma típico de determinação de ácido butírico, ácido lático e ácido acético obtido por CLAE - temperatura da coluna 45°C e detector UV (obtido no LADEBIO).

Durante o período de estudos na *The Ohio State University* o glicerol, 1,3-propanodiol, ácido butírico, ácido lático e ácido acético foram analisados usando CLAE equipado com uma coluna de análise de ácidos orgânicos (Bio-Rad HPX - 87H) e um detector de índice de refração (Shimadzu RID - 10A).

As amostras foram centrifugadas (Eppendorf *Centrifuge* 5415 R) a 9.100 × g por 10 minutos antes das análises por CLAE. As análises foram realizadas com solução de H_2SO_4 (0,5 mM) como a fase móvel a 0,6 mL/minuto, bombeamento

isocrático e 65°C. Padrões externos foram aplicados para a identificação e quantificação de áreas de pico. Os reagentes para obtenção dessas soluções padrão foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. A figura 4.10 apresenta um cromatograma típico de determinação de glicerol, 1,3-propanodiol ácido butírico, ácido lático e ácido acético.

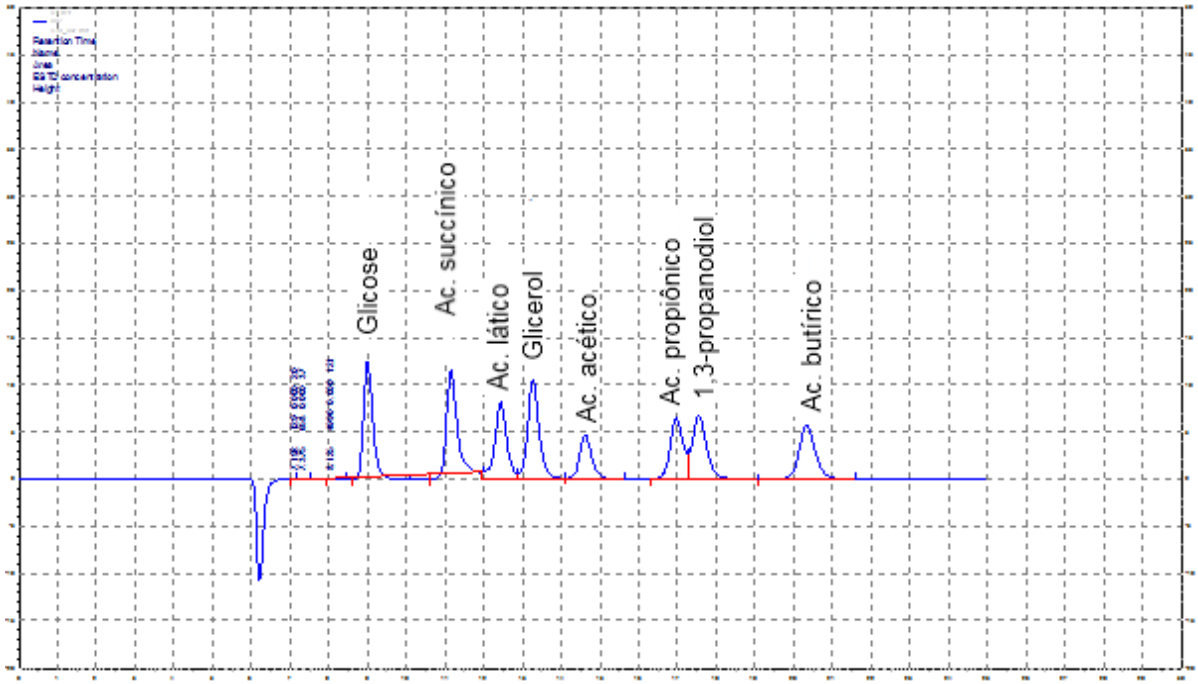

Figura 4.10: Cromatograma típico de determinação de glicerol, 1,3-propanodiol, ácido butírico, ácido lático e ácido acético obtido por CLAE – temperatura da coluna 65°C e detector RID (obtido na *The Ohio State University*).

Os resultados da quantificação de glicerol por CLAE foram comparados com aqueles obtidos pelo kit enzimático de quantificação de glicerol (metodologia descrita no item 4.15.1 desta seção). A comparação foi realizada por meio da análise das amostras pelos dois métodos e obtenção da correlação entre eles.

Butanol, etanol e acetona foram analisados por cromatografia gasosa (CG) Shimadzu 2014, equipado com um detector de ionização de chama e um 30-m coluna de sílica fundida (espessura de filme de 0,25 µm e 0,25 mm ID, Stabilwax-DA). O gás transportador era de nitrogênio a 1,47 mL/minuto (velocidade linear de 35 cm/s).

Antes das análises por CG, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf *Centrifuge* 5415 R) à 9.100 × g por 10 minutos e diluídas 20 vezes com uma solução tampão padrão interno contendo 0,5 g/L isobutanol, 0,1 g de ácido isobutírico g/L, e

1% de ácido fosfórico (para acidificação) e injetados (1 mL cada) utilizando um injetor automático (AOC - 20i Shimadzu).

A coluna foi utilizada a 80°C durante 3 minutos, aumentada para 150°C a uma velocidade de 30°C/minuto e mantida a 150°C durante 3,7 minutos. Tanto o injetor quanto o detetor foram regulados para 250°C. Padrões externos foram aplicados para a identificação/quantificação de áreas de pico. A figura 4.11 apresenta um cromatograma típico de determinação de butanol, etanol e acetona.

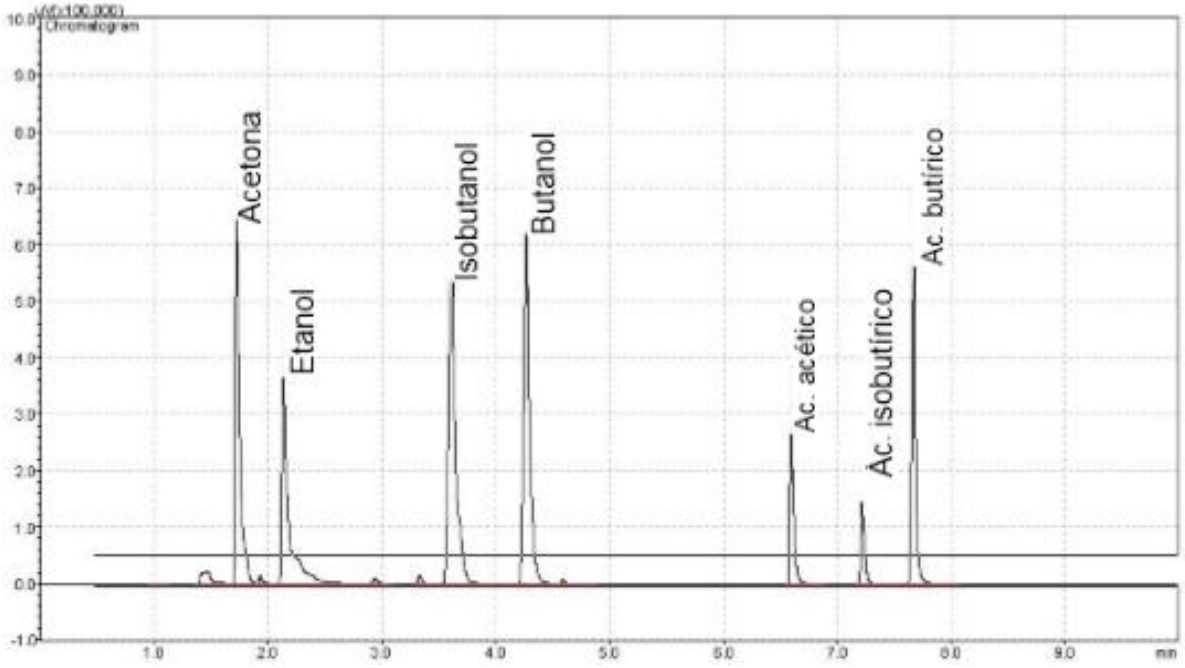

Figura 4.11: Cromatograma típico de determinação de butanol, etanol e acetona obtido em CG (obtido na *The Ohio State University*).

Na figura 4.12 pode ser visualizado o fluxograma de todas as etapas e processos deste trabalho (primeira e segunda fases de experimentos), visando o bioaproveitamento de glicerol por *Clostridium* spp. para produção de 1,3-propanodiol. No fluxograma estão destacados em azul os ensaios realizados apenas em frascos, em verde os ensaios conduzidos em frascos e biorreator mecanicamente agitado, e em laranja os ensaios apenas em biorreator mecanicamente agitado, sendo que, à batelada sequêncial foi acoplado o sistema de FBB (conforme descrito no item 4.11 desse capítulo).

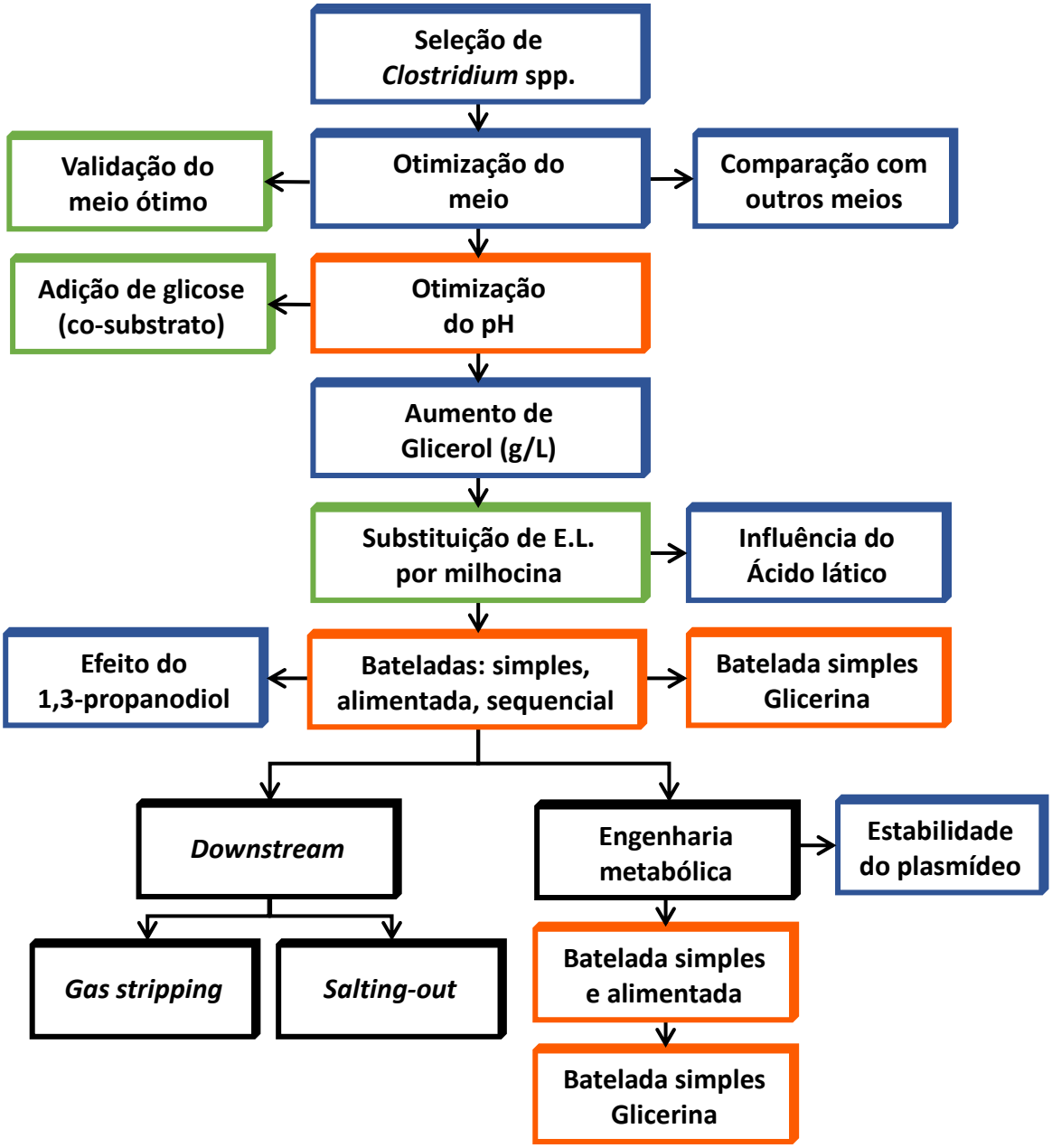

Figura 4.12: Fluxograma das etapas da otimização do bioaproveitamento de glicerol por *Clostridium* spp. para produção de 1,3-propanodiol deste trabalho. Destacados em: azul os ensaios em frascos, laranja os ensaios em biorreator e verde os ensaios em frascos e biorreator.

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente capítulo são apresentados os resultados dos estudos da fermentabilidade de glicerol. A melhor linhagem para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol, foi selecionada dentre as seis diferentes *Clostridium* spp. disponíveis para estudo. Empregando técnicas de planejamento experimental sequencial, o meio de fermentação foi otimizado, avaliou-se a adição de glicose ao meio, atuando como co-substrato, além da substituição do extrato de levedura por milhocina.

A faixa de pH ótimo para a fermentação propanodiólica bem como a melhor estratégia de condução do processo, com a linhagem selecionada e o meio otimizado, foram determinadas por intermédio de experimentos em biorreator mecanicamente agitado. Posteriormente, foram conduzidas fermentações em uma configuração não convencional de biorreator (*fibrous bed bioreactor*) com células imobilizadas, em processo de bateladas sequenciais, utilizando-se glicerol como única fonte de carbono e a linhagem selecionada.

Na sequência, com a aplicação das ferramentas de engenharia metabólica aumentou-se a expressão de duas enzimas chave, da rota metabólica de *Clostridium* spp., dando origem a uma recombinante que teve o seu desempenho comparado com o da linhagem selvagem. Investigou-se também a fermentabilidade da glicerina, em bateladas simples, pela linhagem selecionada e sua recombinante. Finalizando, duas técnicas de *downstream*: *gas stripping* e extração líquido-líquido (*salting-out*) foram estudadas como alternativas para recuperação de 1,3-propanodiol do meio fermentado.

5.1 *SCREENING* DA CAPACIDADE DE ASSIMILAÇÃO DE GLICEROL POR C*lostridium* spp. VISANDO A PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

As espécies de *Clostridium* mais estudadas em processos fermentativos utilizando glicerol como única fonte de carbono são: *C. acetobutylicum e C. butyricum,* sendo escassas informações na literatura para as demais espécies. Desta forma, primeiramente, foi realizado o levantamento do perfil cinético de ativação, propagação e produção de *Clostridium* spp. disponíveis em laboratório, a fim de se avaliar a capacidade de crescimento de cada uma em meio contendo glicerol como única fonte de carbono. Além disso, foi feito o levantamento do perfil de consumo de glicerol, e de produção de 1,3-propanodiol e ácidos orgânicos.

A partir dos resultados obtidos para os perfis cinéticos das linhagens nas etapas de ativação (Tabela 5.1) e propagação (Tabela 5.2), observou-se que apenas *C. beijerinckii* DSM 791, *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 2152 e *C. butyricum* INCQS 00635 consumiram integralmente o glicerol presente no meio (RPS = 100%, nas condições estudadas).

Tabela 5.1: Ensaios de **ativação** das linhagens em frascos, a 80 rpm, 37°C, em meio RCM com 5,0 g/L de glicerol, durante 24 h.

Linhagem	Ativação (h)	RPS (%)	$Y_{X/S}$ (g/g)	μ_x (h^{-1})	t_d (h)
C. acetobutylicum DSM 6228	18	19	1,06	0,37	1,85
C. beijerinckii DSM 1739	14	18	0,94	0,47	1,47
C. beijerinckii DSM 791	12	100	0,30	0,25	2,77
C. saccharoperbutylacetonicum DSM 2152	12	100	0,86	0,29	2,40
C. beijerinckii ATCC 35702	14	36	0,60	0,31	2,25
C. butyricum INCQS 00635	12	100	0,48	0,28	2,46

RPS: redução percentual de substrato, $Y_{X/S}$: rendimento de células em relação ao substrato, μ_x: taxa específica de crescimento e t_d: tempo de duplicação.

A partir do delineamento dos perfis de ativação e construção dos gráficos Ln(x) com o tempo, foi determinado o tempo de ativação para cada linhagem (Tabela 5.1). É de suma importância definir a fase exponencial de crescimento pois

foi no meio desta fase que as células foram transferidas para a etapa de propagação.

De acordo com os dados da tabela 5.1, o rendimento de células por substrato consumido ($Y_{X/S}$) variou de 0,30 g/g a 1,06 g/g sendo que o máximo foi obtido empregando-se *C. acetobutylicum* DSM 6228. Os elevados rendimentos em biomassa são, provavelmente, devido a elevada quantidade de peptona e extrato de levedura presentes no meio, que acabam atuando como fonte de carbono. A taxa específica de crescimento (μ_x) variou de 0,25 h^{-1} a 0,47 h^{-1} sendo que a maior foi observada para *C. beijerinckii* DSM 1739, esta foi também a linhagem com o menor tempo de duplicação da massa celular (t_d), de 1,47 h.

Com o delineamento dos perfis de propagação e construção dos gráficos Ln(x) por tempo, foi determinado o tempo de propagação para cada linhagem (Tabela 5.2). As células foram transferidas da fase de propagação para a produção no meio da fase exponencial de crescimento.

Tabela 5.2: Ensaios de **propagação** das linhagens em frascos, a 80 rpm, 37°C, em meio RCM com 5,0 g/L de glicerol, durante 24 h.

Linhagem	Propagação (h)	RPS (%)	$Y_{X/S}$ (g/g)	μ_x (h^{-1})	t_d (h)
C. acetobutylicum DSM 6228	3	23	0,77	0,23	2,99
C. beijerinckii DSM 1739	5	28	0,72	0,36	5,31
C. beijerinckii DSM 791	7	100	0,30	0,22	3,08
C. saccharoperbutylacetonicum DSM 2152	5	100	0,65	0,17	4,17
C. beijerinckii ATCC 35702	3	32	0,51	0,25	2,78
C. butyricum INCQS 00635	5	100	0,27	0,17	4,15

RPS: redução percentual de substrato, $Y_{X/S}$: rendimento de células em relação ao substrato, μ_x: taxa específica de crescimento e t_d: tempo de duplicação.

Observou-se que na etapa de propagação o tempo necessário para atingir a fase exponencial é bem menor do que na etapa de ativação (Tabela 5.1). Isso, possivelmente, está relacionado com a fase em que as células são inoculadas em cada etapa. Na ativação, as células inoculadas, estavam previamente em estoque a -80°C, enquanto que na etapa de propagação as células, oriundas do cultivo de ativação, já estavam na fase exponencial e adaptadas ao meio.

Nas condições estudadas, o menor tempo de propagação (3 h) foi apresentado pelas linhagens: *C. acetobutylicum* DSM 6228 e *C. beijerinckii* ATCC 35702. A linhagem com o menor valor de taxa específica de crescimento (μ_x = 0,17 h^{-1}) foi *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 2152 e aquela com o maior tempo de duplicação (t_d = 4,17 h) foi *C. beijerinckii* DSM 1739. Já a linhagem com ou maior fator de rendimento em g de células/g de glicerol (Yx/s) foi *C. acetobutylicum* DSM 6228. No entanto, assim como no delineamento do perfil de ativação, esta linhagem não consumiu o glicerol integralmente.

Os experimentos de produção de 1,3-propanodiol foram conduzidos em frascos, com 12,0 g/L de glicerol como única fonte de carbono. Nesta etapa, dentre as seis linhagens estudadas, apenas três foram capazes de produzir 1,3-propanodiol: *C. beijerinckii* DSM 791, *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 2152 e *C. butyricum* INCQS 00635. Na tabela 5.3 são apresentados os resultados para todas as linhagens estudadas e nas figuras 5.1, 5.2 e 5.3, os perfis de crescimento, consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol e ácidos orgânicos apenas das três linhagens que apresentaram crescimento celular nas condições estudadas.

.

Tabela 5.3: Ensaios de **produção** das linhagens em frascos, a 80 rpm, 37°C, em meio RCM com 12,0 g/L de glicerol, durante 24 h.

Linhagem	RPS (%)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h^{-1})	EF (%)
C. acetobutylicum DSM 6228	6	0,00	0,00	0
C. beijerinckii DSM 1739	10	0,00	0,00	0
C. beijerinckii DSM 791	79	0,50	0,49	83
C. saccharoperbutylacetonicum DSM 2152	76	0,44	0,38	73
C. beijerinckii ATCC 35702	4	0,00	0,00	0
C. butyricum INCQS 00635	76	0,42	0,39	70

RPS: redução percentual de substrato, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato, Q_P: produtividade volumétrica e EF: eficiência de fermentação.

A maior quantidade de 1,3-propanodiol produzida (5,1 g/L), rendimento em produto (0,50 g/g), RPS (79%), produtividade (0,49 g/L.h-1) e eficiência de fermentação 83%, foram obtidas com C. beijerinckii DSM 791, sendo esta linhagem a selecionada para os demais etapas deste trabalho.

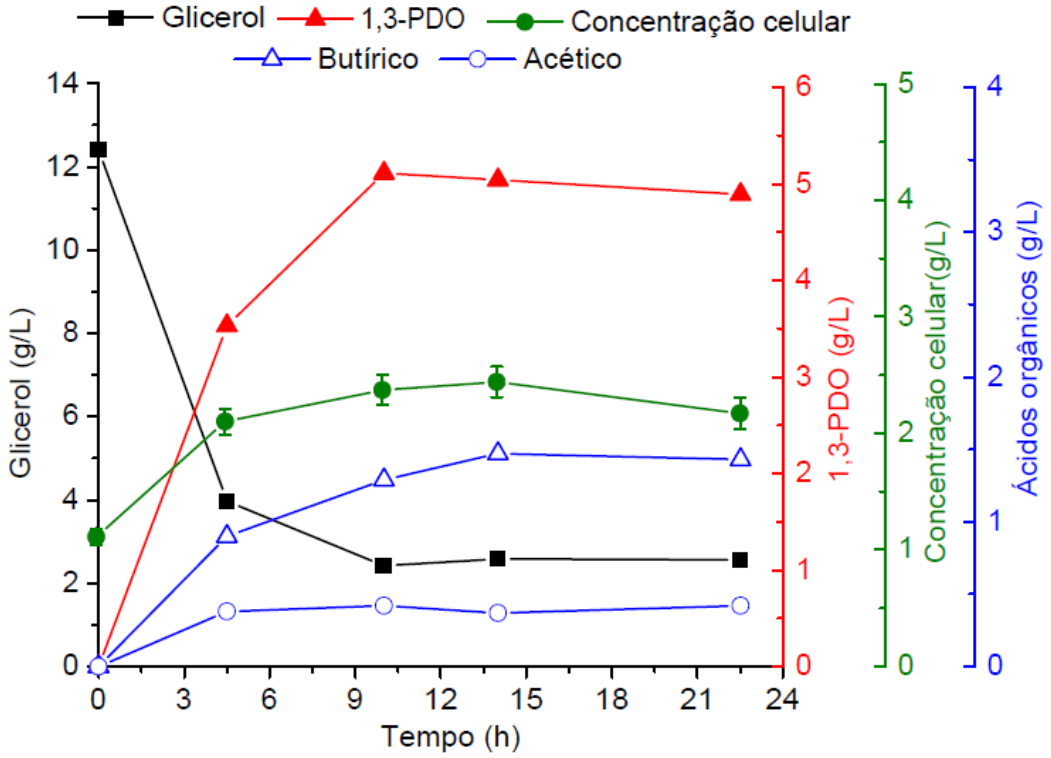

Figura 5.1: Perfil cinético de consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), por ***C. beijerinckii* DSM 791**, em frascos a 80 rpm e 37°C.

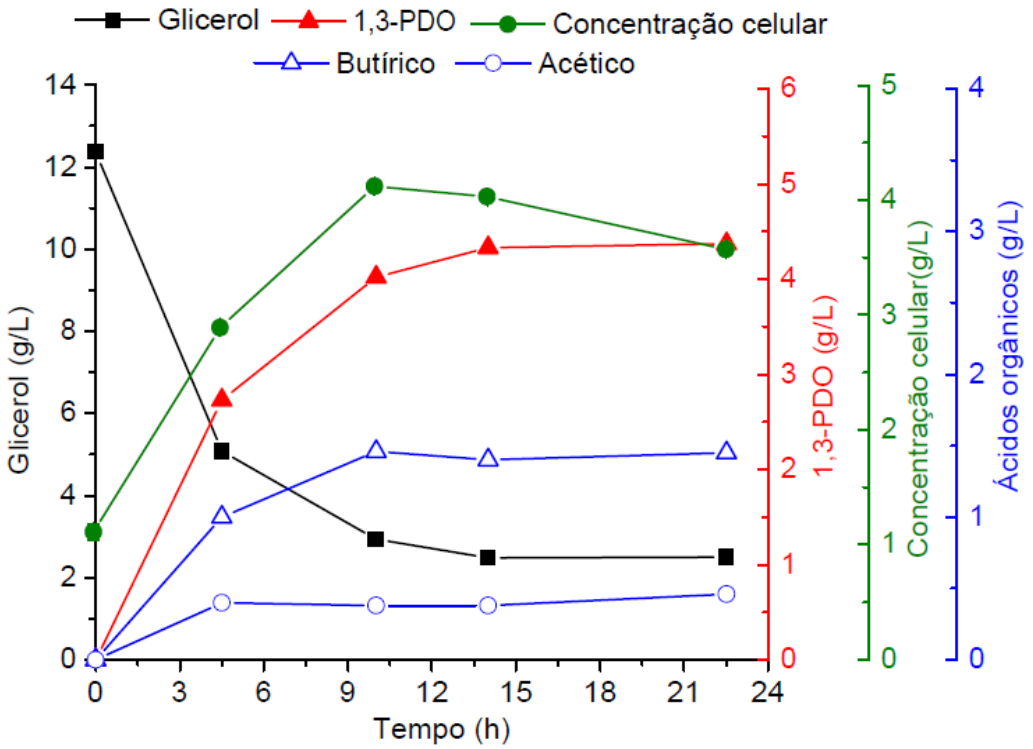

Figura 5.2: Perfil cinético de consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), por ***C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 2152**, em frascos a 80 rpm e 37°C.

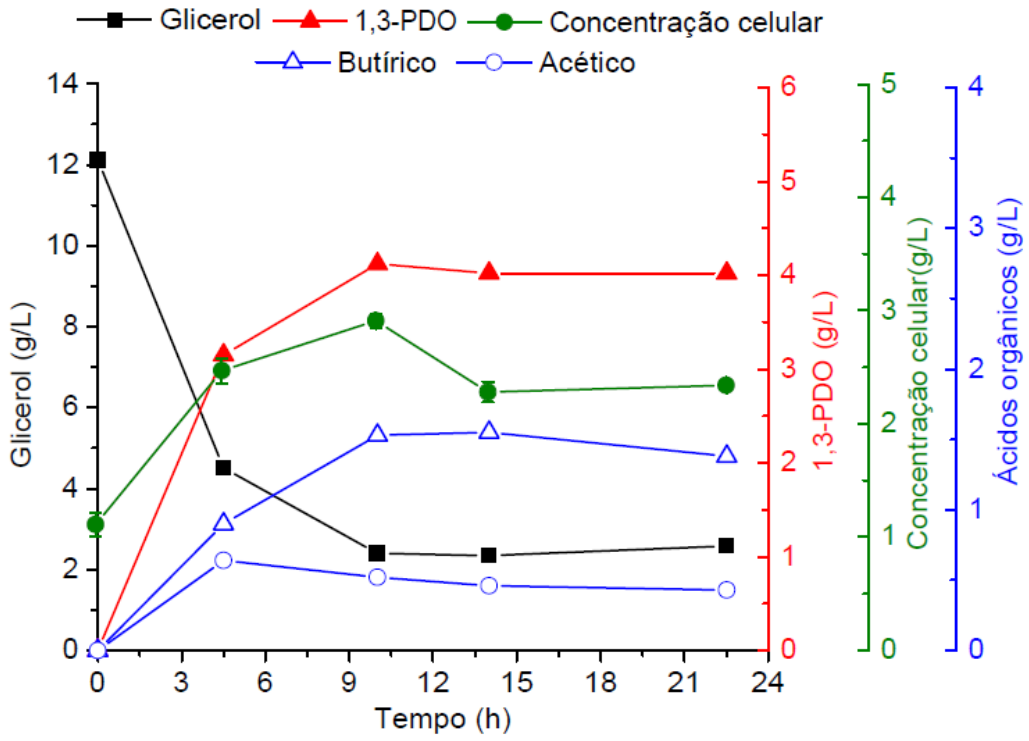

Figura 5.3: Perfil cinético de consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), por ***C. butyricum* INCQS 00635,** em frascos a 80 rpm e 37°C.

A eficiência de fermentação foi calculada baseando-se no rendimento máximo teórico, utilizando glicerol como a única fonte de carbono, 0,60 g de 1,3-propanodiol/g de glicerol consumido (BIEBL et al., 1992; ZENG & BIEBL, 2002; MAERVOET et al., 2011).

A RPS da etapa de produção para todas as linhagens foi inferior à observada nas etapas de ativação e propagação, pois a concentração de glicerol nessa etapa foi aumentada (de 5 g/L para 12 g/L). A concentração celular diminiu e o consumo de glicerol cessa em torno de 10 horas de fermentação, povavelmente, devido a queda do pH causada pela co-produção de ácidos orgânicos.

Ao final de cada etapa de ativação, propagação e produção foi verificada a ausência de contaminação por outros grupos bacterianos, para cada linhagem, por meio da técnica de coloração de Gram. Na figura 5.4 é apresentada uma das microscopias óticas de células de *C. beijerinckii* DSM 791, após a etapa de produção (Figura 5.4).

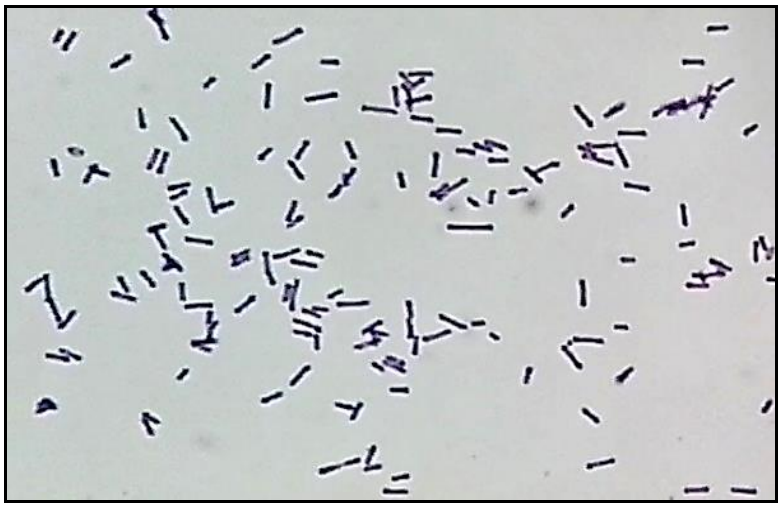

Figura 5.4: Microscopia ótica de células de *C. beijerinckii* DSM 791 coradas pela técnica de Gram (aumento de 1.000x).

5.2 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR *C. beijerinckii* DSM 791

O desenvolvimento de tecnologia para produção de qualquer biomolécula passa pela otimização da composição do meio de cultivo. Neste sentido, realizaram-se estudos de otimização dos os componentes do meio utilizando-se três planejamentos experimentais sequenciais: *Plackett-Burman*, fatorial fracionado e delineamento central composto rotacional (DCCR), visando uma maior produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol por *C. beijerinckii* DSM 791.

O primeiro passo, o delineamento de *Plackett-Burman*, foi aplicado para selecionar os fatores a serem analisados na otimização do meio. Os valores reais dos intervalos deste estudo, para cada fator, são descritos na tabela 4.4. A matriz do planejamento bem como os resultados das concentrações de 1,3-propanodiol e substrato residual (SR) podem ser visualizados na tabela 5.4.

Por meio da Análise de Variância (ANOVA), usando 95% de nível de confiabilidade ($p \leq 0,05$) e erro padrão, verificou-se um bom ajuste dos resultados experimentais já que o coeficiente de determinação (R^2) obtido de foi de 0,988, o que significa que 99% da variância total é explicada pelo modelo. Analisando-se o R^2 ajustado, neste caso, o modelo com os efeitos não significativos desconsiderados é o mais adequado pois apresenta um maior coeficiente (R^2 ajustado de 0,968) se comparado com o modelo considerando todos os efeitos (R^2 ajustado de 0,958).

Tabela 5.4: Matriz de ensaios do delineamento de ***Plackett-Burman*** com os respectivos resultados para produção de 1,3-propanodiol e substrato residual.

Ensaio	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	x_9	x_{10}	x_{11}	x_{12}	1,3-PDO (g/L)	SR (g/L)
1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	0,51	67,72
2	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	2,59	64,82
3	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	0,34	5,45
4	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	0,42	4,93
5	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	7,23	55,43
6	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	3,05	0,81
7	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0,37	4,87
8	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	2,87	0,00
9	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	3,57	60,94
10	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	5,68	59,00
11	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0,41	68,04
12	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	0,69	67,47
13	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	0,46	5,33
14	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	0,77	68,18
15	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	2,80	0,34
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2,96	0,15
17(PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,62	34,69
18(PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,64	36,90
19(PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,64	36,42

1,3-PDO: 1,3-propanodiol e SR: substrato residual.

A concentração de 1,3-propanodiol variou de 0,3 g/L a 7,2 g/L, sendo que os pontos centrais apresentaram concentrações menores do que os demais ensaios, indicando uma tendência crescente no sentido do ponto de máximo, o que significa que a produção de 1,3-propanodiol ainda poderia ser melhorada.

Avaliando-se os efeitos dos fatores, por meio do diagrama de Pareto (Figura 5.5), verifica-se que ureia, extrato de levedura, $C_2H_3NaO_2$, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, glicerol e glicose são os fatores mais significantes para a produção de 1,3-propanodiol. No entanto, a glicose foi eliminada da composição do meio de cultivo, pois além do interesse desse trabalho ser o consumo de glicerol, a concentração

mínima avaliada (nível -1) foi de 0 g/L e a glicose influencia negativamente na produção de 1,3-propanodiol, possivelmente, devido ao desvio do metabolismo para a produção de ácidos orgânicos. Apesar de o fator "glicerol" ter efeito positivo significativo, o seu intervalo de estudo foi reduzido baseado nos resultados de substrato residual de até 68,2 g/L (SR), esse glicerol é o que não foi consumido, presente no final da fermentação (Tabela 5.4).

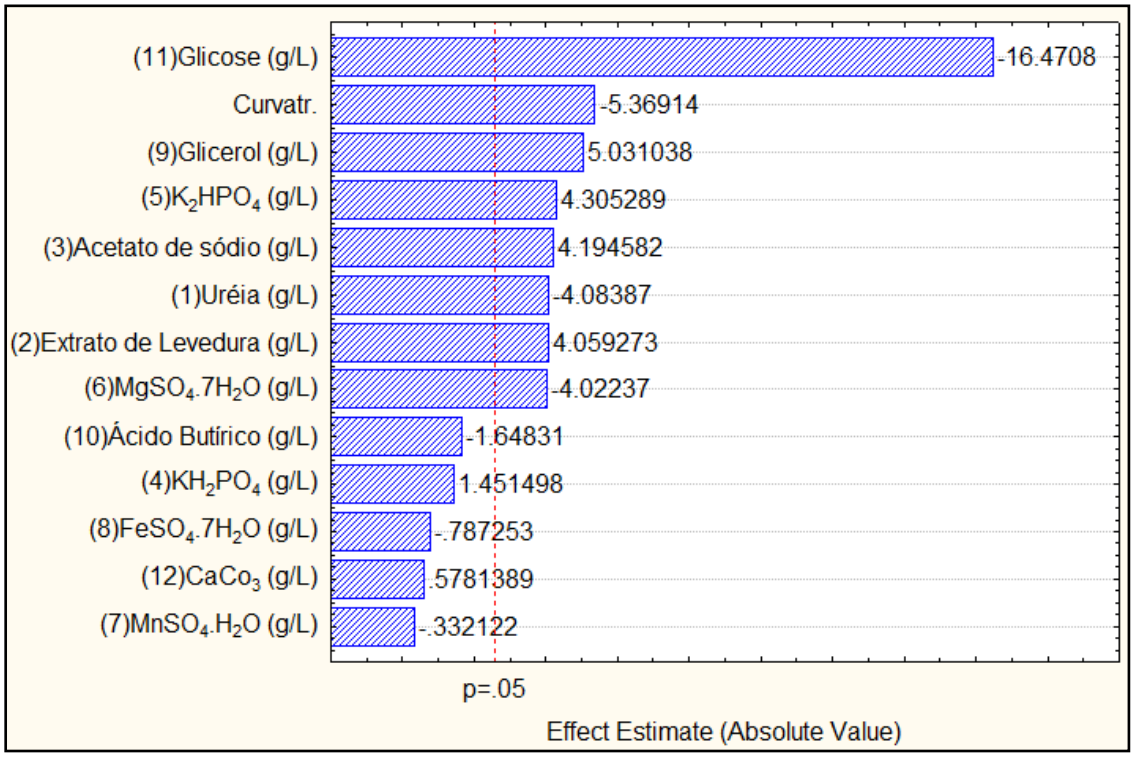

Figura 5.5: Diagrama de Pareto para produção de 1,3-propanodiol por *C. beijerinckii* DSM 791 a partir do delineamento experimental de ***Plackett-Burman***.

Ainda, baseando-se no diagrama de Pareto (Figura 5.5), os intervalos de estudo de ureia e de $MgSO_4.7H_2O$ foram reduzidos já que esses fatores apresentaram efeito negativo significativo. Os demais fatores significativos que apresentaram efeito positivo tiveram seus intervalos de estudo mantidos (K_2HPO_4, extrato de levedura e acetato de sódio). Os demais fatores: KH_2PO_4, $MnSO_4.H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, ácido butírico e $CaCO_3$ não apresentaram efeito significativo na produção de 1,3-propanodiol e por isso foram removidos da composição do meio.

Os seis fatores significativos selecionados no delineamento experimental de *Plackett-Burman* (glicerol, K_2HPO_4, acetato de sódio, ureia, extrato de levedura, e $MgSO_4.7H_2O$) foram otimizados no delineamento fatorial fracionado (2^{6-2}). Os

valores reais dos intervalos de estudo, para cada fator, são descritos na tabela 4.5. Os resultados desta segunda etapa da otimização do meio bem como a matriz de planejamento podem ser observados na tabela 5.5.

Tabela 5.5: Matriz de ensaios do delineamento **fatorial fracionado** (2^{6-2}) com os respectivos resultados para produção de 1,3-propanodiol, substrato residual e relação C/N.

Ensaio	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	1,3-PDO (g/L)	SR (g/L)	C/N
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2,46	0,44	28
2	1	-1	-1	-1	1	-1	2,57	0,27	4
3	-1	1	-1	-1	1	1	3,35	13,37	18
4	1	1	-1	-1	-1	1	2,98	12,78	9
5	-1	-1	1	-1	1	1	2,64	14,24	111
6	1	-1	1	-1	-1	1	2,32	16,09	15
7	-1	1	1	-1	-1	-1	2,62	0,28	5
8	1	1	1	-1	1	-1	2,76	0,00	2
9	-1	-1	-1	1	-1	1	4,27	13,21	110
10	1	-1	-1	1	1	1	4,14	12,38	15
11	-1	1	-1	1	1	-1	2,89	0,10	5
12	1	1	-1	1	-1	-1	2,86	0,00	2
13	-1	-1	1	1	1	-1	2,86	0,00	28
14	1	-1	1	1	-1	-1	2,65	0,00	4
15	-1	1	1	1	-1	1	5,23	10,71	18
16	1	1	1	1	1	1	5,31	9,97	9
17 (PC)	0	0	0	0	0	0	4,41	6,11	9
18 (PC)	0	0	0	0	0	0	4,51	5,70	9
19 (PC)	0	0	0	0	0	0	4,55	5,57	9

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, SR: substrato residual e C/N: relação Carbono:Nitrogênio.

Neste delineamento, fatorial fracionado (2^{6-2}), a produção de 1,3-propanodiol variou de 2,3 g/L a 4,6 g/L e o substrato residual (SR) foi reduzido se comparado com os ensaios do planejamento anterior, chegando no máximo a 16,1 g/L.

Calculou-se a relação C/N (carbono:nitrogênio) para cada ensaio, considerando o glicerol como única fonte de carbono e a ureia e o extrato de levedura as fontes de nitrogênio. De acordo com os resultados, tabela 5.5, não existe uma relação proporcional direta entre a razão C/N e a produção de 1,3-propanodiol por *C. beijerinckii* DSM 791 nas condições estudadas.

O delineamento fatorial fracionado foi usado por ser acurado para estimar os efeitos das variáveis com um número reduzido de experimentos se comparado com delineamento fatorial (CALADO & MONTGOMERY, 2003). A relevância estatística de cada fator avaliado no delineamento fatorial fracionado é fornecida pelo diagrama de Pareto, na figura 5.6.

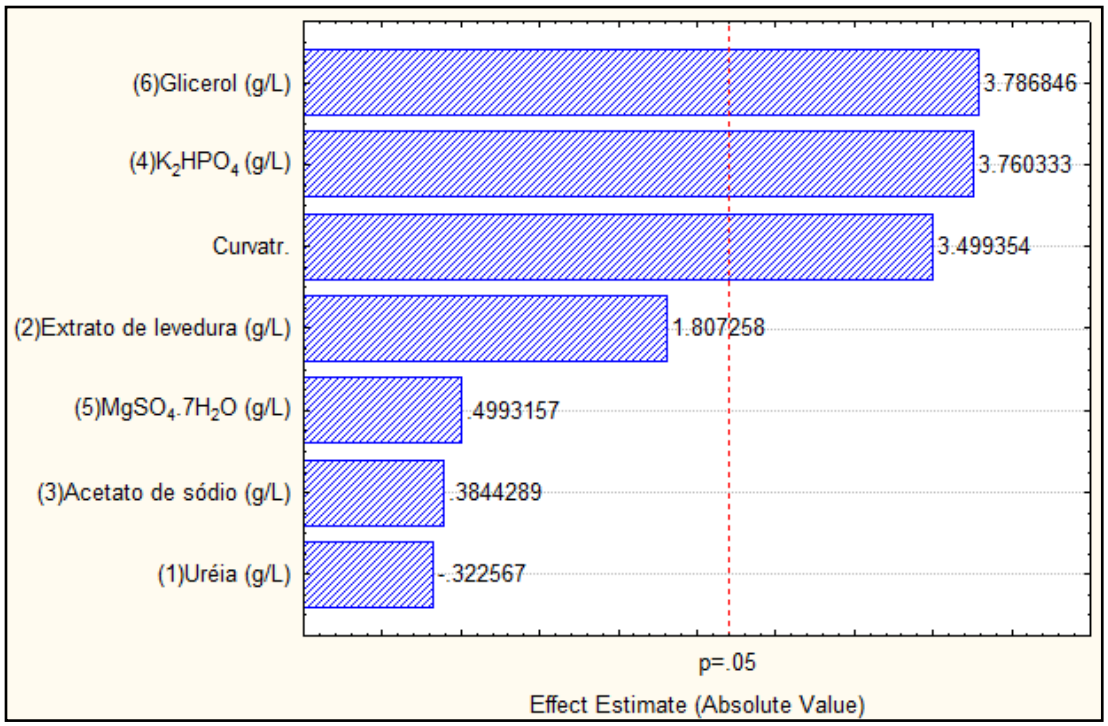

Figura 5.6: Diagrama de Pareto relacionando a significância dos fatores envolvidos com a produção de 1,3-propanodiol por meio do delineamento **fatorial fracionado** (2^{6-2}).

Analizando o diagrama de Pareto da figura 5.6, verifica-se que os fatores K_2HPO_4 e glicerol tiveram efeitos positivos significativos para a produção de 1,3-propanodiol. Sendo assim, o fator K_2HPO_4 teve seu intervalo de estudo aumentado. Já o glicerol teve seu intervalo de estudo reduzido, apesar do seu efeito positivo significativo, em vista da quantidade de substrato residual encontrada nos ensaios, de até 16,1 g/L (Tabela 5.5).

Os fatores ureia e $MgSO_4.7H_2O$ foram removidos da composição do meio de cultura uma vez que além de apresentarem efeito negativo na produção de 1,3-propanodiol, a concentração mínima analisada para ambos foi de 0,0 g/L. Os fatores acetato de sódio e extrato de levedura apresentaram efeito não significativo e negativo para a produção de 1,3-propanodiol, portanto suas concentrações foram mantidas no mínimo.

A curvatura significativa positiva, mostrada no diagrama de Pareto, indica que existe um ponto máximo para a produção de 1,3-propanodiol nesse intervalo de estudo. Isso é confirmado pela análise dos resultados da tabela 5.5 e por meio da tabela ANOVA, utilizando um intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) e erro padrão. Neste caso, verificou-se que a curvatura na região analisada foi significativa com um valor de p inferior a 0,05.

Portanto, foi necessário plotar a superfície de resposta, com um modelo quadrático, empregando os fatores significativos deste fatorial fracionado, para otimizar e maximizar a produção de 1,3-propanodiol. Além disso, os valores de produção referentes aos pontos centrais encontram-se próximos dos máximos obtidos na faixa estudada, indicando a necessidade da adição de pontos axiais à última etapa da otimização, uma vez que experimentos fatoriais permitem apenas avaliação em modelos lineares (RODRIGUES & IEMMA 2005).

Sendo assim, o delineamento central composto rotacional (DCCR) foi escolhido para a última etapa de otimização do meio de cultivo, a fim de se obter as concentrações ótimas de K_2HPO_4 e de glicerol. Os valores reais dos intervalos de estudo, para cada fator, são descritos na tabela 4.6. Esse delineamento permite visualizar a superfície de resposta com valores máximos alcançáveis nas condições experimentais estudadas. Os resultados desta série de experimentos são apresentados na tabela 5.6.

Pode-se observar máximos valores de 4,1 g/L para concentração de 1,3-propanodiol (ensaio 4) e de 100% para RPS (ensaios 1, 3, 6 e 7). Houve um bom ajuste dos resultados experimentais aos modelos já que o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 0,995 para produção de 1,3-propanodiol e 0,991 para RPS, o que significa que 99% da variância é explicada.

Convém analisar ainda, o R^2 ajustado para cada variável dependente e, neste caso, o modelo com os efeitos não significativos desconsiderados é o mais adequado pois apresenta um coeficiente ligeiramente maior (R^2 ajustado de 0,992

para produção de 1,3-propanodiol e de 0,986 para RPS) se comparado com o modelo considerando todos os efeitos (R^2 ajustado de 0,991 para produção de 1,3-propanodiol e de 0,985 para RPS).

Tabela 5.6: Matriz de ensaios do **DCCR** com os respectivos resultados para produção de 1,3-propanodiol e RPS.

Ensaio	x_1	x_2	1,3-PDO(g/L)	RPS (%)
1	-1	-1	2,11	100
2	-1	+1	3,38	58
3	+1	-1	2,16	100
4	+1	+1	4,13	77
5	-1,41	0	3,11	80
6	+1,41	0	3,82	100
7	0	-1,41	1,48	100
8	0	+1,41	3,63	55
9 (PC)	0	0	3,50	93
10 (PC)	0	0	3,39	89
11 (PC)	0	0	3,34	90
12 (PC)	0	0	3,46	94

1,3-PDO: 1,3-propanodiol e RPS: redução percentual de substrato.

Os resultados da análise da tabela ANOVA do DCCR estão nas tabelas 5.7 e 5.8, usando 95% de intervalo de confiança ($p \leq 0,05$) e erro puro. A análise de variância (ANOVA) apresenta importantes dados do experimento como os valores de Probalidade de *Fisher*, cujo valor indica a significância dos fatores avaliados, suas interações, erros e a falta de ajuste do experimento.

A soma dos quadrados dos fatores, interações e resíduos (*lack of fit* somado ao erro puro) são importantes indicadores na avaliação do experimento e escolha do modelo. Quanto maior o valor da soma dos quadrados maior é o efeito dos fatores avaliados. Portanto, pode-se observar que os fatores avaliados têm maior influência na RPS do que na concentração de 1,3-propanodiol.

Tabela 5.7: Tabela da ANOVA para otimização das concentrações de K_2HPO_4 e glicerol para a variável de resposta **1,3-propanodiol (g/L).**

Fator	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	*F*	*P*
(1) K_2HPO_4 (L)	0,407	1	0,407	85,906	0,003
(2) Glicerol (L)	4,907	1	4,907	1.035,532	0,001
Glicerol (Q)	1,358	1	1,358	286,589	0,001
Interação 1L x 2L	0,125	1	0,125	26,312	0,014
lack of fit	0,020	4	0,005	1,080	0,495
Erro puro	0,014	3	0,005		
Total	6,831	11			

Tabela 5.8: Tabela da ANOVA para otimização das concentrações de K_2HPO_4 e glicerol para a variável de resposta **RPS (%)**.

Fator	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	*F*	*P*
(1) K_2HPO_4 (L)	276,294	1	276,294	60,345	0,004
(2) Glicerol (L)	2.059,883	1	2.059,883	449,901	0,001
Glicerol (Q)	310,569	1	310,569	67,832	0,004
Interação 1L x 2L	92,719	1	92,719	20,251	0,020
lack of fit	10,998	4	2,749	0,600	0,690
Erro puro	13,736	3	4,579		
Total	2.764,199	11			

A partir dos resultados da ANOVA, observa-se que os fatores K_2HPO_4 e glicerol apresentaram efeitos lineares significativos, demonstrando que os fatores apresentam interferência nas duas variáveis dependentes: produção de 1,3-propanodiol e RPS. A concentração de glicerol apresentou efeito quadrático ($p \leq 0,05$) para a produção de 1,3-propanodiol e para a RPS.

O termo quadrático para K_2HPO_4 foi removido do modelo por ser não significativo. Portanto, a concentração de glicerol tem mais influência sobre as variáveis dependentes (produção de 1,3-propanodiol e RPS) do que a concentração de K_2HPO_4. De acordo com valores de *F* e *p*, das tabelas 5.7 e 5.8, verifica-se que o modelo se ajusta de forma adequada aos pontos experimentais, representando com

confiabilidade os resultados, e ainda a falta de ajuste (*lack of fit*) do modelo não foi significativa ($p > 0,05$).

As superfícies de resposta, plotadas a partir do DCCR, utilizando o *software* Statistica 6.0, mostram a relação de cada variável dependente (produção de 1,3-propanodiol e RPS) com as independentes (glicerol e K_2HPO_4), nas figuras 5.7 e 5.8. Aparentemente, as duas variáveis dependentes apresentam um ponto de máximo neste intervalo de estudo.

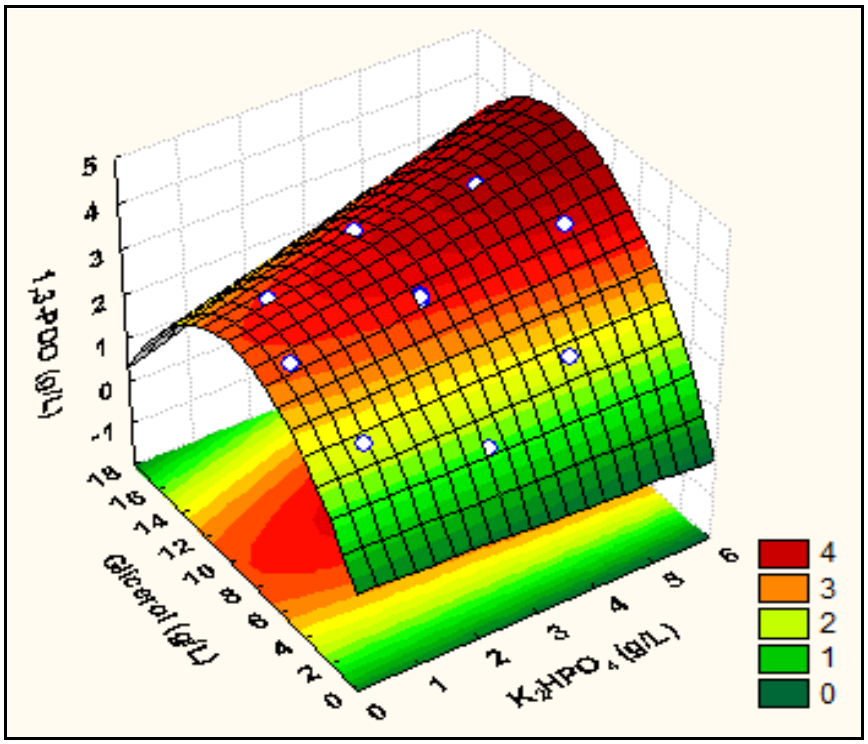

Figura 5.7: Superfície de resposta da otimização das concentrações de K_2HPO_4 e glicerol em função de **1,3-propanodiol (1,3-PDO) (g/L)**, para formulação do meio ótimo para fermentação de glicerol.

Por meio da análise da superfície de resposta verifica-se que a maior concentração de 1,3-propanodiol (4,1 g/L) é obtida no maior nível de glicerol e K_2HPO_4 (Figura 5.7). O maior valor de RPS foi obtido no menor nível de concentração de glicerol, e não houve influência da variação da concentração de K_2HPO_4 no menor nível de concentração de glicerol, nas condições estudadas (Figura 5.8).

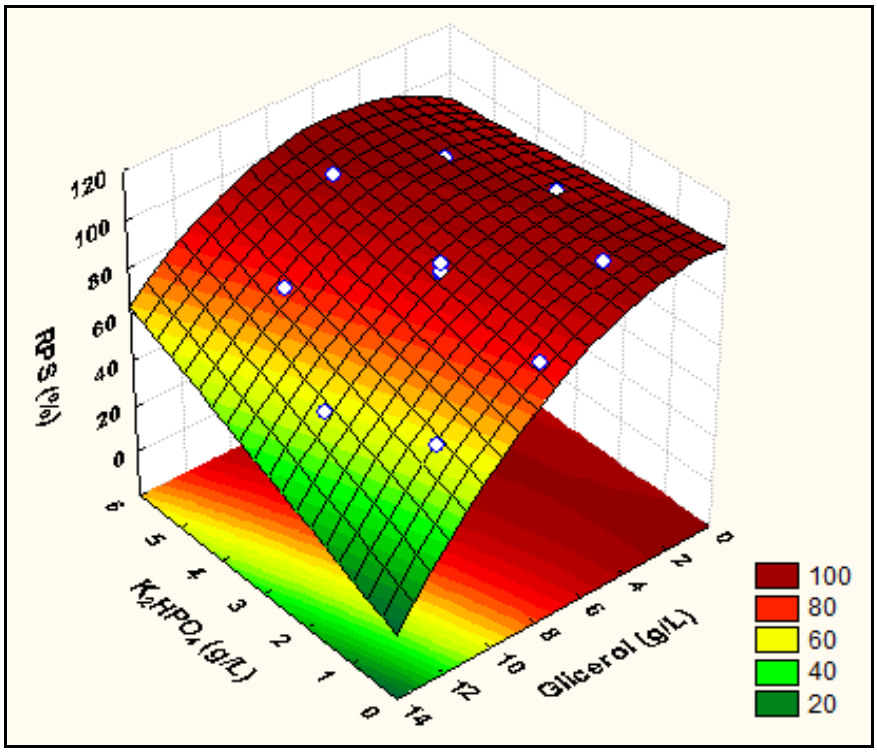

Figura 5.8: Superfície de resposta da otimização das concentrações de K_2HPO_4 e glicerol em função de **RPS (%)**, para formulação do meio ótimo para fermentação de glicerol.

5.2.1 Validação do Meio Ótimo de Produção

Para validar a condição ótima dos fatores foi utilizada a função Desirability do *software* Statistica 6.0. O valor da função *Desirability* (figura 5.9) para atingir o ponto máximo para os dois fatores, simultaneamente, foi de 0,93, o que significa que essa função atinge 93% do máximo obtido para cada variável dependente (variável de resposta).

O meio ótimo para produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol (por *C. beijerinckii* DSM 791, em frascos a 80 rpm e 37°C), de acordo com a sequência de planejamentos experimentais foi: 10 g/L de glicerol, 0,5 g/L de extrato de levedura, 0,005 g/L de $C_2H_3NaO_2$ e 5 g/L de K_2HPO_4.

Um modelo matemático foi gerado para cada uma das variáveis dependentes. Os modelos matemáticos que representam a produção de 1,3-propanodiol e RPS, nas condições estudadas, são descritos nas equações (5.1) e (5.2):

$$\textbf{1,3-propanodiol (g/L)} = 3{,}43 - 0{,}45.g^2 + 0{,}22.f + 0{,}78.g + 0{,}18.f.g \quad (5.1)$$

$$\textbf{RPS (\%)} = 90{,}88 - 6{,}82.g^2 + 5{,}88.f - 16{,}05.g + 4{,}81.f.g \quad (5.2)$$

Onde,

RPS: redução percentual de substrato (%);

f: concentração de K_2HPO_4 (g/L);

g: concentração de glicerol (g/L).

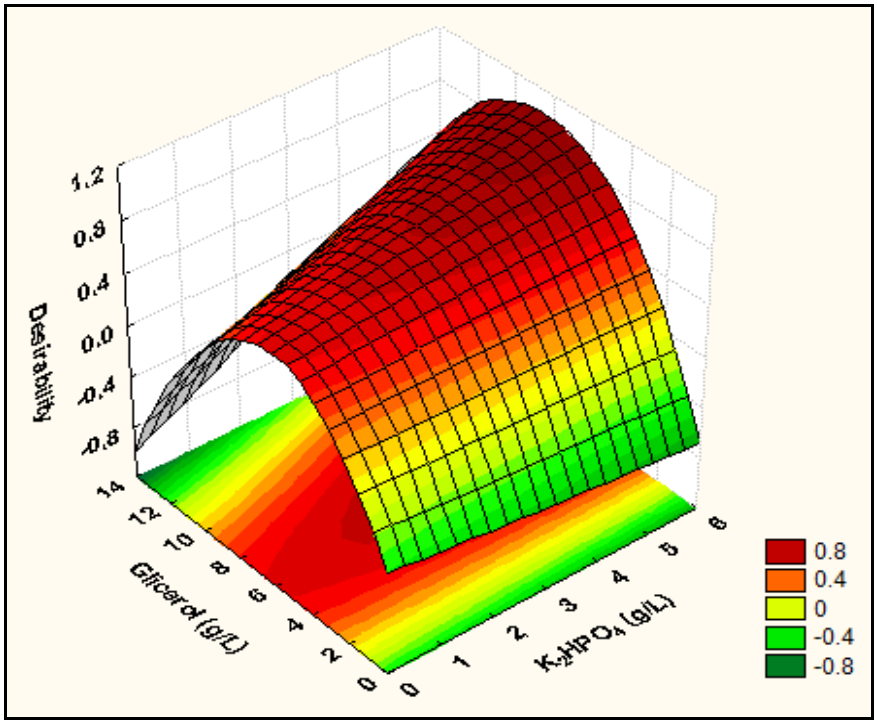

Figura 5.9: Superfície da **função *Desirability*** para otimização das concentrações de K_2HPO_4 e glicerol.

Na tabela 5.9 podem ser observados os valores preditos para produção de 1,3-propanodiol e RPS, os valores limites (considerando 95% de limite de confiabilidade), bem como os resultados da validação obtidos experimentalmente. Analisando esses resultados, verifica-se que o modelo foi validado uma vez que os resultados experimentais encontram-se dentro da faixa limite predita pelo modelo. O perfil cinético da fermentação propanodiólica empregando o meio otimizado e validado é apresentada na figura 5.10.

Tabela 5.9: Validação do modelo previsto pela função *Desirability* para otimização do meio de cultura com *C. beijerinckii* DSM 791.

Fator	Limites -95%	Limites +95%	Valor predito	Resultado experimental
1,3-PDO (g/L)	3,85	4,14	3,99	3,85 ± 0,06
RPS (%)	92	100	96	100,0 ± 0,00

1,3-PDO: 1,3-propanodiol e RPS: redução percentual de substrato.

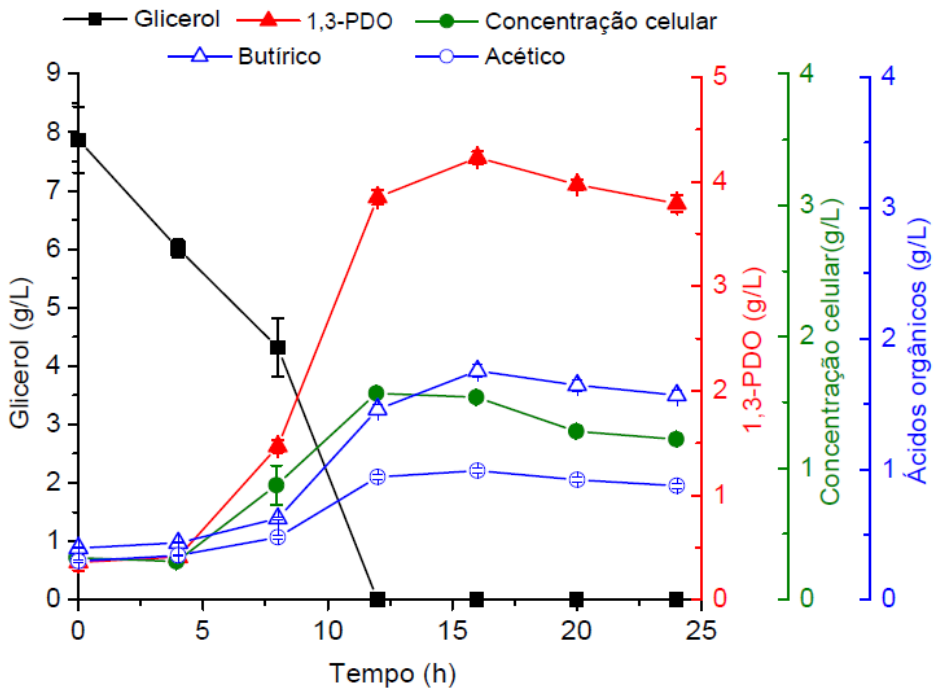

Figura 5.10: Cinética de fermentação nas condições otimizadas em **frascos**, favorecendo o consumo de glicerol e a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) por *C. beijerinckii* DSM 791 a 37°C e 80 rpm.

Após a validação do modelo em frascos agitados, realizou-se a validação em biorreator mecanicamente agitado, o perfil cinético pode ser observado na figura 5.11. Cabe salientar que as células foram ativadas em frascos e propagadas em biorreator. Terminado o processo de propagação, as células foram centrifugadas e inoculadas em biorreator, em meio de produção novo, previamente preparado e esterilizado, sob condições anaeróbias.

O rendimento obtido na etapa de validação em frascos foi de 0,49 g/g, após 12 horas de fermentação, sem controle de pH, com uma eficiência de fermentação de 82%. Já no biorreator o rendimento foi de 0,46 g/g, sem controle de pH, com uma

eficiência de fermentação de 77%. Por meio do perfil cinético em biorreator (Figura 5.11), observa-se que no início da etapa de produção um período de adaptação das células, possivelmente, devido centrifugação das células entre as etapas de propagação e produção, o que também pode ter prejudicado o rendimento e a eficiência desta fermentação.

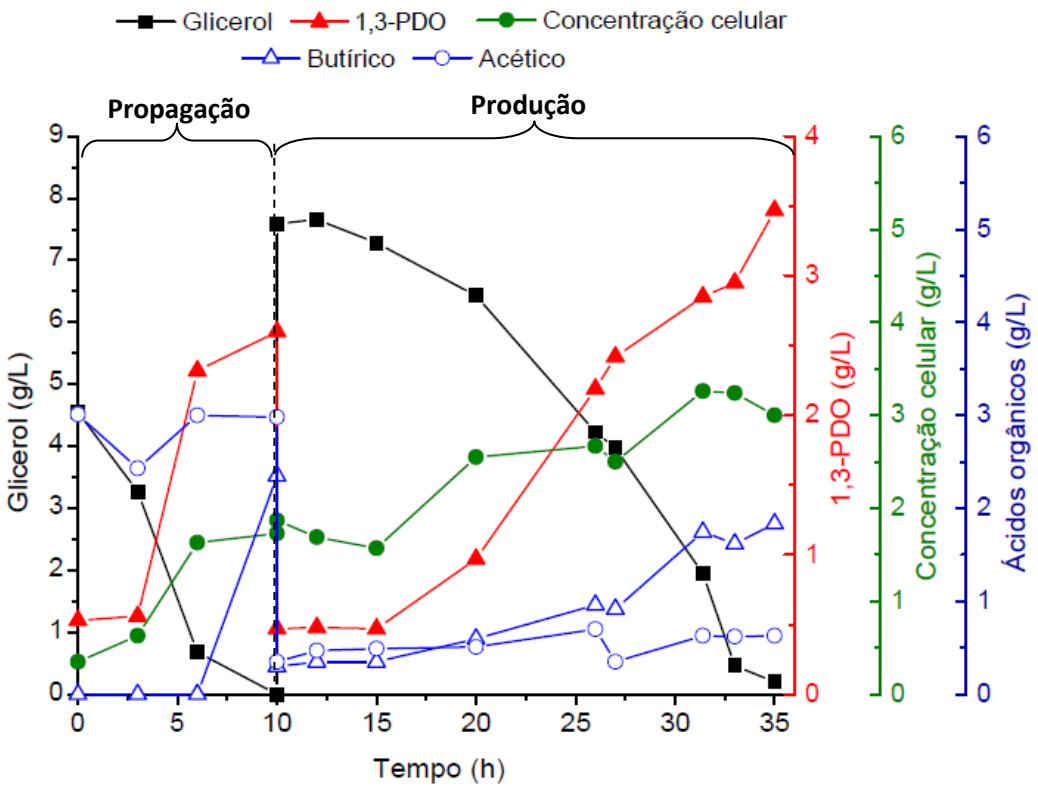

Figura 5.11: Perfil cinético de crescimento bacteriano, consumo de glicerol, produção de ácidos orgânicos e 1,3-propanodiol (1,3-PDO), por *C. beijerinckii* DSM 791 em **biorreator agitado mecanicamente** (100 rpm) a 37°C.

Esses resultados (Figuras 5.10 e 5.11), são comparáveis aos obtidos por GUNGORMUSLER, GONEN & AZBAR (2010a), que relataram um rendimento de 0,48 g/g, em 24 horas, por *C. beijerinckii* NRRL B-593. Em outro estudo, GUNGORMUSLER et al. (2010b) compararam o potencial de produção de 1,3-propanodiol, sem controle de pH, por diferentes espécies de *Clostridium* (*C. saccharobutylicum*, *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum*, *C. beijerinckii* e *C. butyricum*). Os rendimentos obtidos variaram de 0,31 g/g até 0,45 g/g, enquanto a RPS variou entre 38% e 93%, em 24 horas de fermentação.

O rendimento obtido por BIEBL et al. (1992) foi de 0,47 g/g, em processos de fermentação em batelada simples, utilizando *C. butyricum* SH1 (DSM 5431), com 26,0 g/L de glicerol e 9,5 horas de fermentação.

GONZÁLEZ-PAJUELO, ANDRADE & VASCONCELOS (2004), obtiveram um rendimento de 0,48 g/g para fermentações em batelada simples, com consumo de 39,6 g/L glicerol, utilizando *C. butyricum* VPI 3266 em 24 h de processo. MOON et al. (2010) também otimizaram o meio para produção de 1,3-propanodiol sem controle de pH por *C. pasteurianum* e obtiveram um rendimento de 0,30 g/g em 24 h.

A quantificação de glicerol das amostras desta validação em biorreator, foram analisadas pelo método enzimático e por CLAE, pois o método enzimático possibilita a determinação do consumo de glicerol durante a realização do experimento. Nas figuras 5.12 e 5.13 são apresentados os resultados para algumas destas amostras, respectivamente, a comparação direta entre os resultados das duas técnicas de análises e a correlação entre esses resultados.

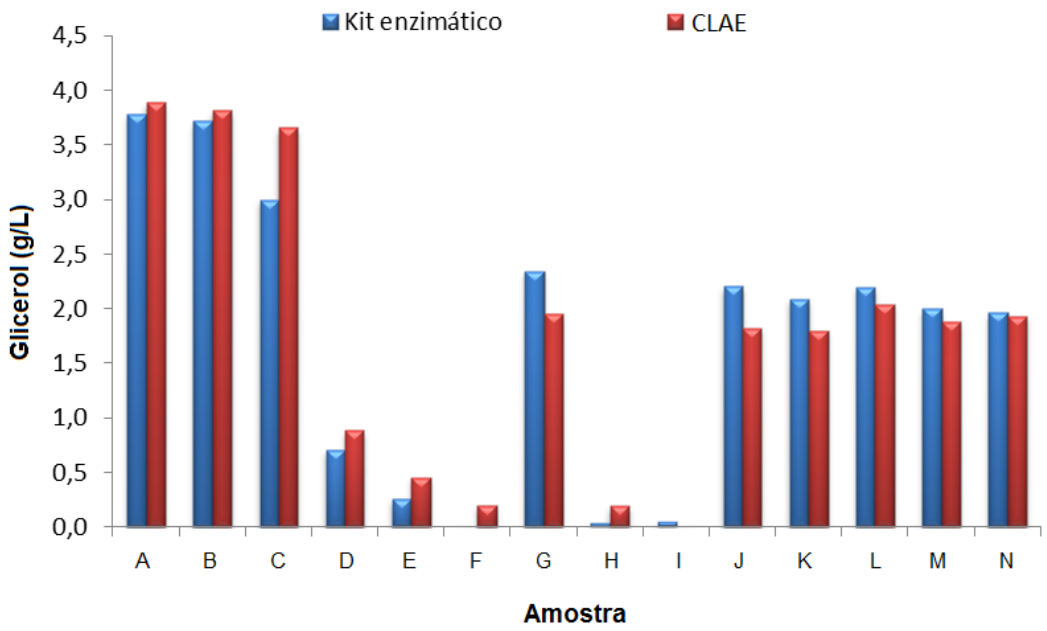

Figura 5.12: Comparação entre os métodos enzimático e CLAE de determinação de glicerol.

Analisando os resultados das figuras 5.12 e 5.13, observou-se que há uma boa correlação entre os métodos já que o R^2 obtido foi de 0,956. Apesar de o método CLAE ser mais preciso, a principal vantagem de se utilizar o método enzimático é a resposta rápida.

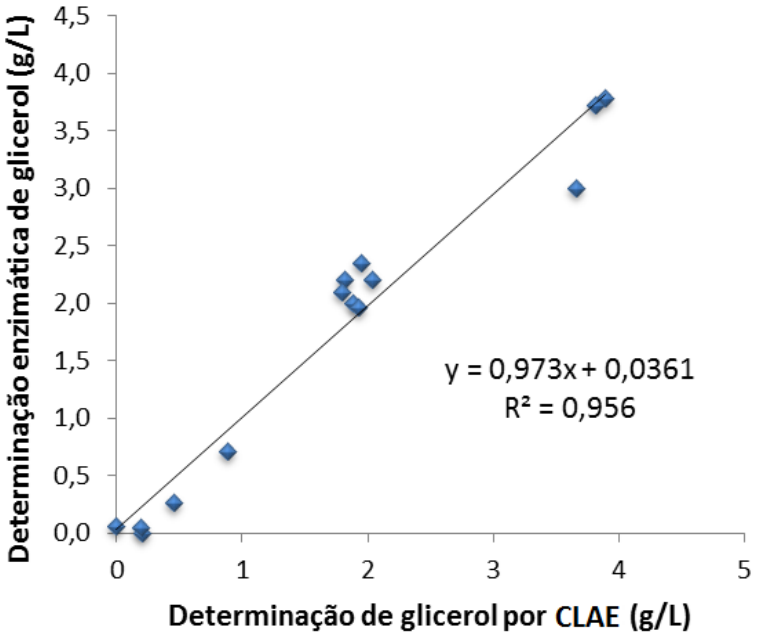

Figura 5.13: Correlação entre os métodos enzimático e CLAE de quantificação de glicerol.

5.2.2 Comparação do Meio Otimizado com Outros Meios Tradicionalmente Empregados para *Clostridium* spp.

Fermentações em frascos agitados utilizando diferentes meios foram conduzidas visando comparar o desempenho da linhagem selecionada, no meio otimizado com outros meios mais complexos, tradicionalmente empregados em fermentações por *Clostridium* spp.: P2, contendo solução de vitaminas e minerais (FORMANEK, MACKIE & BLASCHEK, 1997; AGUILAR & ARIAS, 2013) e CGM, contendo solução de minerais (HEAP et al., 2009; YU et al., 2015; XU et al., 2015); as composições desses meios são descritas na tabela 4.7.

Os resultados experimentais, obtidos com essas fermentações, tabela 5.10, indicam que em todos os meios avaliados o glicerol foi integralmente consumido e houve pouca diferença entre os resultados de produção de 1,3-propanodiol. Contudo, o rendimento e a produtividade volumétrica foram maiores para o meio otimizado neste trabalho, portanto, este foi o meio selecionado para dar continuidade aos trabalhos.

Tabela 5.10: Variáveis de resposta de fermentações utilizando-se 10,0 g/L de glicerol como fonte de carbono em frascos, a 80 rpm, 37°C em 24 h.

Meio de cultura	1,3-PDO (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	Q_P ($g/L.h^{-1}$)
Otimizado	4,23	0,42	100	0,35
P2	3,21	0,32	100	0,27
CGM	3,99	0,40	100	0,33

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato, RPS: redução percentual de substrato e Q_P: produtividade volumétrica.

Alguns autores obtiveram melhores rendimentos controlando o pH durante a fermentações por *Clostridium* spp.. Por exemplo, BIEBL et al. (1992) alcançaram um rendimento de 0,51 g/g com *C. butyricum* e OTTE et al. (2009) lograram 0,53 g/g com *C. diolis*, controlando essa importante variável – o pH, foco da próxima etapa deste trabalho.

5.3 OTIMIZAÇÃO DO pH PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR *C. beijerinckii* DSM 791

De maneira geral, *Clostridium* spp. apresentam boa atividade em meios ácidos, com pH do cultivo podendo variar de 4,7 a 8,0, mas a produção é prejudicada nos valores extremos de pH. O efeito tóxico da acidez do meio parece ser devido a concentração crítica de íons hidrogênio no interior das células e não propriamente pelo pH externo (LIMA et al., 2001).

Vários estudos indicam que a manutenção do pH ótimo durante o cultivo de *Clostridium* spp., não apenas aumenta o crescimento celular e o consumo do substrato, como também melhora a produção e a produtividade do processo fermentativo (HUANG, RAMEY & YANG, 2004; GUO et al., 2012; LI et al., 2011; JIANG et al., 2013; JIANG et al. 2014; ABUBACKAR, BENGELSDORFB & VEIGA, 2016). Esse fenômeno ocorre, possivelmente, devido a produção de 1,3-propanodiol ser associada ao crescimento.

A figura 5.14 apresenta os resultados das fermentações em batelada alimentada com *C. beijerinckii* DSM 791, utilizando o meio otimizado neste trabalho (Tabela 4.7), em biorreator agitado mecanicamente a 100 rpm, temperatura de 37°C,

variando-se o pH da fermentação de 4,8 a 7,0. O valor de pH de 4,8 é o obtido ao final do processo, corresponde à fermentação sem controle do pH. Em 72 horas de processo foram feitas duas alimentações de 10 g/L de glicerol cada.

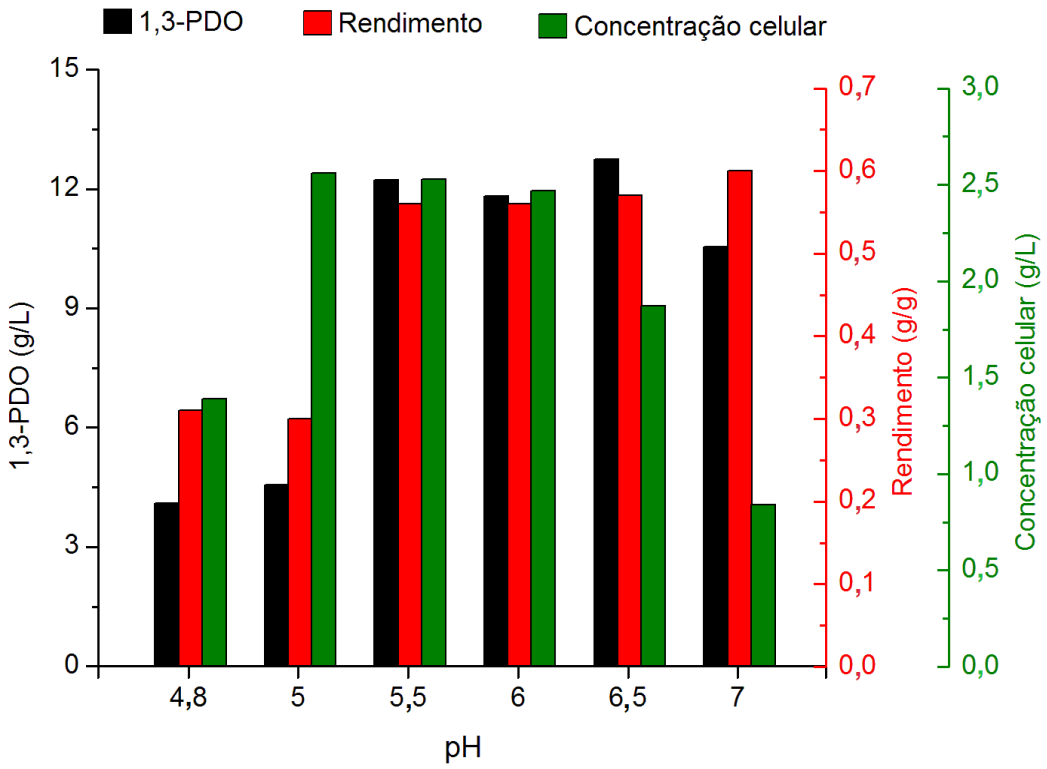

Figura 5.14: Otimização do pH em batelada alimentada com meio otimizado por *C. beijerinckii* DSM 791, conduzidas em biorreator mecanicamente agitado (100 rpm), 37°C em 72 h.

Aparentemente, sem o controle do pH, a acidez do meio aumenta no decorrer da fermentação, o que levou a redução do pH a até 4,8. Essa diminuição do pH é causada pela co-produção dos ácidos butírico e acético pela própria bactéria. Nos valores de pH 5,0 e 6,0, a concentração celular atinge os maiores valores, indicando que essa é a faixa de pH preferida pelas células, o que pode significar maior estabilidade para processos fermentativos muito longos.

Em valores de pH de 5,5 a 7,0, o rendimento em gramas de 1,3-propanodiol por gramas de glicerol consumido atinge 0,55. A produção de 1,3-propanodiol é favorecida em pH 6,5, porém a densidade celular é prejudicada. Desta forma, nos experimentos posteriores, optou-se por manter o pH entre 5,5 e 6,0 favorecendo assim a produção de 1,3-propanodiol e também o crescimento celular.

5.3.1 Aumento da Concentração de Glicerol Adicionando ao Meio

Ao se verificar um maior consumo de glicerol sob pH controlado e visando o aumento da produção de 1,3-propanodiol, foram realizados experimentos de avaliação do aumento de consumo de glicerol em frascos, com o meio otimizado (Tabela 4.7), 20% (v/v) de inóculo, variando a concentração de glicerol de 10,0 a 60,0 g/L (Tabela 5.11), na presença de elevada concentração de $CaCO_3$ (20 g/L) para manter o pH ótimo, entre 5,5 e 6,0.

Tabela 5.11: Avaliação do consumo de diferentes concentrações de glicerol em frascos a 37°C, 80 rpm e meio otimizado por *C. beijerinckii* DSM 791 durante 96 h.

Glicerol (g/L)	1,3-PDO (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)
10,00	5,16	0,52	100
20,00	10,01	0,52	98
30,00	11,18	0,54	71
40,00	8,25	0,58	36
50,00	5,18	0,55	17
60,00	5,68	0,56	18

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato e RPS: redução percentual de substrato.

.

Até a concentração de 30,0 g/L de glicerol houve o aumento da concentração de 1,3-propanodiol. Já os valores de RPS caem drasticamente a partir de 40,0 g/L de glicerol. Em geral a produção e a RPS de fermentações em biorreator, por ser mais controlada, é melhor do que em frascos. Portanto, a concentração de glicerol adotada para os experimentos seguintes em frascos e biorreatores foi de 30,0 g/L.

5.4 ADIÇÃO DE GLICOSE COMO CO-SUBSTRATO

A adição de glicose ao meio de fermentação foi avaliada em experimentos conduzidos em frascos e em biorreator, por *C. beijerinckii* DSM 791 a 37°C. Primeiramente nos frascos, foi adicionada na proporção de 1:1 (glicerol/glicose) aos meios otimizado, P2 e CGM. A quantidade de inóculo adicionada foi de 20% (v/v), 10 g/L de glicerol e agitação de 80 rpm. De acordo com os resultados (Tabela 5.12), o

consumo de glicerol não foi total e a produção de 1,3-propanodiol diminui se comparada com os resultados das fermentações apenas com glicerol (Tabela 5.10).

Tabela 5.12: Variáveis de resposta de fermentações utilizando-se 10,0 g/L de glicerol e 10,0 g/L de glicose como fonte de carbono em frascos, a 80 rpm, 37°C por 24 h.

Meio de cultura	1,3-PDO (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	Q_P ($g/L.h^{-1}$)
Otimizado	0,63	0,12	44	0,05
P2	1,09	0,14	67	0,09
CGM	2,68	0,31	76	0,22

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato, RPS: redução percentual de substrato e Q_P: produtividade volumétrica.

Realizou-se uma segunda série de experimentos em frascos, para avaliar melhor o efeito da glicose sobre a atividade fermentativa das células, buscando favorecer a produção de 1,3-propanodiol. Os ensaios foram feitos nas mesmas condições dos experimentos anteriores, mas desta vez adicionando-se 30,0 g/L de glicerol, 20 g/L $CaCO_3$ e concentrações de glicose de 0,0 g/L a 15,0 g/L. Os resultados podem ser visualizados na figura 5.15.

Neste estudo, buscou-se avaliar se baixas concentrações de glicose favoreceriam na produção de 1,3-propanodiol. No entanto, observou-se que mesmo sob baixa concentração, a presença de glicose é prejudicial à produção de 1,3-propanodiol e ao consumo de glicerol. Observou-se, claramente, que há de fato desvio do metabolismo em presença de glicose, que leva à produção de ácidos orgânicos (butírico e acético). Além disso, essa produção é tanto maior quanto maior for a concentração de glicose adicionada ao meio.

Uma última tentativa de se utilizar glicose como co-substrato foi conduzida em biorreator agitado mecanicamente com *C. beijerinckii* DSM 791, 10% (v/v) de inóculo e 100 rpm (Figura 5.16), com pH controlado entre 5,5 e 6,0. Neste ensaio, iniciou-se a fermentação com o meio otimizado adicionando-se apenas glicose como fonte de carbono (19,0 g/L). Quando a glicose foi totalmente consumida, alimentou-se o biorreator com glicerol numa concentração de 22,0 g/L.

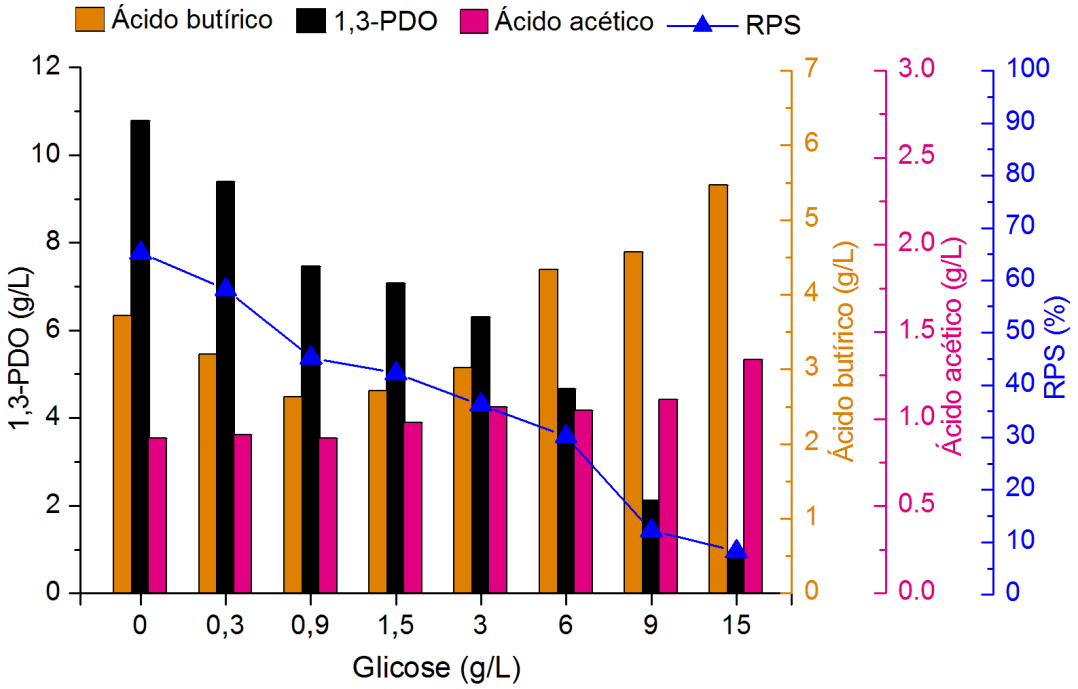

Figura 5.15: Efeito da concentração de glicose sobre produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), ácidos e RPS na fermentação propanodiólica conduzida em frascos a 37°C, 80 rpm, 30 g/L de glicerol por 72 h.

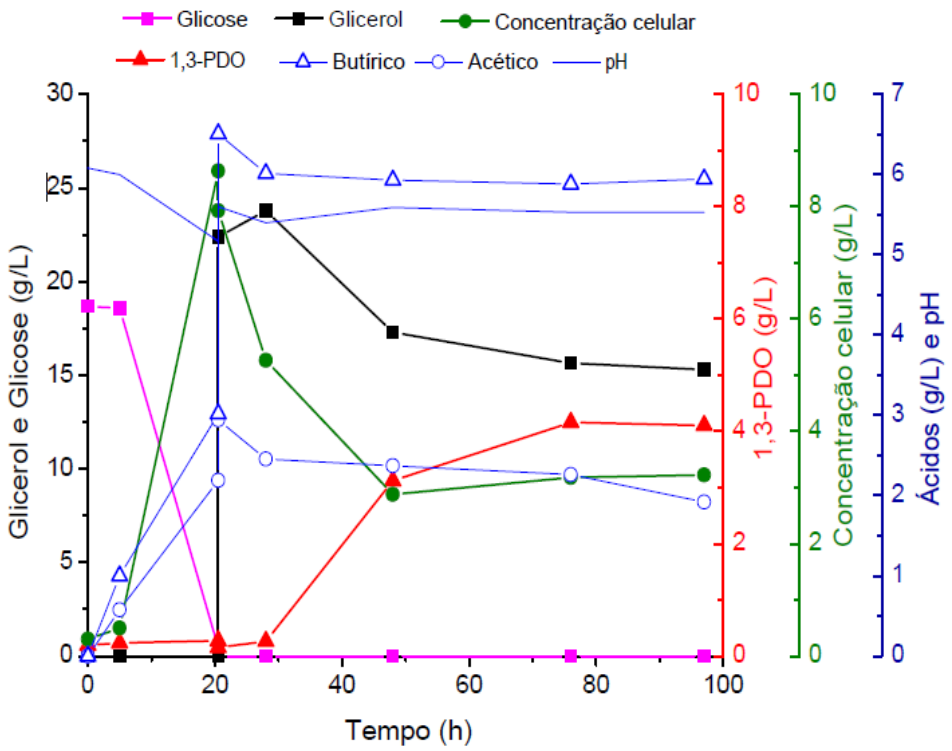

Figura 5.16: Cinética de fermentação de *C. beijerinckii* DSM 791, a 37°C, utilizando-se glicose primeiramente e glicerol na sequência, como fontes de carbono, em biorreator agitado mecanicamente (100 rpm).

Observou-se que enquanto havia apenas glicose no meio não houve produção de 1,3-propanodiol, mas sim de ácidos butírico e acético e aumento da concentração celular. Os resultados corroboram com os obtidos em frascos neste item e anteriormente no delineamento experimental de *Plackett-Burman* (Figura 5.5 -a adição de glicose foi significativa negativa, prejudicando a produção de 1,3-propanodiol).

Estes resultados indicam que o glicerol é necessário para induzir a expressão de genes da via metabólica que leva a síntese do 1,3-propanodiol (Figura 2.8). Nota-se ainda que a afinidade da célula pela glicose é maior do que pelo glicerol, causando repressão catabólica do consumo de glicerol enquanto houver glicose no meio.

SAINT-AMANS et al. (2001), em suas investigações, utilizando *C. butyricum*, também observaram que culturas crescidas em glicose produziram apenas ácidos orgânicos (acético, butírico e lático) e um elevado nível de hidrogênio. No entanto, quando apenas glicerol é adicionado, o 1,3-propanodiol tornou-se o produto principal e a taxa específica de formação de ácidos e H_2 diminuiu.

5.5 SUBSTITUIÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA POR MILHOCINA

A milhocina é reconhecida como uma excelente fonte de nitrogênio para a maioria dos microrganismos, devido ao seu alto conteúdo em aminoácidos e polipeptídeos, além de quantidades consideráveis de vitaminas do complexo B e minerais (PAREKH, FORMANEK & BLASCHEK, 1999; AZEREDO et al., 2006).

Vários autores utilizam milhocina para obtenção de produtos químicos de interesse, por exemplo: ácido L-lático, por *Bacillus coagulans* (WANG et al. 2015); produção de manitol por *Lactobacillus* (RACINE & SAHA, 2007); produção de etanol por *Clostridium* P11 (MADDIPATI et al., 2011); ácido propiônico, por *Propionibacterium freudenreichii* (WANG & YANG, 2013); além da produção de solventes (acetona-butanol-etanol) por *Zymomonas mobilis* (LAWFORD & ROUSSEAU, 1997).

Porém, a composição centesimal da milhocina varia de acordo com a safra e a cultivar de milho. Em 1948, LIGGETT & KOFFLER analisaram 100 diferentes lotes de milhocina e obtiveram a composição média dessa fonte de nitrogênio (Tabela 5.13), essa composição concorda com aquelas relatadas por CARDINAL &

HEDRICK (1947) e LAWFORD & ROUSSEU (1997).

Tabela 5.13: Composição média da milhocina de 100 diferentes lotes de acordo com LIGGETT & KOFFLER (1997).

Componente	Quantidade (%)
Água	45-55
Nitrigênio total	2,7-4,5
Açúcares	0,1-11,0
Ácido lático	5-15
Cinzas	9-10
Ácidos voláteis	0,1-0,3
SO_2	0,009-0,015

Neste trabalho a adição de milhocina foi avaliada em fermentações realizadas em frascos e em biorreator. Nos ensaios em frascos, a milhocina foi adicionada ao meio de cultivo em concentrações de 0,0 g/L a 90,0 g/L. As fermentações foram conduzidas contendo 30,0 g/L de glicerol, 20% (v/v) de inóculo, a 37°C, 80 rpm e pH inicial de 6,0, durante 72 horas (Tabela 5.14).

Tabela 5.14: Efeito da concentração de milhocina em fermentações em frascos, a 37°C e com concentração inicial de glicerol de 30,0 g/L por *C. beijerinckii* DSM 791, durante 72 h.

Milhocina (g/L)	1,3-PDO (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	Q_P ($g/L.h^{-1}$)
0,00 (E.L.)	9,41	0,52	60	0,39
6,00	5,17	0,53	33	0,22
9,00	5,87	0,52	38	0,25
15,00	6,72	0,50	44	0,28
30,00	10,15	0,52	64	0,42
60,00	11,72	0,52	75	0,49
90,00	12,26	0,53	77	0,51

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato, RPS: redução percentual de substrato e Q_P: produtividade volumétrica.

Os resultados da tabela 5.14 mostram que até a concentração de 30,0 g/L houve um aumento progressivo na produção de 1,3-propanodiol. No entanto, ao se duplicar ou triplicar a concentração de milhocina, não se verificou variações tão significativas na concentração de 1,3-propanodiol. Portanto, a fonte de nitrogênio empregada nas próximas fermentações deste trabalho foi milhocina à 30 g/L.

Uma vez otimizada a concentração de milhocina em frascos, foram conduzidos experimentos para a avaliação da substituição do extrato de levedura por milhocina, também em biorreator mecanicamente agitado por *C. beijerinckii* DSM 791. Este estudo constitui-se de bateladas simples com o meio otimizado (Tabela 4.7), ao qual se adicionou 30 g/L de glicerol e as seguintes condições de processo: 10% (v/v de inóculo), 37°C, 100 rpm e pH controlado entre 5,5 e 6,0.

Nas figuras 5.17 e 5.18 são apresentadas as cinéticas de produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol, com diferentes fontes de nitrogênio. O primeiro perfil (Figura 5.17) corresponde o emprego de extrato de levedura, enquanto que o segundo (Figura 5.18) corresponde a utilização de milhocina a 30 g/L como fonte de nitrogênio.

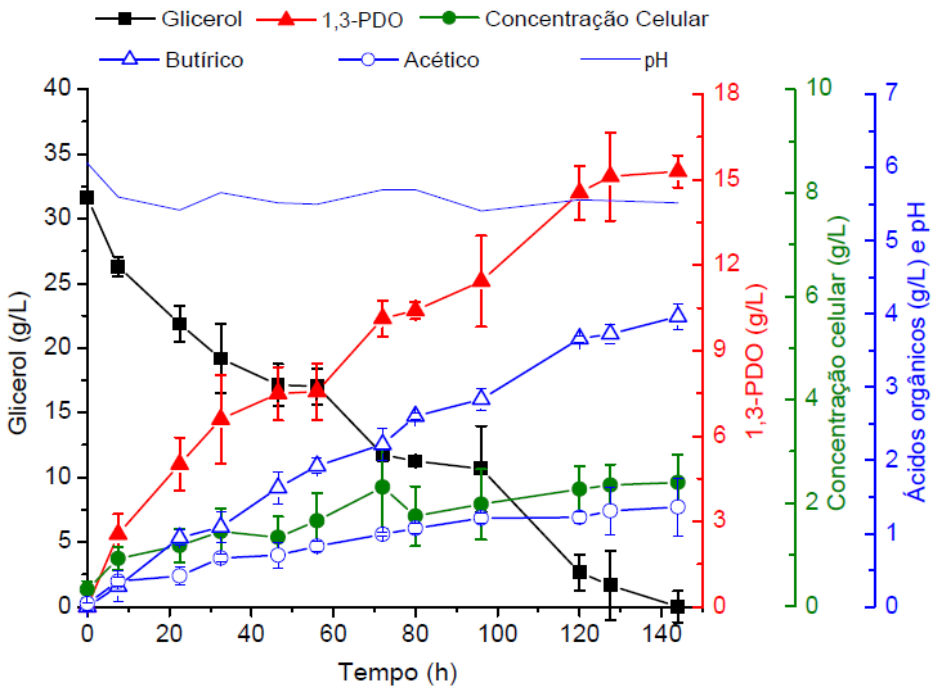

Figura 5.17: Perfil cinético de fermentação propanodiólica em batelada simples por *C. beijerinckii* DSM 791, utilizando meio otimizado, com **extrato de levedura**, a 37°C, em biorreator mecanicamente agitado (100 rpm) e pH controlado entre 5,5 e 6,0.

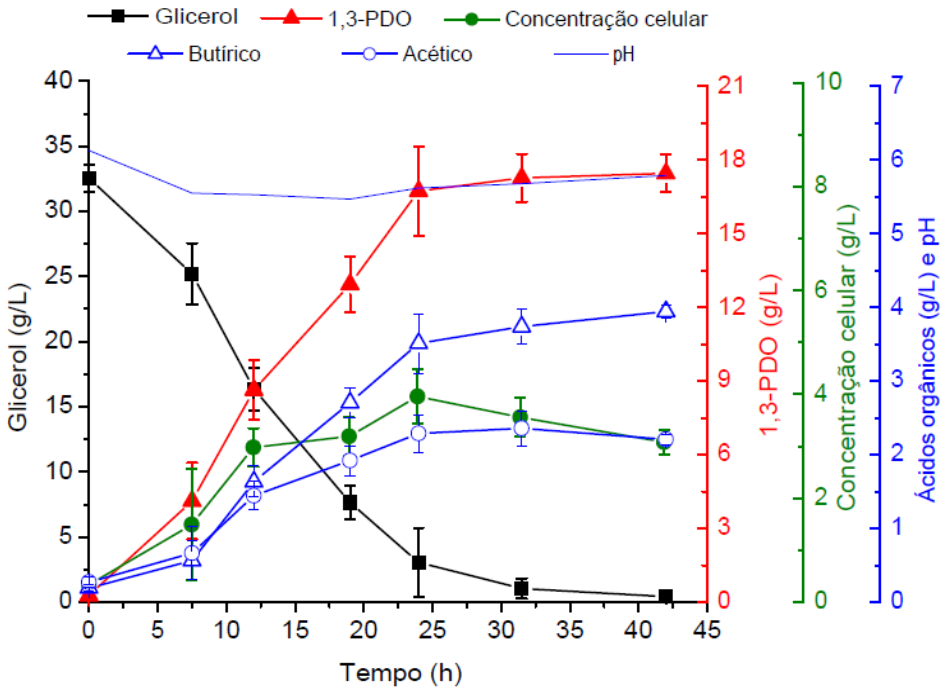

Figura 5.18: Perfil cinético de fermentação propanodiólica em batelada simples por *C. beijerinckii* DSM 791, a 37°C, utilizando meio otimizado, substituindo o extrato de levedura por **milhocina** (30,0 g/L), em biorreator mecanicamente agitado (100 rpm) e pH controlado entre 5,5 e 6,0.

Os perfis indicam que independentemente da fonte de nitrogênio utilizada na fermentação, quando o glicerol foi usado como substrato, o 1,3-propanodiol foi o produto principal e os ácidos butírico e acético, os subprodutos. As variáveis de resposta dos perfis cinéticos das figuras 5.17 e 5.18 foram calculados e podem ser visualizados na tabela 5.15.

A fermentação com milhocina apresentou uma taxa específica de crescimento mais elevada (0,20 h^{-1}) quando comparada com o meio contendo extrato de levedura (0,14 h^{-1}), bem como um maior valor de produtividade volumétrica (0,72 $g/L.h^{-1}$, meio com milhocina; 0,12 $g/L.h^{-1}$, meio com extrato de levedura). O rendimento de 1,3-propanodiol, a partir de glicerol, aumentou em 10% quando a milhocina foi utilizada como fonte de nitrogênio (0,55 g/g), em relação ao valor obtido usando extrato de levedura (0,50 g/g).

A concentração de 1,3-propanodiol obtida neste estudo, com a adição de milhocina ao meio de fermentação (17,3 g/L), foi maior do que a obtida por LEJA et al. (2011) com *Clostridium bifermentans* (7,3 g/L) e praticamente a mesma que os autores obtiveram com *Clostridium sordelli* (17,0 g/L), ambas isoladas de amostras de solo.

Tabela 5.15: Variáveis de resposta de fermentações em batelada simples em meios otimizados com extrato de levedura e milhocina, em biorreator agitado mecanicamente (100 rpm) a temperatura de 37ºC e pH controlado entre 5,5 e 6,0.

Batelada simples	Otimizado, com extrato de levedura	Otimizado, com milhocina
1,3-PDO (g/L)	15,30 ± 0,6	17,27 ± 1,1
Q_P (g/L.h^{-1})	0,12 ± 0,05	0,71 ± 0,08
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,50 ± 0,02	0,54 ± 0,02
EF (%)	83,3 ± 0,1	90,0 ± 0,1
RPS (%)	98,2 ± 1,8	98,0 ± 1,3
μ_x (h^{-1})	0,06 ± 0,01	0,18 ± 0,01
t_d (h)	11,53 ± 0,41	3,85 ± 0,19

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, Q_P: produtividade volumétrica, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato, EF: eficiência de fermentação, RPS: redução percentual de substrato, μ_x: taxa específica de crescimento e t_d: tempo de duplicação.

A adição de milhocina ao meio de fermentação como substituinte do extrato de levedura, constitui-se em uma excelente fonte de nitrogênio alternativa, como pode ser observado pelos resultados deste item 5.5. As melhorias obtidas no processo podem ser atribuídas à adição de milhocina que, além das vantagens tecnológicas, é um subproduto da indústria de moagem úmida do milho, e, consequentemente, tem um preço de mercado menor que o do extrato de levedura.

5.5.1 Influência do Ácido Lático

LIGGETT & KOFFLER (1948), relataram que não só a presença de aminoácidos, vitaminas e minerais, como também a presença de ácido lático na composição da milhocina, melhoram o rendimento e a produtividade da fermentação. Para investigar melhor essa influência do ácido lático foram realizados ensaios em frascos, utilizando meio otimizado (Tabela 4.7) adicionado de 30,0 g/L de glicerol e concentrações variáveis de ácido lático (0 a 10,0 g/L); 20% (v/v) de inóculo, a 37°C, 80 rpm durante 72 horas.

De acordo com os resultados, tabela 5.16, o ácido lático influencia positivamente a produção e o rendimento de 1,3-propanodiol, bem como a RPS e a produtividade volumétrica.

Tabela 5.16: Influência da presença de ácido lático exógeno durante a fermentação propanodiólica em frascos, por *C. beijerinckii* DSM 791, a 37°C, 80 rpm e 30,0 g/L de glicerol inicial.

Ác. lático (g/L) adicionado	1,3-PDO (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	Q_P (g/L.h^{-1})
0,00	9,26	0,52	57	0,39
1,00	9,95	0,54	59	0,41
2,50	10,55	0,55	60	0,44
5,00	14,60	0,56	81	0,61
7,00	15,43	0,59	85	0,64
10,00	17,39	0,57	98	0,72

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato, RPS: redução percentual de substrato e Q_P: produtividade volumétrica.

Para melhor entender de que forma o ácido lático influencia na fermentação propanodiólica, calculou-se as estequiometrias e balanços redox, com os dados experimentais obtidos neste trabalho (Tabela 5.15), por meio da metodologia proposta por VILLADSEN, NIELSEN & LIDÉN (2011), descrita na seção 4.9.1.

Os balanços estequiométrico e redox para o perfil de fermentação com extrato de levedura (Figura 5.17) podem ser observados, respectivamente, nas equações (5.3) e (5.4):

$$CH_{2,66}O \rightarrow 0{,}597CH_{2,66}O_{0,66} + 0{,}096CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2} + 0{,}178CH_2O_{0,5} + 0{,}045CH_2O \quad (5.3)$$

$$-CH_{2,66}O + 0{,}597CH_{2,66}O_{0,66} + 0{,}096CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2} + 0{,}178CH_2O_{0,5} + 0{,}045CH_2O \cong 0 \quad (5.4)$$

O balanço estequiométrico e redox para o perfil de fermentação com milhocina, em substituição ao extrato de levedura, (Figura 5.18) podem ser observados, respectivamente, nas equações (5.5) e (5.6):

$$CH_{2,66}O + 0{,}053CH_2O \rightarrow 0{,}666CH_{2,66}O_{0,66} + 0{,}155CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2} + 0{,}172CH_2O_{0,5} + 0{,}071CH_2O \quad (5.5)$$

$$-CH_{2,66}O - 0{,}053CH_2O + 0{,}666CH_{2,66}O_{0,66} + 0{,}155CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2} + 0{,}172CH_2O_{0,5} + 0{,}071CH_2O \cong 0 \quad (5.6)$$

Sabendo que um grau de redutibilidade ligeiramente maior do substrato favorece à convesão do mesmo em produto, nota-se que a adição de ácido lático aumenta o grau de redutibilidade do lado dos substratos, favorencendo assim a formação de 1,3-propanodiol. Portanto, a substituição do extrato de levedura por milhocina é indicada para fermentação propanodiólica do glicerol, por *C. beijerinckii* DSM 791, pois atua não apenas como uma excelente fonte de nitrogênio como também favorece a produção de 1,3-propanodiol devido a presença de ácido lático.

Ressalta-se ainda que, na rota metabólica da Figura 2.8, verifica-se que a reação de produção de ácido lático consome NADH, enquanto que a sua reação inversa (a reação de assimilação ácido lático pela bactéria) levaria a formação de NADH.

Portanto, na fermentação propanodiólica a partir de glicerol, o ácido lático, aparentemente, atua como uma fonte adicional de carbono, aumentando a produção e rendimento de 1,3-porpanodiol. Em 2015, MORANDI et al. também verificaram que bactérias do gênero *Clostridium* spp possuem essa capacidade de fermentar ácido lático.

5.6 EMPREGO DA BATELADA ALIMENTADA EM BIORREATOR AGITADO MECANICAMENTE

A estratégia de batelada alimentada intermitentemente (1 pulso de glicerol), foi empregada visando o aumento produção de 1,3-propanodiol, por *C. beijerinckii* DSM 791. Nesta investigação as condições experimentais foram: meio otimizado com 30 g/L de glicerol, 10% (v/v) de inóculo, controle de pH entre 5,0 e 6,0, 37°C e 100 rpm. A figura 5.19 mostra o perfil cinético da produção propanodiólica a partir de glicerol em batelada alimentada.

Na batelada inicial houve o consumo integral do glicerol em 24 horas do processo, foram produzidos, aproximadamente, 18 g/L de 1,3-propanodiol, 3,5 g/L de ácido butírico e 2,5 g/L de ácido acético. Ao adicionar o pulso de 15 g/L glicerol a biomassa bacteriana não foi capaz de consumir o glicerol alimentado e ainda houve uma queda na concentração celular. A principal possibilidade é a inibição da fermentação pelo(s) produto(s).

POWALOWSKA (2015), relata que os principais fatores responsáveis pela inibição da fermentação propanodiólica estão relacionados ao acúmulo de

metabólitos tóxicos à célula, principalmente do produto principal e da presença de ácidos orgânicos. No entanto, as células podem apresentar diferentes respostas à presença dessas moléculas inibidoras do processo fermentativo.

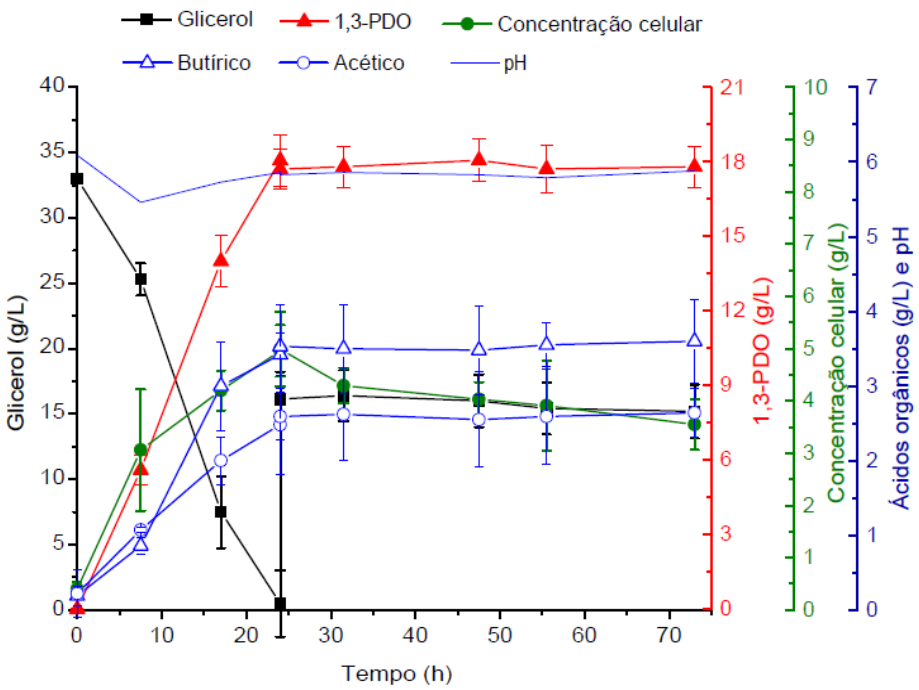

Figura 5.19: Cinética de produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) por **batelada alimentada** em biorreator agitado mecanicamente com C. beijerinckii DSM 791, em meio otimizado contendo glicerol como substrato, 30,0 g/L de milhocina e pH controlado entre 5,5 e 6,0.

De acordo com CELIŃSKA (2010) e WARNECKE & GILL (2005) o acúmulo de ácidos no meio podem limitar a síntese de 1,3-propanodiol. De acordo com esses autores, essa inibição se dá devido a capacidade dos ácidos de se difundir por meio das membranas celulares, quando dissociado, em oposição à passagem restrita de prótons e ânions dissociados.

Já os ácidos orgânicos não dissociados, de acordo com ROE et al. (2002), se difundem para o citoplasma, onde irão se dissociar e perturbar/alterar o pH interno da célula. O aumento resultante na acidez interna pode afetar a integridade das moléculas que fazem parte do "*pool*" citoplasmático, particularmente causando a desnaturação de enzimas essenciais ao metabolismo celular.

5.7 EFEITO DA ADIÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL NO MEIO DE FERMENTAÇÃO

A inibição do consumo de glicerol pela presença do principal produto da fermentação, o 1,3-propanodiol, foi investigada em *C. beijerinckii* DSM 791, em experimentos realizados em frascos. Utilizou-se o meio otimizado com 30 g/L de milhocina, 30 g/L de glicerol e 20 g/L de $CaCO_3$, adicionado de 1,3-propanodiol no início da fermentação, em concentrações de 0,0 g/L a 50,0 g/L. As condições experimentais foram: 37°C e 80 rpm, por 72 horas.

Os resultados mostraram que o aumento da concentração inicial de 1,3-propanodiol diminuiu o crescimento celular em até 4,5 vezes; a produção de 1,3-propanodiol foi reduzida em 11 vezes e a redução percentual de substrato diminuiu de 57,4% para apenas 3,4% (Tabela 5.17).

Tabela 5.17: Avaliação da inibição do consumo de glicerol por *C. beijerinckii* DSM 791, em frascos, utilizando 30,0 g/L de glicerol, meio otimizado com milhocina), durante 72 h, a 37°C e 80 rpm.

1,3-PDO adicionado (g/L)	RPS (%)	1,3-PDO produzido (g/L)	Concentração celular (g/L)
0,00	57,4 ± 0,7	9,62 ± 0,9	3,25 ± 0,1
10,00	35,4 ± 1,5	6,44 ± 0,8	2,68 ± 0,1
20,00	31,6 ± 0,6	4,32 ± 0,2	1,82 ± 0,3
30,00	20,7 ± 0,5	2,14 ± 0,2	1,31 ± 0,2
40,00	8,0 ± 1,4	2,28 ± 0,8	0,99 ± 0,2
50,00	3,4 ± 1,1	0,87 ± 0,2	0,73 ± 0,2

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, RPS: redução percentual de substrato.

De acordo com CHATZIFRAGKOU et al. (2011), a tolerância máxima de *C. butyricum* VPI 1718 ao 1,3-propanodiol, em ensaios de fermentação em batelada simples e contínua, foi de 70,0 g/L. Já os resultados obtidos neste trabalho mostraram que concentrações de 1,3-propanodiol a partir de 10,0 g/L foram fortemente inibitórias para *C. beijerinckii* DSM 791.

KLEMM (1998) e CELIŃSKA (2010) relatam que a inibição da fermentação por 1,3-propanodiol, possivelmente se dá devido à alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, efeito semelhante ao provocado pelo etanol.

A tolerância ao produto da fermentação varia em função da linhagem bacteriana e das condições de cultivo, bem como da presença de solutos compatíveis, que atuam fundamentalmente como osmoprotetores, mas que também desempenham um papel importante na manutenção da atividade e da estabilidade de enzimas em condições de estresse ambiental extremo (WELSH, 2000).

Alguns aminoácidos, como prolina, glutamato e glutamina, assim como polióis já foram reportados como sendo solutos compatíveis. Sua ação específica ainda é desconhecida, mas acredita-se que essas moléculas são excluídas preferencialmente em condições de elevada osmoloridade, a fim de a célula reter sua água vital, que se encontra, associada às estruturas supramoleculares, assegurando assim a sua integridade e, consequentemente, a viabilidade celular (VIANA, FILHO & SILVA, 2005; PEREIRA, BON & FERRARA, 2008).

Há que se levar em conta também que a tolerância ao produto pode ser maior do que aquela que se revelou neste ensaio, no qual o 1,3-propanodiol foi adicionado ao meio de uma única vez no início do cultivo. Esta situação é diferente daquela em que o produto é acumulado paulatinamente no meio, à medida que vai sendo produzido.

Em outras palavras, o efeito de inibição provocado pelas altas concentrações de produto adicionado de uma única vez ao meio de cultivo é mais severo do que aquele em que o produto se acumula no meio externo, como resultado da sua síntese pelas células. Em contrapartida, o 1,3-propanodiol produzido durante a fermentação, ou seja, aquele intercelular, pode ser mais prejudicial às células do que o 1,3-propanodiol adicionado (exógeno).

5.8 EMPREGO DA BATELADA SEQUENCIAL EM BIORREATOR DE LEITO FIBROSO (FBB)

Para se contornar os efeitos de inibição causada pelo 1,3-propanodiol e pelos ácidos orgânicos, investigou-se a aplicação de batelada repetida ou sequencial, realizada com células imobilizadas em FBB (Figura 4.3 e Figura 5.20), conforme descrito no item 4.12 deste trabalho, com a concentração de glicerol inicial de aproximadamente 20 g/L em cada batelada, para se evitar uma possível inibição por glicerol.

Figura 5.20: Sistema utilizado no ensaio de batelada sequencial, formado pelo biorreator mecanicamente agitado (100 rpm) conectado ao biorreator onde as células ficam imobilizadas (FBB), com controle de temperatura (37°C) e pH (entre 5,0 e 6,0).

Neste sistema de fermentação em batelada sequencial as células de *C. beijerinckii* DSM 791 foram imobilizadas em FBB, utilizou-se o meio otimizado com milhocina (30,0 g/L) e o pH foi controlado entre 5,5 e 6,0 por meio da adição de NH_4OH. Uma das principais vantagens do sistema de FBB, é a reutilização das células de uma batelada para outra.

A figura 5.21 mostra a cinética de fermentação para as oito bateladas sequenciais realizadas consecutivamente, totalizando 170 horas de operação. Neste ensaio, assim que todo o glicerol foi consumido, aproximadamente 80% do meio de fermentação foram substituídos por meio novo para iniciar a próxima batelada, resultando uma concentração de 1,3-propanodiol de, aproximadamente, 5 g/L início de cada batelada.

Cerca de 11 g/L de 1,3-propanodiol, 3,6 g/L de ácido butírico e 1,7 g/L de ácido acético foram produzidos a partir de 20 g/L de glicerol adicionado em cada batelada. O sistema se manteve-se estável, resultando em uma produção consistente de 1,3-propanodiol e um rendimento médio em produto de 0,54 g/g

(Figura 5.22). Os resultados indicam que as células bacterianas imobilizadas em FBB, podem ser estavelmente mantidas e utilizadas para fermentação propanodiólica por sistema de bateladas sequenciais.

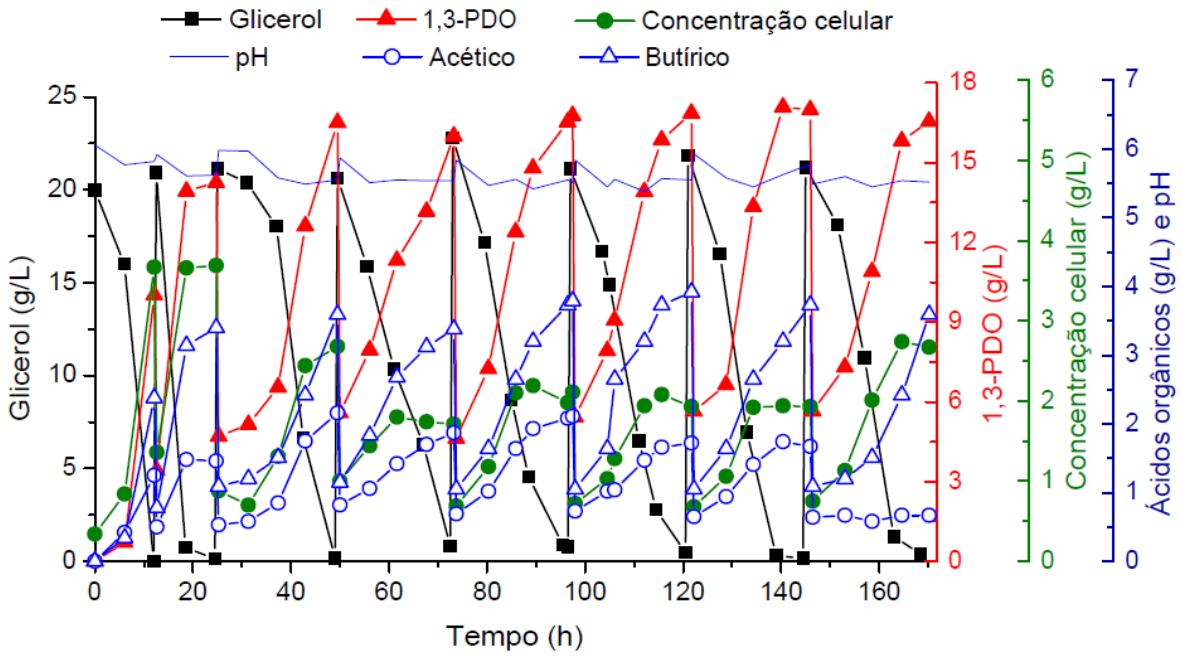

Figura 5.21: Perfil do sistema de bateladas sequenciais com células de *C. beijerinckii* DSM 791 imobilizadas em FBB, utilizando meio otimizado com 20 g/L de glicerol e 30 g/L de milhocina, a 37°C e pH controlado entre 5,5 e 6,0.

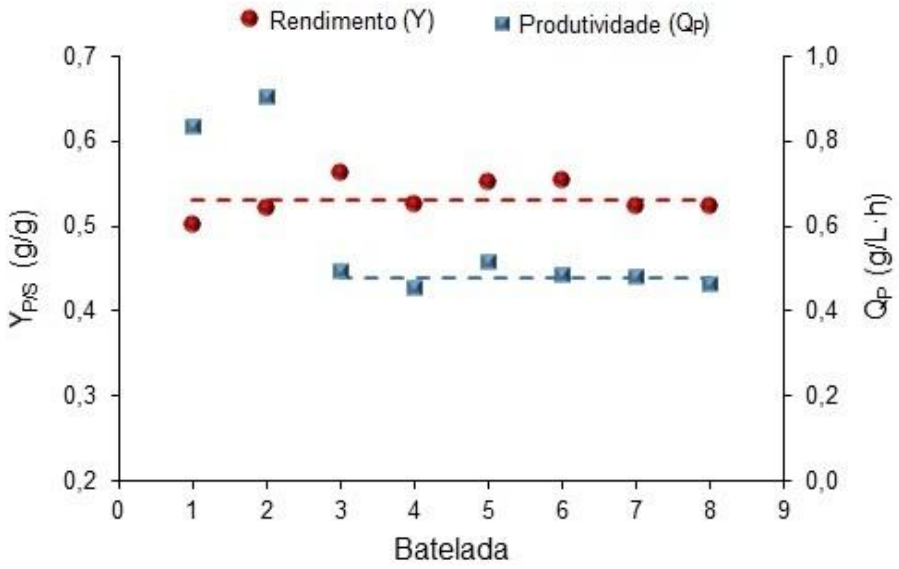

Figura 5.22: Rendimento e produtividade em cada ciclo da batelada sequencial, em biorreator FBB com *C. beijerinckii* DSM 791.

A produtividade volumétrica média para as duas primeiras bateladas foi de 0,87 g/L.h^{-1}, enquanto que nos últimos seis lotes foi de 0,48 g/L.h^{-1} (Figura 5.22). A produção de 1,3-propanodiol se deu, não somente com as células imobilizadas, mas também com aquelas que cresceram livremente no meio de fermentação, consumindo o substrato e acelerando a síntese do produto.

Ressalta-se que, em se pese o caráter tóxico do produto, como discutido anteriormente, as células possuem uma extraordinária capacidade de aclimatação, capazes de reproduzir o seu desempenho mesmo em presença da substância tóxica/inibitória. Portanto, possivelmente, após essas duas bateladas iniciais, as células tiveram a sua fisiologia adjustada e passaram a consumir o glicerol mais lentamente (24 horas), mantendo-se estáveis nas bateladas subsequentes.

O sistema FBB exibiu uma elevada estabilidade do processo, o que é um requisito fundamental para aplicações industriais. Estes resultados são comparáveis aos obtidos por CHATZIFRAGKOU et al. (2014), que relatam a utilização de batelada sequencial com a linhagem de *C. butyricum* VPI 1718 como agente do processo fermentativo e glicerol como única fonte de carbono. Os autores reportaram a produção de cerca de 12,0 g/L de 1,3-propanodiol em cada ciclo, com rendimento de 0,52 g/g em relação ao glicerol consumido.

5.9 ENGENHARIA METABÓLICA DE *C. beijerinckii* DSM 791 PARA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL

Uma vez já empregadas ferramentas de Estatística e de Engenharia Bioquímica, para melhoramento da produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol por *C. beijerinkii* DSM 791, verificou-se que o melhoramento genético se fazia necessário para maximizar o fluxo de carbono do glicerol para a síntese de 1,3-propanodiol, já que a produção deste diol se dá por um processo heterofermentativo.

Sendo assim, visando aumentar o rendimento e a produtividade volumétrica, vislumbrou-se a construção de uma linhagem recombinante com maior atividade fermentativa para a produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol por meio da inserção de técnicas da Biologia Molecular.

5.9.1 Obtenção da Recombinante - *C. beijerinckii* A1

A seleção das enzimas manipuladas neste trabalho foi realizada com base no metabolismo anaeróbio de glicerol a 1,3-propanodiol. Esta biossíntese envolve quatro enzimas, as quais são expressas pelos respectivos genes apresentados entre parênteses: glicerol desidrogenase - GDH (*gldA*) e dihidroxiacetona quinase - DHAK (*dhaK*) ambas da via oxidativa e glicerol desidratase - GDHt (*dhaB*) e 1,3-propanodiol desidrogenase - PDDH (*dhaT*) da via redutiva (Figura 2.8). Estas enzimas são expressas coordenadamente e a sua expressão é induzida pela dihidroxiacetona (DHA) ou por glicerol (SUN et al., 2003).

Na figura 5.23 comparam-se os resultados preditos, em termos de massa molecular, com os obtidos em gel de agarose a partir dos fragmentos de DNA removidos do plasmídeo construído neste trabalho, para o aumento das atividades de GDH e DHAK, empregando as enzimas de restrição EcoRV e SacII. As bandas de cada fragmento no gel estão de acordo com as previstas o que significa que o plasmídeo foi construído corretamente. Portanto, foi possível seguir para a próxima etapa, na qual células de *C. beijerinckii* DSM 791 foram transformadas com o plasmídeo, utilizando o método de conjugação, conforme descrito por YU et al. (2015).

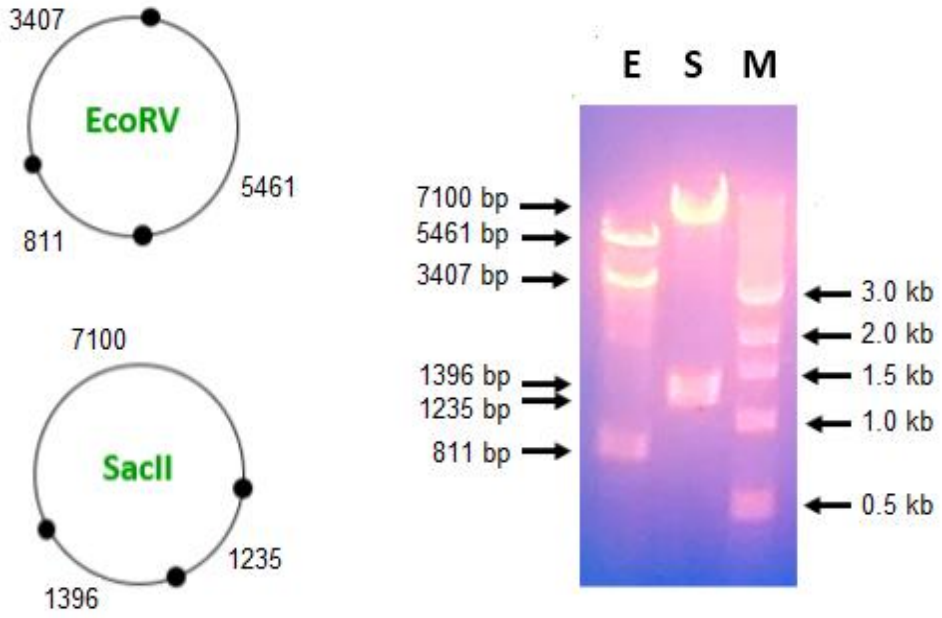

Figura 5.23: Gel da digestão enzimática para verificação da construção do plamídeo por PCR. **E**: EcoRV, **S**: SacII e **M**: marcador.

Na figura 5.24 é possível visualizar a análise dos produtos da amplificação por PCR, empregando a enzima de restrição SacII, confirmando que o plasmídeo foi introduzido com sucesso em *C. beijerinckii* DSM 791.

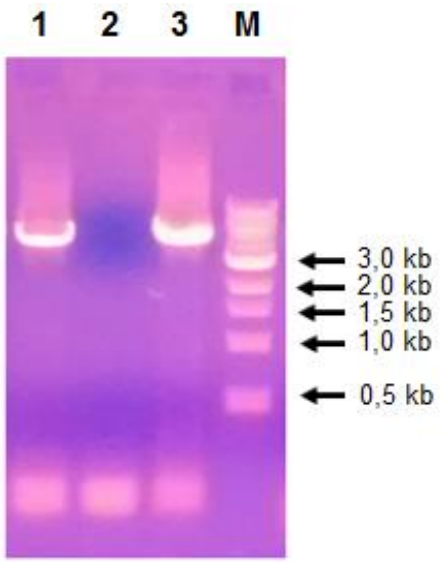

Figura 5.24: Gel da PCR para verificação da inserção plasmidial. **1**: *C. beijerinckii* A1, **2**: *C. beijerinckii* DSM 791 (controle negativo), **3**: plasmídeo (pMTL82151-gldA-dhaKLM) e **M**: Marcador.

O papel fisiológico da via que leva a 1,3-propanodiol é regenerar os equivalentes redutores (NADH), que são liberados a partir da formação de dihidroxiacetona (DHA) e da oxidação do fosfato de dihidroxiacetona (DHAP), bem como da biossíntese. O metabolismo subsequente do DHAP é essencial para fornecer ATP para o crescimento celular e para a fosforilação da dihidroxiacetona. Além disso, proporciona equivalentes redutores para a via que leva à formação de 1,3-propanodiol (ZENG, BIEBL & DECKWER, 1997). Portanto, o rendimento de 1,3-propanodiol depende da combinação e estequiometria das vias oxidativa e redutiva.

TANG et al. (2009) aumentaram a atividade das enzimas da via redutiva (*dhaB* e *yqhD*) e obtiveram produção, rendimento e produtividade mais elevadas do que com bactérias selvagens produtoras de 1,3-propanodiol, indicando assim a robustez das enzimas GDH e DHAK de *E. coli* para consumo de glicerol.

Para melhorar a produção propanodiólica, várias estratégias de engenharia metabólica foram estudadas por outros autores com *K. pneumoniae*. Dentre elas podemos citar a manipulação de genes das vias oxidativa e/ou redutiva além da inativação de genes responsáveis pela formação de subprodutos (CELIŃSKA 2010;

MAERVOET et al. 2011). Em geral, o aumento da atividade do gene *dhaB* resulta no acúmulo de 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA) que é tóxico à célula (ZHENG et al., 2006), enquanto que o aumento da atividade do gene *dhaT* não melhorou a produção de 1,3-propanodiol, provavelmente devido à falta de NADH necessário para a reação catalisada pela PDDH (HAO et al., 2008). Já o aumento da atividade simultânea dos genes *dhaT* e *gldA* aumentou a proporção de $NADH/NAD^+$, conduzindo à elevação na produção de 1,3-propanodiol em batelada simples, mas não em batelada alimentada em ensaios conduzidos por CHEN, LIU & LIU (2009b).

ZHAO et al. (2009) também relataram que o aumento da atividade da PDDH não aumentou a produção de 1,3-propanodiol e levou a um crescimento celular mais lento. Portanto, no presente trabalho as enzimas GDH e DHAK da via oxidativa, que geram o NADH necessário para a via redutiva, foram selecionadas como alvos para a aplicação das ferramentas de engenharia metabólica, visando o aumento da atividade enzimática.

5.9.2 Análise da Expressão do Gene por Transcrição Reversa (RT)-PCR

Na figura 5.25 é apresentado o resultado da RT-PCR que confirma a expressão dos genes da glicerol desidrogenase (*gldA*) e da dihidroxiacetona quinase (*dhaKLM*), em *C. beijerinckii* A1 obtida neste trabalho.

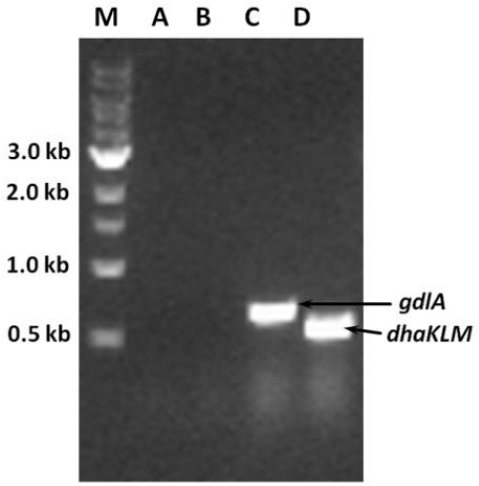

Figura 5.25: Gel da RT-PCR para confirmação da expressão dos genes glicerol desidrogenase (*gldA*) e dihidroxiacetona quinase (*dhaKLM*) na recombinante. **M**: Marcador, **A** e **B**: *C. beijerinckii* DSM 791 (controle negativo), **C** e **D**: *C. beijerinckii* A1.

A confirmação da expressão dos genes é observada devido a ausência de qualquer iniciador no material (RNA) extraído da linhagem selvagem de *C. beijerinckii* DSM 791 (colunas A e B) e a presença dos pares de iniciadores *gldA*-FOR/*gldA*-rev (coluna C) e *dhak*-FOR/*dhak*-rev (coluna D) no RNA extraído de *C. beijerinckii* A1, com os tamanhos esperados de 662 pb e 560 pb, respectivamente.

5.9.3 Determinação da Atividade Enzimática da GDH

Em comparação com *C. beijerinckii* DSM 791, a recombinante apresentou atividade enzimática para GDH três vezes maior (0,35 U/mg vs. 0,12 U/mg) e cresceu muito mais rápido em glicerol, com uma taxa de crescimento específica mais elevada na fase de crescimento exponencial, de 0,40 h^{-1} (0,20 h^{-1} para o tipo selvagem) (Figura 5.26).

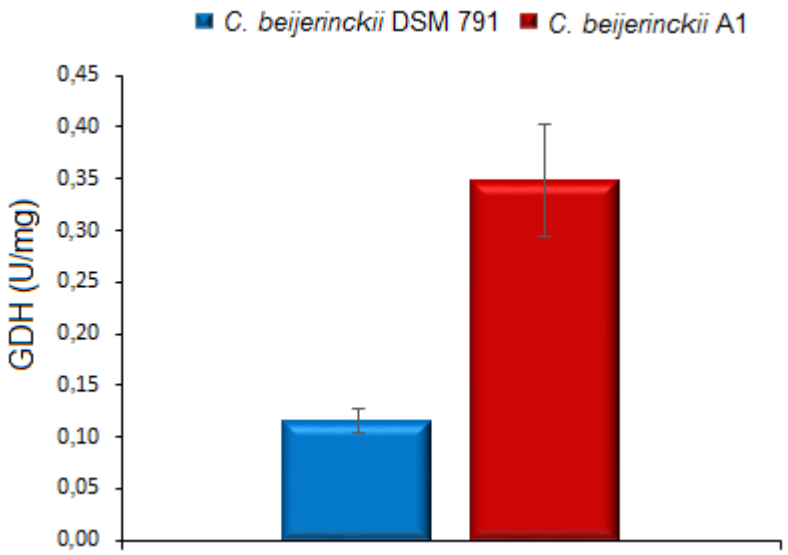

Figura 5.26: Comparação da atividade enzimática da GDH entre *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1.

Aparentemente, o aumento da atividade da GDH em *C. beijerinckii* A1 permitiu uma oxidação mais rápida do glicerol. A velocidade na via oxidativa do metabolismo do glicerol, talvez seja a etapa limitante para a geração de NADH e ATP, necessários ao crescimento celular. Consequentemente, o aumento da atividade da GDH, resultou em um crescimento e fermentação mais rápidos. Por outro lado, GUTKNECHT et al. (2001), relatam que aumento da taxa de crescimento celular da

recombinante pode ser parcialmente atribuído à expressão da DHAK, que utiliza uma fosfoproteína em vez de ATP (assim mais ATP estaria disponível para o crescimento celular), e não apenas pelo aumento da atividade da GDH.

5.9.4 Verificação da Estabilidade do Plasmídeo

Verificou-se a estabilidade do plasmídeo por comparação dos resultados obtidos pela linhagem recombinante com e sem a adição do antibiótico (tianfenicol) ao meio de fermentação. Os experimentos foram conduzidos em frascos, utilizando o meio otimizado com 30,0 g/L de milhocina e 30,0 g/L de glicerol, agitados a 80 rpm e 37° durante 72 horas (Tabela 5.18).

Tabela 5.18: Avaliação da estabilidade do plasmídeo em fermentações em frascos, com *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1, a 37°C, 80 rpm, utilizando o meio otimizado com 30,0 g/L de glicerol, 30 g/L de milhocina e 20g/L de $CaCO_3$, durante 72 h.

Linhagem	RPS (%)	1,3-PDO (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)
C. beijerinckii DSM 791 (controle)	56,1 ± 0,7	9,43 ± 0,9	0,56 ± 0,01
C. beijerinckii A1 (sem tianfenicol)	69,6 ± 0,9	12,46 ± 0,3	0,54 ± 0,01
C. beijerinckii A1 (com tianfenicol)	69,9 ± 1,4	12,25 ± 0,7	0,53 ± 0,02

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, RPS: redução percentual de substrato e $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato.

Houve o aumento da produção de 1,3-propanodiol em frascos, ao comparar os resultados entre as linhagens (*C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1). As fermentações com *C. beijerinckii* A1, na presença e ausência de antibiótico, apresentaram os mesmos resultados, indicando que o plasmídeo transformado permaneceu estável na recombinante. Isto significa que a adição do antibiótico é dispensável na fermermentação propanodiólica, *C. beijerinckii* A1. Caso ocorresse a perda ou expulsão do plasmídeo, os resultados da fermentação com *C. beijerinckii* A1, sem antibiótico, seriam iguais aos obtidos com *C. beijerinckii* DSM 791.

5.9.5 Fermentações com *C. beijerinckii* A1

Em todas as fermentações com *C. beijerinckii* A1 utilizou-se o meio otimizado, com 30 g/L de milhocina como fonte de nitrogênio, 37°C e pH controlado entre 5,5 e 6,0. As figuras 5.27 e 5.28 apresentam a cinética de fermentação propanodiólica a partir de glicerol, por *C. beijerinckii* A1, em batelada simples e batelada alimentada, respectivamente. Estes experimentos foram feitos em biorreator mecanicamente agitado (100 rpm) e adicionando-se 10% (v/v) de inóculo.

Em comparação com a linhagem selvagem, a recombinante cresceu mais e rapidamente, além de produzir mais 1,3-propanodiol em períodos mais curtos de fermentação, resultando numa produtividade volumétrica mais elevada de, aproximadamente, 1,0 g/L.h^{-1} em glicerol (0,72 g/L.h^{-1}, com a linhagem selvagem, figura 5.18). Outra constatação interessante com relação a linhagem recombinante foi que esta consumiu o glicerol alimentado, o que não aconteceu com a linhagem selvagem (Figura 5.19).

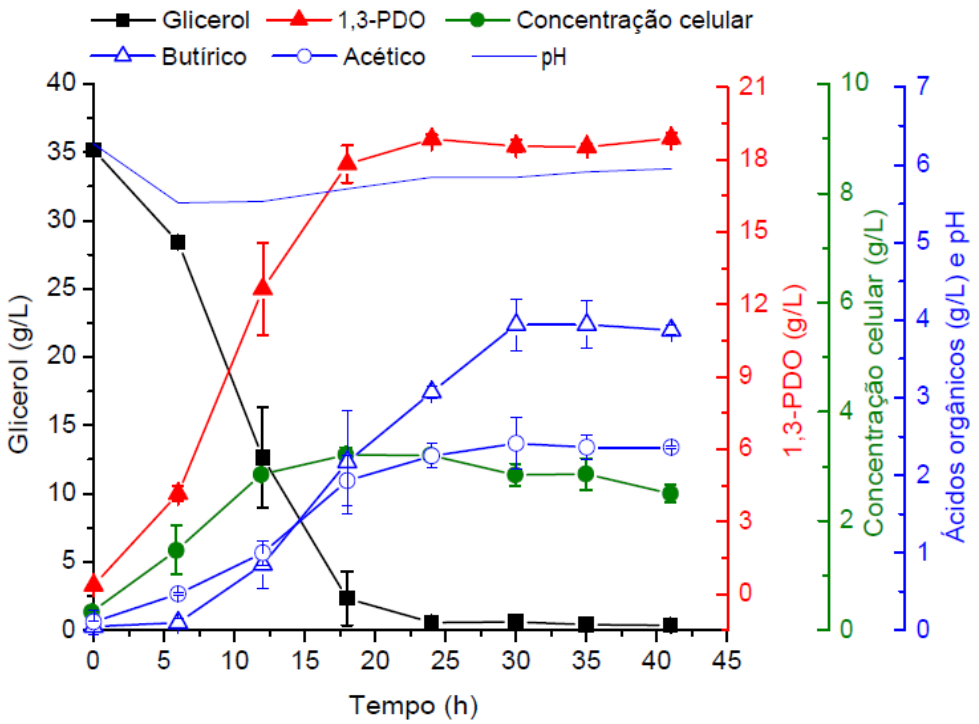

Figura 5.27: Cinética de produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) em biorreator mecanicamente agitado, em **batelada simples**, com *C. beijerinckii* A1, meio otimizado com 30,0 g/L de glicerol e 30 g/L de milhocina e pH controlado entre 5,5 e 6,0.

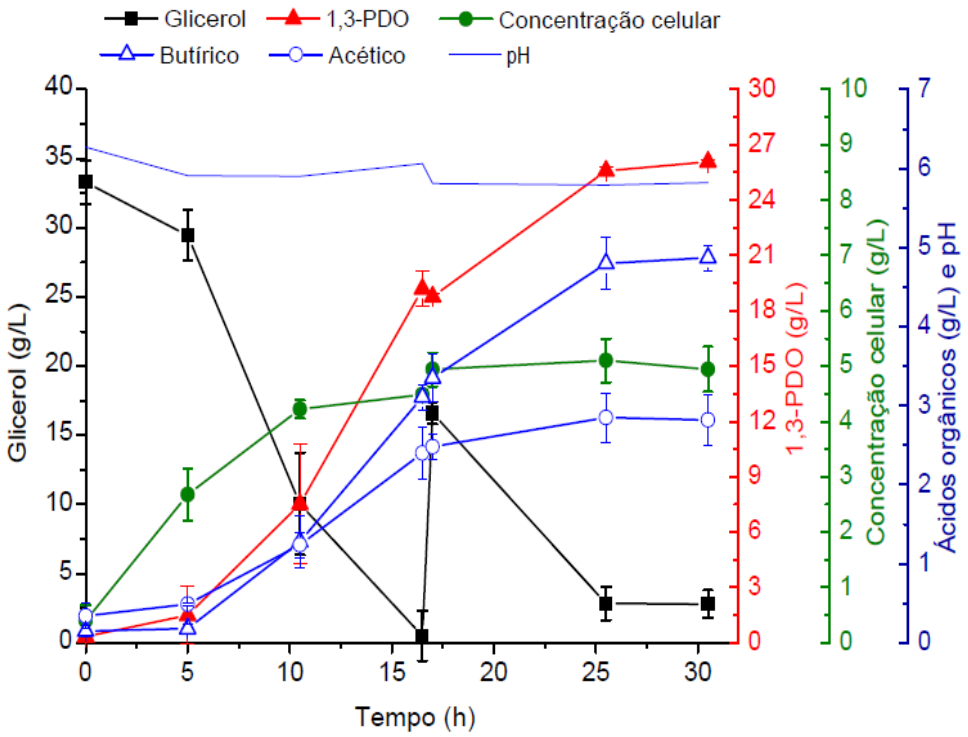

Figura 5.28: Cinética de produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) em biorreator mecanicamente agitado, em **batelada alimentada**, com *C. beijerinckii* A1, meio otimizado com 30 g/L de milhocina e pH controlado entre 5,5 e 6,0.

Um rendimento de 0,55 g/g e uma concentração mais elevada de 1,3-propanodiol, de 26,0 g/L, foram obtidos em batelada alimentada com a linhagem recombinante. Com a linhagem selvagem a máxima produção de 1,3-propanodiol foi inferior a 20 g/L, sugerindo que, possivelmente, a linhagem recombinante tem uma maior tolerância ao 1,3-propanodiol, ao metabólito intermediário tóxico (3-HPA) e aos principais ácidos orgânicos formados (butírico e acético). Porém, estudos mais aprofundados são necessários para confirmar e elucidar essas questões de inibição.

Como *C. beijerinckii* DSM 791 já possui os genes *gldA* e *dhaK* para expressar as enzimas GDH e DHAK, o aumento da atividade desses genes, pela inserção do plasmídeo, permitiu um maior crescimento celular e o aumento da produtividade. Aparentemente, o aumento do fluxo ou taxa de reação da via oxidativa, dada pelo aumento das atividades das enzimas GDA e DHAK, também aumentou a taxa de fluxo ou de reação da via redutiva, de modo que o equilíbrio redox ou a proporção $NADH/NAD^+$ nas células foi mantido. A oxidação de glicerol gera NADH que tem de ser oxidado a NAD^+, a fim de manter o equilíbrio redox, e a redução do glicerol a 1,3-propanodiol parece ser a forma preferida para obtenção desse efeito.

A maior produção de 1,3-propanodiol nesse estudo também pode ser atribuída à regulação de genes com as expressões heterólogas de *gldA* e *dhaKLM*. A quantidade de 1,3-propanodiol obtida em batelada alimentada neste trabalho (26 g/L) foi maior do que os valores reportados por GUNGORMUSLER, GONEN & AZBAR (2011b), de 21 g/L, em fermentação propanodiólica a partir de glicerol, também conduzida por batelada alimentada com *C. beijerinckii* NRRL B-593.

O rendimento em 1,3-propanodiol a partir de glicerol e as quantidades de ácidos acético e butírico produzidas por *C. beijerinckii* A1 não foram diferentes daquelas produzidas por *C. beijerinckii* DSM 791 (0,55 g/g), indicando que as distribuições do fluxo metabólico não foram alteradas com o aumento da atividade das enzimas GDH e DHAK. OTTE et al. (2009) usaram a técnica de *genome shuffling* (mistura de genoma) em *C. diolis* DSM 15410, por de mutagênese química, e conseguiram selecionar uma linhagem capaz de converter glicerol em 1,3-propanodiol com rendimento de 0,53 g/g, em batelada alimentada.

O rendimento de 1,3-propanodiol poderia ser melhorado por exclusão dos genes das vias de formação de ácidos (*ack* e *buk*) se essas vias não fossem as responsáveis pela geração de ATP e para equilibrar o potencial redox ($NADH/NAD^+$), ou seja, o bloqueio dos genes das vias formadoras de ácidos é prejudicial para a sobrevivência das células bacterianas.

Em outras linhagens de *C. beijerinckii* produtoras de acetona, butanol e etanol, a produção de acetato e butirato bem como de seus correspondentes acetil-CoA e butiril-CoA geram ATP, mas não consomem NADH e, portanto, a produção desses metabólitos não é afetada pelo aumento da disponibilidade de NADH na via oxidativa do glicerol.

A conversão de acetil-CoA em etanol ou butiril-CoA e, em seguida, para o butanol, não foi observada na linhagem utilizada neste trabalho, provavelmente, porque os genes *adhE* e *bdhB* foram reprimidos ou inibidos pelo glicerol. No entanto, esse desvio preferencial para a síntese de 1,3-propanodiol não se observa em outras linhagens da mesma espécie. Isso se deve, aparentemente, aos baixos níveis de expressão das enzimas GDHt e PDDH, dependente da presença de glicose. Porém, quando glicerol é utilizado, essas linhagens também podem passar a produzir o 1,3 propanodiol.

MAERVOET et al. (2014) estudaram a conversão de glicerol em 1,3-propanodiol por *Citrobacter werkmanii* DSM17579 e concluiram que quando a

atividade da GDH é eliminada há o bloqueio da via oxidativa do metabolismo do glicerol, ou seja, o caminho para o crescimento e manutenção celular a partir do glicerol fica desativado. Mesmo após 50 horas de inoculação, nenhum crescimento foi detectado com a linhagem recombinante. Esta linhagem só foi capaz de crescer na presença de uma outra fonte de carbono, neste caso, a glicose.

SEO et al. (2009) obtiveram duas linhagens recombinantes de *K. pneumoniae* derivadas de ATCC 200721. Em uma das recombinantes, os genes *gldA* e *dhaK* foram eliminados, na outra o fator de transcrição, responsável por controlar a transcrição desses genes, foi inativado. Estas mutações resultaram em reduzidas taxas de crescimento quando as linhagens foram cultivadas em meio contendo glicerol como única fonte de carbono.

Teoricamente, o bloqueio da via oxidativa limitaria a utilização de carbono para produção de ácidos e assim haveria melhora no rendimento de 1,3-propanodiol, o que não foi verificado por SEO et al. (2009). Além disso, pela eliminação de subprodutos tóxicos (ácidos orgânicos), a quantidade do produto de interesse poderia ser aumentada. No entanto, essa variedade de subprodutos é necessária para o ajuste fino do balanço redox intracelular (CELIŃSKA, 2010; MAERVOET et al., 2012a).

GONZÁLEZ-PAJUELO et al. (2005) obtiveram rendimento de 1,3-propanodiol de 0,54 g/g a partir de uma recombinante "não dependente de vitamina B12", denominada *C. acetobutylicum* DG1(pSPD5). Para isso o gene responsável pela expressão da enzima glicerol desidratase (GDHt) foi clonado a partir de *C. butyricum* VPI 3266 e inserido em *C. acetobutylicum* para gerar a recombinante.

GÜNZEL, YONSEL & DECKWER (1991), utilizando *C. butyricum* DSM 5431 obtiveram 0,50 g/g de rendimento a partir de 20 g/L de glicerol e ao se aumentar a concentração inicial de substrato para 50 g/L, a capacidade de converter glicerol em 1,3-propanodiol se manteve (rendimento de 0,50 g/g), quando a batelada alimentada foi utilizada como forma de operação do bioprocesso. A partir de 50,0 g/L de glicerol, HIMMI, BORIES & BARBIRATO, (1999), chegaram a um rendimento em 1,3-propanodiol de 0,54 g/g com *C. butyricum* CNCM 1211, em 24 h de fermentação.

O aumento da atividade da enzima PDDH (*dhaT*), que catalisa a reação de 3-HPA em 1,3-propanodiol utilizando tanto o NADH, quanto o NADPH, pode ser outra estratégia eficaz para aumentar a produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol, tal como demonstrado com *K. pneumonia*e por ZHU et al. (2009). Além desse caso,

uma linhagem modificada de *C. acetobutylicum*, com a superexpressão dos genes *dhaB* (GDHt) e *dhaT* (PDDH) de *C. butyricum* produziu mais 1,3-propanodiol do que as linhagens selvagens de *C. butyricum* e do que linhagens recombinantes produto-tolerantes (GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2006).

5.10 PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICERINA

As figuras 5.29 e 5.30 apresentam os resultados das fermentações em batelada simples, usando glicerina como fonte de carbono, proveniente da produção de biodiesel, com a linhagem de *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1, respectivamente. Cerca de 75,0 g/L de glicerina foram adicionadas ao meio otimizado com milhocina (30,0 g/L), utilizada como fonte de nitrogênio, levando a uma concentração inicial de glicerol em torno de 30,0 g/L.

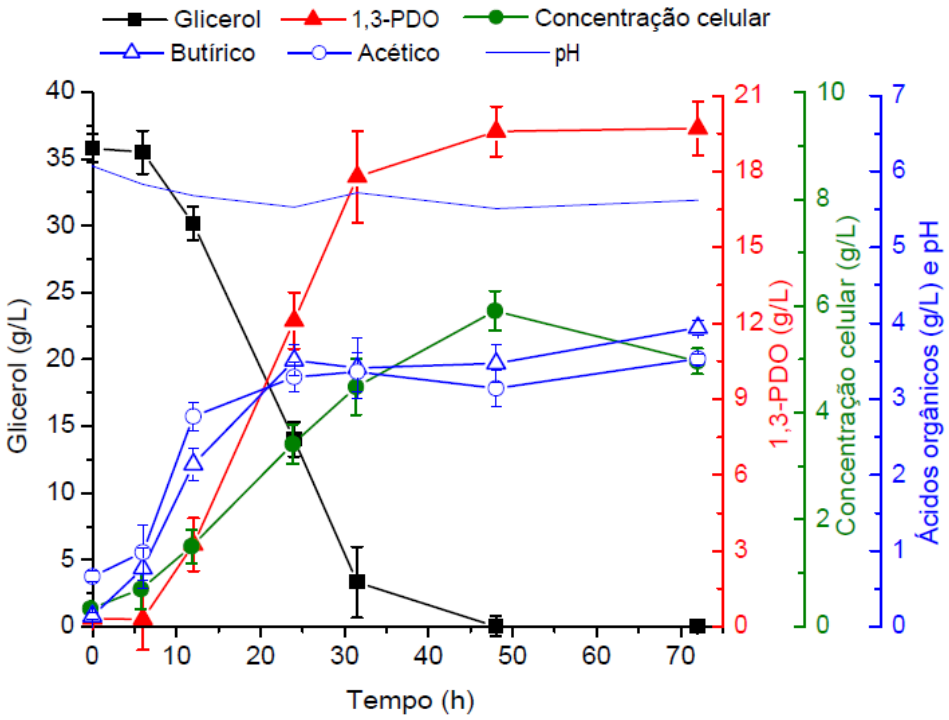

Figura 5.29: Perfil ciinético da fermentação por ***C. beijerinckii* DSM 791** utilizando biorreator mecanicamente agitado, em meio otimizado com 75 g/L de glicerina e 30 g/L de glicerol, 37°C, 100 rpm e pH controlado entre 5,5 e 6,0.

De acordo com o perfil cinético obtido com *C. beijerinckii* DSM 791 (Figura 5.29), com glicerina como fonte de carbono, a concentração de 1,3-propanodiol alcançou o valor de 20,0 g/L e produtividade volumétrica de 0,56 g/L.h^{-1}. A linhagem

C. beijerinckii A1 produziu aproximadamente a mesma quantidade de 1,3-propanodiol a partir de glicerina (Figura 5.30), no entanto, mais rapidamente, aumentando a produtividade do processo para 0,71 g/L.h^{-1}. O rendimento em 1,3-propanodiol foi de 0,55 g/g nas fermentações com glicerina (92% do máximo obtenível pela estequiometria), semelhante ao obtido nas fermentações com glicerol. Este é um achado muito interessante, na medida em que a glicerina pode ser utilizada sem necessidade de pré-tratamento.

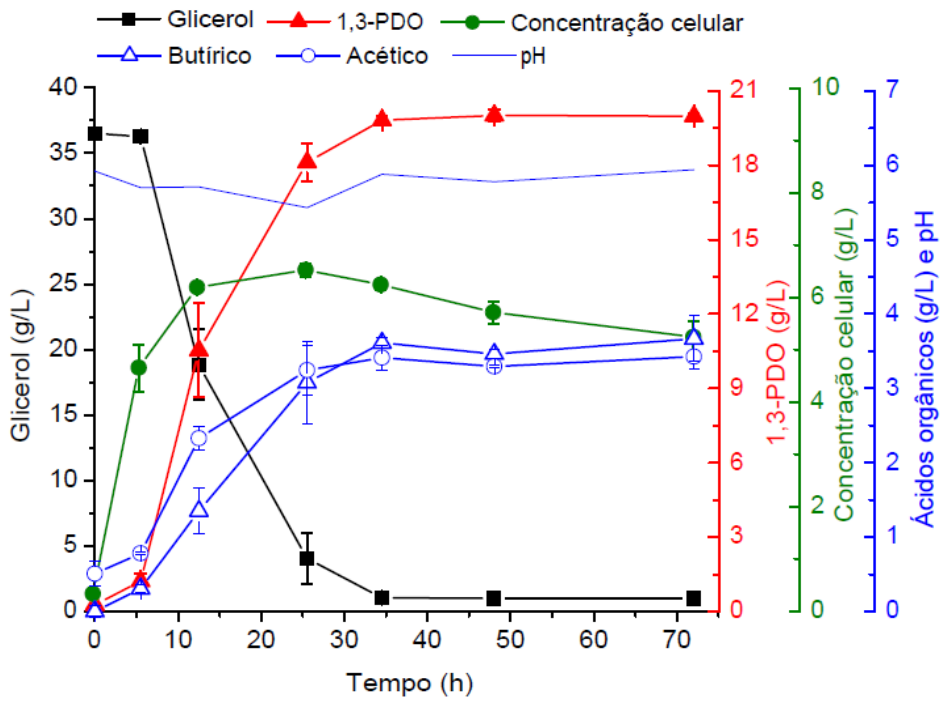

Figura 5.30: Perfil ciinético da fermentação por ***C. beijerinckii*** **A1** utilizando biorreator mecanicamente agitado, em meio otimizado com 75 g/L de glicerina e 30 g/L de glicerol, 37°C, 100 rpm e pH controlado entre 5,5 e 6,0.

Apesar das concentrações finais de 1,3-propanodiol serem aproximadamente as mesmas, ao comparar estes resultados (Figuras 5.29 e 5.30), com aqueles das fermentações com glicerol (Figura 5.18 e 5.27), verificamos que a taxa de produção foi menor utilizando glicerina: 0,72 g/L.h^{-1} com glicerol e 0,56 g/L.h^{-1} com glicerina para a linhagem selvagem, e 0,99 g/L.h^{-1} com glicerol e 0,71 g/L.h^{-1} com glicerina para a linhagem recombinante.

Segundo CHATZIFRAGKOU et al. (2010), essa redução da produtividade, comparando-se fermentações utilizando glicerol e glicerina, é atribuída à inibição

pela presença de óleos residuais e sais, principalmente cloreto de sódio, na glicerina proveniente da produção do biodiesel.

Na figura 5.31 são comparadas as taxas específicas de crescimento obtidas nas fermentações com *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1. A recombinante cresceu mais rapidamente, tanto em glicerol como em glicerina, exibindo taxas específicas de crescimento mais elevadas (0,25 h^{-1} a 0,40 h^{-1}) quando comparadas àquelas obtidas com a linhagem selvagem (0,13 h^{-1} a 0,20 h^{-1}). Este resultado corrobora com o estudo de SEO et al. (2010), no qual recombinantes de *K. pneumoniae* tiveram suas taxas de crescimento reduzidas com a inativação da GDH e DHAK.

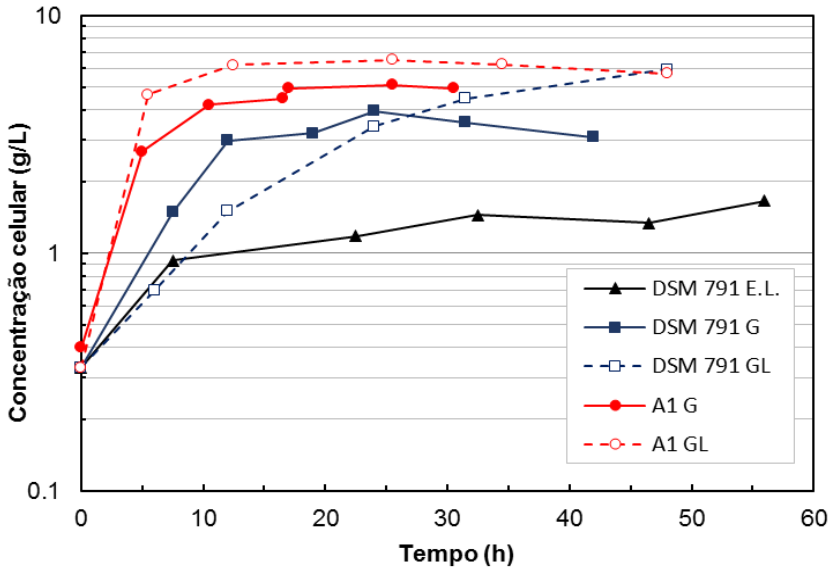

Figura 5.31: Perfis de crescimento de células de *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1, em biorreator mecanicamente agitado, com glicerol (G) e glicerina (GN) como fonte de carbono e extrato de levedura (E.L.) ou milhocina (os demais) como fonte de nitrogênio.

A tabela 5.19 apresenta dados de produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol e glicerina, em batelada simples e batelada alimentada, via fermentação por *Clostridium* spp. selvagens e geneticamente modificadas. Verifica-se que as concentrações de 1,3-propanodiol obtidas na literatura (de 6,7 g/L a 93,7 g/L), bem como a produtividade (de 0,28 $g/L.h^{-1}$ até 3,30 $g/L.h^{-1}$) e o rendimento (de 0,21 g/g a 0,60 g/g) variam bastante de acordo com a linhagem em estudo.

Tabela 5.19: Produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol e glicerina por ***Clostridium* spp.** em bateladas simples e alimentada.

Linhagem	Estratégia	1,3-PDO (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h^{-1})	Referência
C. acetobutylicum DG1*	Batelada alimentada	84,0	0,54	1,70	GONZÁLEZ-PAJUELO et al., (2005)
C. beijerinckii NRRL B-593	Batelada	(10,0)	(0,48)	(0,42)	GUNGORMUSLER et al., (2010b)
C. butyricum AKR102a	Batelada alimentada	93,7 (76,2)	0,52 (0,51)	3,3 (2,3)	WILKENS et al., (2012)
C. butyricum DSM5431	Batelada	56,0	0,51	1,93	BIEBL et al. (1992)
	Batelada alimentada	47,0	0,57	2,24	
C. butyricum DSP1	Batelada	27,5 (26,2)	0,55 (0,52)	1,18 (0,94)	POWAŁOWSKA, (2015)
C. butyricum VPI 1718	Batelada	11,3	0,60	0,94	CHATZIFRAGKOU et al., (2010)
C. butyricum VPI3266	Batelada	14,8 (15,8)	0,49 (0,51)	1,54 (1,59)	GONZÁLEZ-PAJUELO et al., (2004)
C. butyricum VPI3266	Batelada alimentada	65,0	0,57	1,21	SAINT-AMANS et al., (1994)
C. diolis DSM 15410	Batelada alimentada	47,5	0,49	2,15	OTTE et al., (2009)
C. diolis GSHM 2*		78,5 (53,7)	0,53 (0,40)	2,82 (1,92)	
C. pasteurium MNO6	Batelada alimentada	(27,0)	(0,21)	(1,20)	JENSEN et al., (2012)
C. saccharobutylicum NRRL B-643	Batelada	6,7	0,36	0,28	GUNGORMUSLER et al., (2010a)
C. beijerinckii DSM 791	Batelada	17,5 (19,7)	0,55 (0,55)	0,72 (0,56)	**Este trabalho**
C. beijerinckii A1*	Batelada	18,9 (20,0)	0,54 (0,54)	0,98 (0,71)	**Este trabalho**
	Batelada alimentada	26,1	0,55	0,99	

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato, Q_P: produtividade volumétrica, * as linhagens geneticamente modificadas e entre parênteses resultados de fermentações com glicerina.

WILKENS et al. (2012), utilizando uma linhagem bacteriana isolada a partir de amostras de solo, identificada como *C. butyricum* AKR102a, obtiveram um

rendimento de 1,3-propanodiol de 0,52 g/g, tanto com glicerol, quanto com glicerina, mas a concentração final de 1,3-propanodiol no meio foi 20% a 30% inferior com a glicerina. Resultados semelhantes também foram relatados para *C. diois* GSHM 2, uma linhagem tolerante ao 1,3-propanodiol, a qual produziu, aproximadamente, 30% menos 1,3-propanodiol a partir de glicerina em comparação com glicerol puro (OTTE et al., 2009).

CHATZIFRAGKOU et al. (2011) em seus estudos com fermentação de glicerina, utilizando 20 g/L de glicerol obtiveram rendimento de 0,55 g/g com 12 horas de fermentação com a linhagem C. butyricum VPI 1718.

GUNGORMUSLER, GONEN & AZBAR (2011a) também relataram resultados similares com *C. beijerinckii* NRRL B-593. Os autores utilizaram glicerina com concentrações entre 21,6 g/L e 38,0 g/L, resultando numa concentração de 1,3-propanodiol que variou entre 5,6 g/L e 20,9 g/L, em batelada simples. A taxa específica de crescimento das células cultivadas em meio contendo glicerina foi menor (0,13 h^{-1}) quando comparada aos cultivos em glicerol (0,20 h^{-1}).

GONZÁLEZ-PAJUELO, ANDRADE & VASCONCELOS (2004) investigaram os efeitos de impurezas da glicerina em fermentações com *C. butyricum* VPI3266, comparando o desempenho da bactéria em glicerina e em meios quimicamente definidos com concentrações de glicerol variando entre 20,0 g/L e 100,0 g/L. Os autores e relataram não haver nenhuma diferença significativa entre os rendimentos das fermentações com glicerina ou glicerol, em concentrações de até 65,0 g/L. No entanto, com 100 g/L, uma forte inibição do crescimento foi verificada, com glicerina, não havendo diferença significativa no rendimento em 1,3-propanodiol.

5.11 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

Determinadas as particularidades do sistema reacional de fermentação, o desenvolvimento de tecnologias de *downstream* possibilitam a melhoria da operacionalidade de Bioprocessos (PEREIRA, BON & FERRARA, 2008). Devido às várias barreiras e limitações a separação eficiente de 1,3-propanodiol a partir de um meio de fermentação que consiste, basicamente, em água, 1,3-propanodiol, glicerol, subprodutos (ácidos orgânicos), macromoléculas (proteínas, polissacárideos e ácidos nucleicos) e sais, é um grande desafio (GAO et al., 2007). Além da complexidade do meio de fermentação, as características do 1,3-propanodiol, o

ponto de ebulição elevado (214°C) e a forte hidrofilia, também representam um obstáculo para o desenvolvimento de um processo de purificação eficiente (XIU & ZENG, 2008; SABRA, GROEGER & ZENG, 2015).

5.11.1 Recuperação de 1,3-propanodiol por *Gas stripping*

Associações de sistemas reacionais com separação simultânea de produto, como um fermentador anaeróbio associado a um sistema de *gas stripping*, podem ser desenvolvidas com consequentes benefícios técnicos e econômicos para a operação e a viabilidade do bioprocessos (LU, DONG & YANG, 2013). O sistema de *gas stripping* (Figura 4.7) é largamente usado para remoção de solventes de fermentações acetobutanólicas, porém não há relatos na literatura relacionados com o emprego desse sistema para recuperação de 1,3-propanodiol.

Na tabela 5.20 são apresentados os resultados de dois diferentes ensaios. O primeiro deles foi conduzido a fim de se verificar a adequação do sistema e a ausência de vazamentos, utilizando uma solução quimicamente definida composta por: 15,0 g/L do butanol, 10,0 g/L do etanol e 20,0 g/L de 1,3-propanodiol, a uma vazão da bomba de 1,2 L/minuto durante 3 horas.

Tabela 5.20: Ensaios de recuperação de 1,3-propanodiol e solventes do meio de fermentação por *gas stripping* (vazão da bomba de 1,2 L/minuto).

Ensaio	Tempo (h)	Produto	C_P (g/L)	S (g/L.h^{-1})
1	3	Butanol	117,56	1,80
		Etanol	48,20	0,74
		1,3-PDO	0,24	0,004
2	5	1,3-PDO	0,08	0,001

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, C_P: Concentração de produto no condensado e S: taxa de *stripping*.

O segundo experimento foi realizado com o meio fermentado por *C. beijerinckii* DSM 971, contendo em torno de 20,0 g/L de 1,3-propanodiol, com a vazão da bomba de 1,2 L/minuto. Tendo como base a baixa remoção de 1,3-propanodiol obtida no primeiro ensaio, o tempo de operação no segundo ensaio foi de 5 horas.

A concentração de butanol obtida no condensado, 118 g/L, foi semelhante à obtida por LU, DONG & YANG (2013), 113 g/L, durante a recuperação de butanol de meio de fermentação. A taxa de *stripping* (S) de butanol neste estudo, 1,80 $g/L.h^{-1}$, foi superior aquela obtida por ENNIS et al. (1986), em estudos de remoção de ABE, de solução sintética e de meio de fermentação, nos quais obtiveram 0,30 $g/L.h^{-1}$ e 0,45 $g/L.h^{-1}$, respectivamente. Em 2015, LU, DONG & YANG relataram, para remoção de butanol, concentrações de 82,2 g/L no condensado e uma taxa de *stripping* de 0,38 $g/L.h^{-1}$.

Aparentemente, essa tecnologia funciona bem para substâncias voláteis e com ponto de ebulição baixo como butanol (118°C) e etanol (78°C), já para 1,3-propanodiol, cujo ponto de ebulição é 214°C, não houve remoção do mesmo do meio. Como citado anteriormente, a técnica de *gas stripping* é empregada com sucesso na recuperação de produtos da fermentação ABE (QURESHI & BLASCHEK, 2001; DÜRRE, 1998; LU, DONG & YANG, 2013; XUE et al. 2013), além de ser utilizada em processos de purificação de etanol (ONUKI et al., 2015) e remoção de amônia de águas residuais (BOUSEK et al., 2016; YUAN et al., 2016), mas não se mostrou adequada à separação do produto-alvo deste trabalho.

5.11.2 Extração Líquido-Líquido de 1,3-propanodiol – Efeito *Salting-out*

Devido ao elevado ponto de ebulição do 1,3-propanodiol e sua elevada afinidade por água, optou-se por explorar a tecnologia de extração pelo efeito de *salting-out.* Esta técnica consiste em um sistema de extração líquido-líquido, por meio da aplicação direta de um solvente orgânico para recuperação do produto alvo a partir de soluções diluídas, é geralmente utilizado para remover proteínas de sistemas aquosos (LI et al., 2009; SUN et al., 2013).

Na figura 5.32 é apresentado o sistema de separação por *salting-out*, em tubos graduados, com a indicação das respectivas fases: o solvente e o 1,3-propanodiol são deslocados para a fase superior (Topo), a água e os sais para a fase inferior (Base) e as células e/ou proteínas precipitam e ficam entre as fases superior e inferior.

As variáveis dependentes que descrevem o sistema de *salting-out* são o coeficiente de partição (K) e o rendimento de recuperação (Y), calculados conforme descrito no item 4.15.2 deste trabalho.

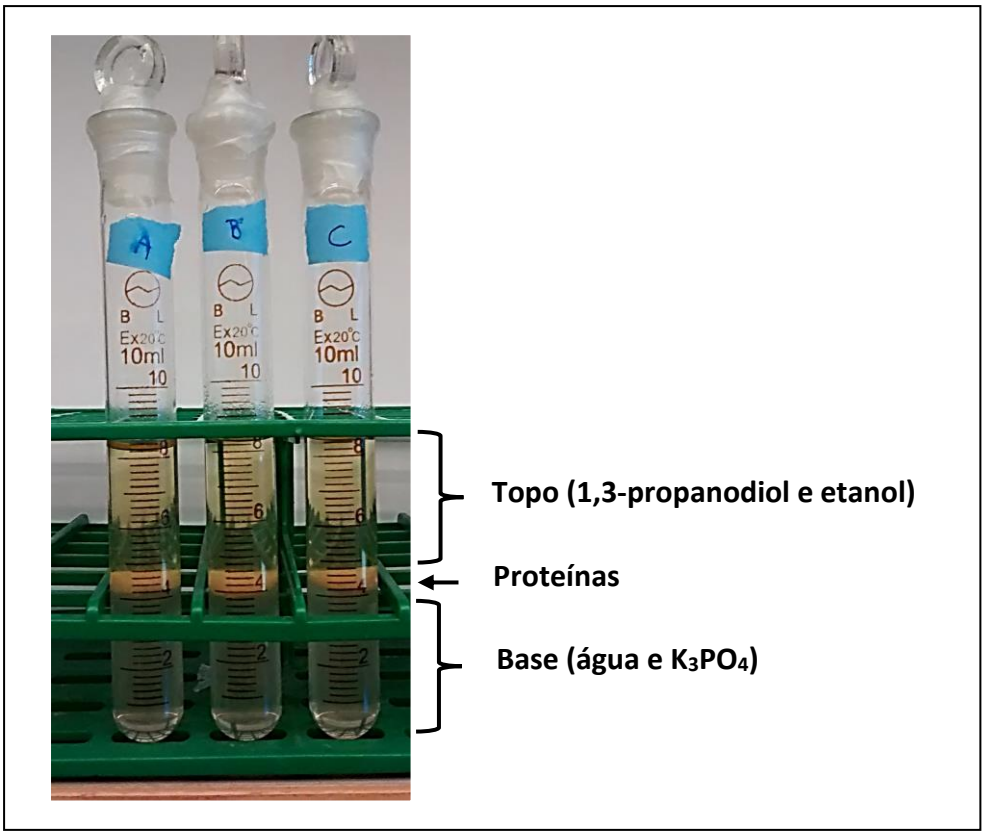

Figura 5.32: Sistema de extração líquido-líquido de 1,3-propanodiol do meio de cultivo, em tubos graduados com a indicação das respectivas fases obtidas com o efeito *salting-out*.

Inicialmente, baseando-se em dados da literatura e de acordo com os reagentes disponíveis no laboratório, foi feito um *screening* para escolha da melhor combinação sal/solvente para extração de 1,3-propanodiol do meio de cultivo. A "solução de 1,3-propanodiol" usada nestes ensaios foi o meio fermentado proveniente do experimento de batelada sequencial (item 5.8 deste trabalho). A relação em massa de sal:solvente:solução de 1,3-propanodiol utilizada nesse *screening* foi de 2:2:5, pois nesta relação há grande probabilidade da formação de duas fases, como desejado. Os resultados podem ser visualizados nas tabelas 5.21 e 5.22.

A melhor combinação de sal/solvente foi K_3PO_4/etanol, pois apresentou os maiores valores para o coeficiente de partição (K) e o rendimento de recuperação (Y). DAI, ZHANG & XIU (2011) relataram que, aparentemente, o coeficiente de partição (K) de 1,3-propanodiol está relacionado as concentrações de álcool e de sal, uma vez aumentadas, melhoram o resultado do efeito de *salting-out*. Além disso,

o rendimento de recuperação (Y), é melhorado quando a concentração de álcool aumenta, porém esse comportamento varia de acordo com o sal empregado.

Ainda, de acordo com DAI, ZHANG & XIU (2011), o solvente com polaridade mais forte pode facilmente ligar-se a mais moléculas de água, de modo que um sistema com metanol ou etanol, geralmente, é superior ao dos outros sistemas para a extração de 1,3-propanodiol.

Tabela 5.21: Coeficiente de partição (**K**) para extração de 1,3-propanodiol do meio de cultivo por *salting-out*.

Sal/Solvente	Metanol	Etanol	Isopropanol	Acetona
K_2HPO_4	2,14 ± 1,24	5,16 ± 0,69	3,54 ± 0,54	3,80 ± 0,96
Na_2CO_3	Precipitação	2,91 ± 0,63	4,23 ± 2,95	3,51 ± 1,21
K_2CO_3	3,14 ± 0,08	5,01 ± 1,03	2,12 ± 0,28	1,92 ± 0,74
$(NH_4)_2SO_4$	Precipitação	2,49 ± 0,95	3,01 ± 0,29	1,02 ± 0,90
$NaHPO_4$	Precipitação	3,41 ± 1,37	3,34 ± 1,74	1,95 ± 0,54
K_3PO_4	2,28 ± 0,26	7,15 ± 1,97	2,74 ± 1,03	2,64 ± 0,35
$C_6H_5NaO_7$	Precipitação	2,32 ± 1,19	5,05 ± 2,97	2,25 ± 0,13

Tabela 5.22: Rendimento de recuperação **Y** (%) para extração de 1,3-propanodiol do meio de cultivo por *salting-out*.

Sal/Solvente	Metanol	Etanol	Isopropanol	Acetona
K_2HPO_4	86,09 ± 4,13	85,57 ± 1,49	64,64 ± 2,30	72,95 ± 2,86
Na_2CO_3	Precipitação	66,83 ± 6,50	64,92 ± 5,78	76,67 ± 4,83
K_2CO_3	54,18 ± 4,50	76,53 ± 2,96	42,01 ± 2,81	59,00 ± 2,90
$(NH_4)_2SO_4$	Precipitação	69,78 ± 3,17	54,85 ± 4,45	60,88 ± 3,49
$NaHPO_4$	Precipitação	80,39 ± 3,38	58,56 ± 4,48	68,36 ± 1,58
K_3PO_4	71,04 ± 1,83	88,52 ± 1,77	53,20 ± 4,66	67,82 ± 2,57
$C_6H_5NaO_7$	Precipitação	66,70 ± 1,93	57,75 ± 2,90	62,87 ± 4,27

Uma vez eleita a melhor combinação sal/solvente (K_3PO_4/etanol), as concentrações de sal, solvente e solução de 1,3-propanodiol foram otimizadas por DCCR. Os valores reais dos intervalos de estudo, para cada fator, são descritos na tabela 4.12 e a matriz do planejamento com os respectivos resultados são apresentados na tabela 5.23.

Tabela 5.23: Matriz de ensaios do DCCR para extração de 1,3-propanodiol por *salting-out*, com os respectivos resultados para otimização de K e Y.

Ensaio	K_3PO_4 (g/g)	Etanol (g/g)	1,3-PDO (g/L)	K	Y (%)
1	-1	-1	-1	4,85	81,00
2	-1	-1	1	8,56	90,85
3	-1	1	-1	4,58	86,68
4	-1	1	1	8,74	93,00
5	1	-1	-1	11,97	88,50
6	1	-1	1	22,31	94,11
7	1	1	-1	20,97	96,06
8	1	1	1	19,04	95,73
9	-1,68	0	0	4,13	85,02
10	1,68	0	0	24,27	95,75
11	0	-1,68	0	11,00	87,35
12	0	1,68	0	11,23	94,45
13	0	0	-1,68	6,79	86,64
14	0	0	1,68	18,56	95,16
15 (PC)	0	0	0	24,97	96,06
16 (PC)	0	0	0	24,04	96,01
17 (PC)	0	0	0	27,68	96,55

1,3-PDO: 1,3-propanodiol, K: coeficiente de partição e Y: rendimento de recuperação.

A partir dos resultados experimentais foi feita a análise de variância para cada um dos fatores em estudo, em função das variáveis de resposta K (Tabela 5.24) e Y (Tabela 5.25), para otimização das concentrações de K_3PO_4, etanol e 1,3-propanodiol. Por meio da Análise de Variância (ANOVA), usando 95% de nível de confiabilidade ($p \leq 0,05$) e erro puro, verificou-se que houve um bom ajuste dos resultados experimentais já que o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,965 para K e 0,995 para Y, o que significa que 96% e 99% da variância é explicada, respectivamente, pelos modelos obtidos para K e Y.

E ainda, analisou-se o R^2 ajustado para cada uma das variáveis dependentes. O R^2 ajustado para a variável K foi um pouco menor (0,915), ao retirar os efeitos não significativos, se comparado ao modelo considerando todos os efeitos (R^2 ajustado

de 0,919). Porém, por ser uma pequena diferença e devido ao ganho em graus de liberdade (de 5 para 9), adotou-se o modelo apenas com as variáveis significativas.

Analisando-se o R^2 ajustado para variável Y nota-se que o modelo com os efeitos não significativos desconsiderados é o mais adequado, pois apresenta um coeficiente ligeiramente maior (R^2 ajustado igual a 0,991), se comparado com o modelo considerando todos os efeitos (R^2 ajustado igual a 0,990).

Tabela 5.24: Tabela de ANOVA do DCCR para otimização das concentrações de K_3PO_4, etanol e 1,3-propanodiol para o coeficiente de partição (**K**).

Fator	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	*F*	*p*
(1) K_3PO_4 (L)	485,548	1	485,548	135,763	0,007
K_3PO_4 (Q)	167,255	1	167,255	46,766	0,021
(2) Etanol (L)	2,660	1	2,660	0,744	0,479
Etanol (Q)	275,389	1	275,389	77,001	0,013
(3) 1,3-PDO (L)	95,292	1	95,292	26,644	0,035
1,3-PDO (Q)	217,356	1	217,356	60,774	0,016
Interação 1L x 2L	4,234	1	4,234	1,184	0,390
Interação 1L x 3L	0,036	1	0,036	0,0102	0,929
Interação 2L x 3L	17,464	1	17,464	4,883	0,158
lack of fit	30,456	5	6,091	1,703	0,410
Erro puro	7,153	2	3,576		
Total	1.063,024	16			

1,3-PDO: 1,3-propanodiol.

As superfícies de resposta, plotadas a partir do DCCR, utilizando o *software* Statistica 6.0, mostram a relação de cada variável dependente (K e Y) com as independentes (K_3PO_4, etanol e solução de 1,3-propanodiol), nas figuras 5.33 e 5.34. Verifica-se que as duas variáveis dependentes apresentam um ponto de máximo neste intervalo de estudo.

Para validar a condição ótima dos fatores foi utilizada a função *Desirability* do *software* Statistica 6.0. Considerando 95% de confiança, o valor de *Desirability* para atingir o ponto máximo para os três fatores, simultaneamente, foi de 1,00, o que significa que essa função atinge 100% do máximo para cada variável dependente (K

e Y). De acodo com maximização dos resultados, a relação ótima de sal:solvente:solução de 1,3-propanodiol é de 3,4g/g:2,8g/g:23,0g/L.

Tabela 5.25: Tabela de ANOVA do DCCR para otimização das concentrações de K_3PO_4, etanol e 1,3-propanodiol para o rendimento de recuperação (**Y**).

Fator	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	*F*	*p*
(1) K_3PO_4 (L)	130,125	1	130,125	1461,531	0,001
K_3PO_4 (Q)	45,820	1	45,820	514,636	0,002
(2) Etanol (L)	66,742	1	66,742	749,625	0,001
Etanol (Q)	37,917	1	37,917	425,874	0,002
(3) 1,3-PDO (L)	89,795	1	89,795	1008,558	0,001
1,3-PDO (Q)	37,917	1	37,917	425,874	0,002
Interação 1L x 2L	0,002	1	0,002	0,017	0,908
Interação 1L x 3L	12,827	1	12,827	144,071	0,007
Interação 2L x 3L	9,483	1	9,483	106,511	0,009
lack of fit	1,580	5	0,316	3,549	0,2340
Erro puro	0,178	2	0,089		
Total	387,401	16			

1,3-PDO: 1,3-propanodiol.

Um modelo matemático foi gerado para cada uma das variáveis dependentes. Os modelos matemáticos que representam K e Y seguem descritos nas equações (5.7) e (5.8), respectivamente, contendo apenas os efeitos significativos:

$$\mathbf{K = 25{,}51 - 3{,}85.k^2 - 4{,}94.e^2 - 4{,}39.p^2 + 5{,}96.k + 2{,}64.p} \quad (5.7)$$

$$\mathbf{Y\ (\%) = 96{,}19 - 2{,}02.k^2 - 1{,}83.e^2 - 1{,}83.p^2 - 1{,}27.k.p - 1{,}09.e.p - 3{,}09.k + 2{,}21.e + 2{,}56.p} \quad (5.8)$$

Onde,

K: coeficiente de partição;

Y: rendimento de recuperação (%);

k: K_3PO_4 (g/g);

e: etanol (g/g);

p: 1,3-propanodiol (g/L).

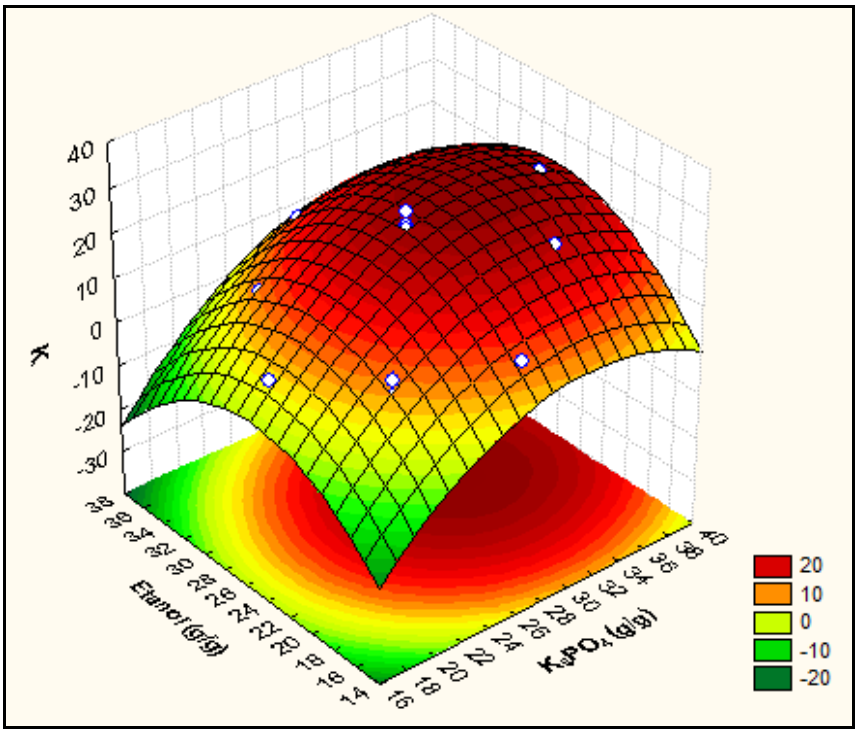

Figura 5.33: Superfície de resposta da otimização das concentrações de etanol e K_3PO_4 para o **coeficiente de partição** (K) pelo sistema de extração de 1,3-propanodiol por *salting-out*.

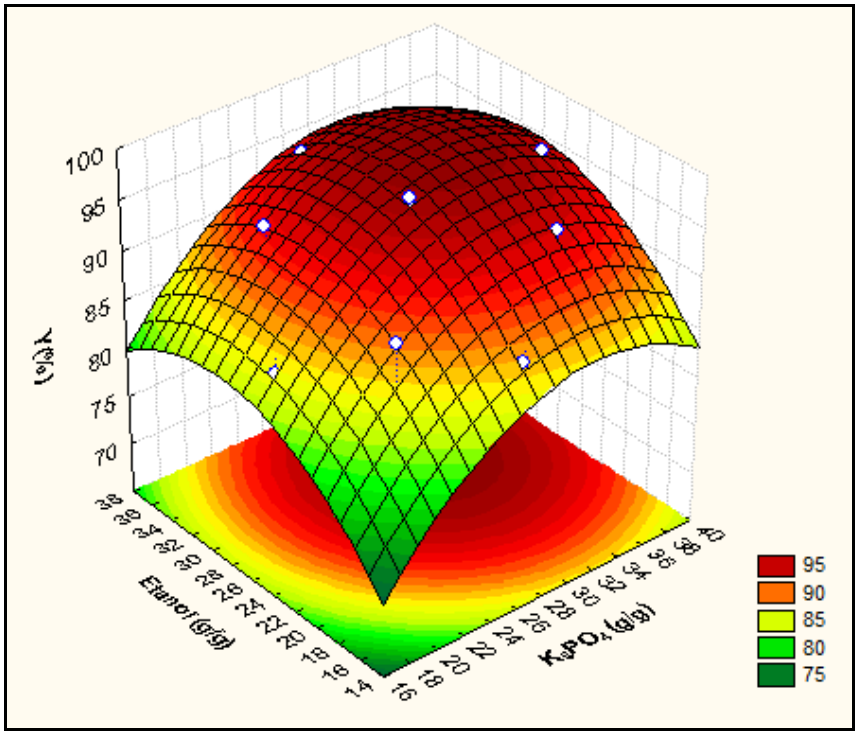

Figura 5.34: Superfície de resposta da otimização das concentrações de etanol e K_3PO_4 para o **rendimento de recuperação** (Y) pelo sistema de extração de 1,3-propanodiol por *salting-out*.

A tabela 5.26 exibe os resultados preditos e os experimentais da validação do modelo empregando as condições ótimas previstas. Dentre os trabalhos que utilizam etanol como solvente no sistema *salting-out*, os resultados deste trabalho são melhores do que os reportados na literatura, utilizando o sistema etanol/K_3PO_4 e meio fermentado, obteve-se valor para K de 33 e para Y de 97%.

Tabela 5.26: Validação do modelo previsto pela função *Desirability*, nas condições otimizadas: 3,4 g/g de sal, 2,8 g/g solvente e 23,0 g/L 1,3-propanodiol, para extração de 1,3-propanodiol por *salting-out.*

Fator	Limites		Valor predito	Resultado experimental
	-95%	+95%		
K	18,52	36,91	27,72	32,99 ± 1,09
Y (%)	96,46	99,36	97,91	96,66 ± 1,95

K: coeficiente de partição e Y: rendimento de recuperação.

LI, TENG & XIU (2011), utilizando o sistema de *salting-out* com metanol/K_2HPO_4 e meio de fermentação anaeróbia, por *K. pneumoniae* CGMCC 2028 com 65,0 g/L de 1,3-propandiol, obtiveram um valor máximo de K de 38 e Y de 98%.

LI et al. (2009) utilizando sistema de etanol/K_2HPO_4 e meio de fermentação anaeróbia com *K. pneumoniae* CGMCC 2028 contendo 53,5 g/L de 1,3-propanodiol, reportaram um valor para K de no máximo 4,8 e para Y de 94%. Já AYDOGAN et al. (2010), utilizando sitema de etanol/K_2HPO_4 e meio de fermentação de *C. butyricum* VPI 1718, contendo 40,7 g/L de 1,3-propanodiol, obtiveram um valor de K de 20 e de Y de 97%.

A extração por *salting-out* com K_2HPO_4/etanol, também foi ensaiada por FU, SUN & XIU (2013) que utilizaram meio de fermentação anaeróbia de *K. pneumoniae* CGMCC 2028 contendo 71,8 g/L de 1,3-propanodiol, tendo obtido um valor de K de no máximo 17 e de Y de 96% para ensaios em tubos e K de no máximo 11 e Y de 94% em um sistema de extração contínua proposto pelos autores.

LI et al. (2013) descreveram um método de extração *salting-out* utilizando etanol e carbonato de sódio, no qual foi possível separar 97,9% de 1,3-propanodiol e 99,1% de células, em uma única etapa. Anteriormente, LI, TENG & XIU (2011)

tinham usado uma combinação de metanol e hidrogênio dipotássio fosfato, obtendo uma recuperação de 1,3-propanodiol de 98,1%.

Para produtos de fermentação, o *salting-out* é favorável já que a concentração do produto alvo nos meios de fermentação geralmente é baixa. Atualmente, a técnica é amplamente utilizada para a separação de produtos químicos de base biológica a partir de meios de fermentação, como, por exemplo, 2,3-butanodiol (DAI, ZHANG & XIU, 2011; LI, TENG & XIU, 2010; JIANG et al., 2009), acetoína (SUN et al., 2012), 1,3-propanodiol (AYDOGAN et al., 2010; LI et al., 2009; LI, TENG & XIU, 2011), e ácido lático (AYDOGAN et al., 2011; WEI et al., 2012).

No entanto, apesar da grande quantidade de trabalhos publicados sobre a separação de diversos produtos-alvo, utilizando esta tecnologia com alto coeficiente de partição e recuperação em escala laboratorial, ela não tem sido utilizada em escala industrial, aparentemente, devido à limitada compreensão deste sistema (FU, SUN & XIU, 2013).

5.12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A demanda crescente de energia deverá impulsionar a crescente indústria de biocombustíveis que tem como princípio a sustentabilidade ambiental, produzindo combustíveis limpos, biodegradáveis e inesgotáveis. Dentre estes biocombustíveis, ressalta-se o biodiesel, cujo aumento da produção gera proporcionalmente uma maior quantidade de seu principal subproduto – a glicerina.

Vários produtos químicos de interesse podem ser obtidos a partir do bioaproveitamento de glicerol, dentre eles o 1,3-propanodiol, naturalmente produzido por algumas bactérias. No entanto, é necessário a associação da disponibilidade de glicerol a baixo preço e do desenvolvimento de estratégias de engenharia de processos adequadas para alcançar viabilidade técnica e econômica na produção de 1,3-propanodiol de base biológica, o que certamente representará uma revolução não só na produção deste importante diol como também em toda a cadeia de produção de biodiesel.

A figura 5.35 resume, em termos, os principais achados e a evolução deste trabalho a cada etapa de desenvolvimento do processo de fermentação de glicerol, com *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1, para produção de 1,3-propanodiol.

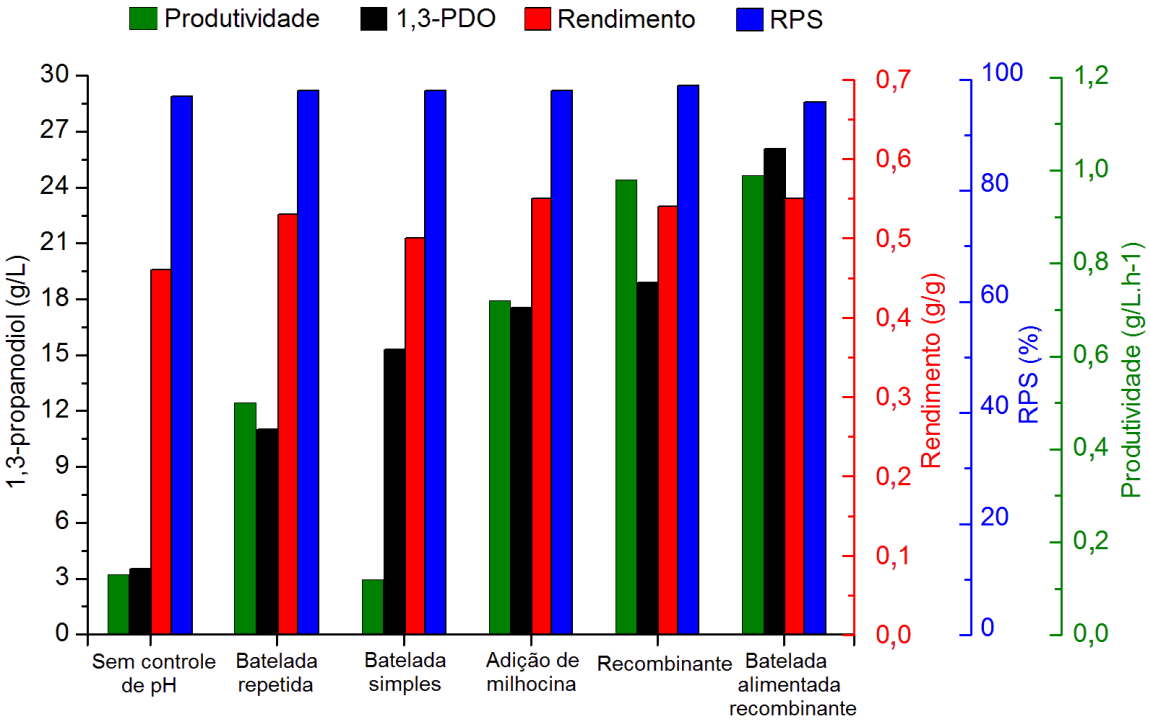

Figura 5.35: Evolução dos resultados obtidos neste trabalho para otimização da fermentação propanodiólica a partir de glicerol, por *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1.

Aparentemente, o controle de pH é fundamental para obtenção da máxima porcentagem de RPS, com o qual obteve-se rendimento médio foi de 0,53 g de 1,3-propanodiol/g de glicerol consumido. Cabe salientar que, levando-se em consideração os resultados iniciais deste trabalho, foi possível alcançar um aumento na produção de 1,3-propanodiol de 3,5 g/L para, aproximadamente, 26,0 g/L, o que corresponde a um aumento de cerca de 7,5 vezes.

Diante do exposto, *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1 são microrganismos robustos para a fermentação propanodiólica de glicerol e/ou glicerina. Portanto, acreditamos que este trabalho pode servir de base para o desenvolvimento de um processo bioquímico para a produção de 1,3-propanodiol, visando a sua viabilidade técnica-econômica a fim de torná-lo competitivo comercialmente.

Capítulo 6

CONCLUSÕES

Uma série de aspectos interessantes, alguns inéditos, foi observada durante o desenvolvimento deste trabalho; tais fatores constituem as principais conclusões deste trabalho e estão apresentadas na sequência.

- No tocante à seleção de microrganismos, do grupo das bactérias anaeróbias com habilidade de produzir 1,3-propanodiol a partir de glicerol, *C. beijerinckii* DSM 791, foi o que apresentou os melhores resultados dentre *Clostridium* spp. disponíveis para estudo (*C. acetobutylicum* DSM 6228, *C. beijerinckii* DSM 1739, *C. beijerinckii* DSM 791, *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 2152, *C. beijerinckii* ATCC 35702 e *C. butyricum* INCQS 00635).

- A sequência de delineamentos experimentais, combinada com a utilização da função *Desirability* para a otimização da composição do meio de fermentação e a análise estatística dos dados, configuram ferramentas importantes para a formulação de um meio ótimo, que apresentou melhores resultados quando comparado com meios mais complexos, tradicionalmente empregados no cultivo de *Clostridium* spp..

- O controle de pH se mostrou essencial durante a fermentação de glicerol a 1,3-propanodiol por *C. beijerinckii* DSM 791, pois os ácidos produzidos pela própria bactéria são potentes inibidores do processo fermentativo. Valores de pH ligeiramente ácidos, entre 5,5 e 6,0, resultaram nos maiores valores de rendimento, concentração celular e produção de 1,3-propanodiol.

- Demonstrou-se que a adição de glicose em concentrações crescentes (0 g/L a 15 g/L) ao meio de cultivo contendo glicerol resultou em uma diminuição drástica (90%) na produção de 1,3-propanodiol, o que foi atribuído ao clássico fenômeno de repressão catabólica, devido ao consumo preferencial de glicose em detrimento de glicerol. Na presença de elevadas concentrações de glicose, a síntese de ácidos orgânicos aumentou significativamente, em particular do ácido butírico, que também é um potente inibidor da atividade fermentativa de *C. beijerinckii* DSM 791. De fato, quando se realizou um ensaio disponibilizando previamente glicose, não houve a formação do produto-alvo, que teve a sua síntese iniciada somente após o esgotamento da glicose e início da alimentação do sistema com o glicerol.

- Constatou-se uma expressiva melhoria no processo fermentativo para produção de 1,3-propanodiol por *C. beijerinckii* DSM 791, ao se substituir extrato de levedura por milhocina, o que foi atribuído à presença de uma variedade de aminoácidos e ácido lático encontrados neste insumo, gerado como subproduto do processamento do milho. Registra-se o aumento em seis vezes na produtividade volumétrica de 1,3-propanodiol, associado ao maior crescimento bacteriano, com uma redução no tempo de duplicação da massa celular de três vezes.

- Avaliou-se o desempenho de *C. beijerinckii* DSM 791, em sistema de bateladas sequenciais, no qual as células foram imobilizadas em um leito fibroso. Esse sistema de fermentação exibiu excelente estabilidade operacional, tendo funcionado por 170 horas em 8 ciclos de fermentação. Durante os 7 dias de operação, constatou-se, em cada batelada, o consumo total do glicerol e uma produtividade volumétrica média de 0,5 $g/L.h^{-1}$.

- Lançou-se mão de técnicas da Biologia Molecular para um aproveitamento mais eficiente do glicerol, visando o aumento nos níveis de expressão em 1,3-propanodiol por *C. beijerinckii* DSM 791. Uma nova linhagem recombinante foi construída (*C. beijerinckii* A1), aumentando-se o nível de expressão de duas enzimas chave da via oxidativa do metabolismo do glicerol: glicerol desidrogenase (*gldA*) e de dihidroxiacetona quinase (*dhaKLM*). Embora, os

resultados tenham mostrado que o aumento na produção de 1,3-propanodiol não foi muito significativo, quando a fermentação foi operada em batelada simples, a principal contribuição da construção genética foi na melhoria da produtividade volumétrica (de 0,72 g/L.h^{-1} para 0,98 g/L.h^{-1}). Em batelada alimentada com a linhagem selvagem, a concentração máxima de produto foi de 18 g/L, não tendo seu valor aumentado com a alimentação de um pulso de glicerol. Por outro lado, a linhagem recombinante foi capaz de consumir o glicerol alimentado e produzir 26 g/L de 1,3-propanodiol.

- A estratégia de fermentação mais competitiva, ou seja, aquela que apresentou maior valor de produtividade volumétrica (0,98 g/L.h^{-1}), rendimento (0,55 g/g) e concentração de 1,3-propanodiol (26,1 g/L), foi a batelada alimentada empregando, glicerol como fonte de carbono, milhocina como fonte de nitrogênio e *C. beijerinckii* A1.

- Tanto *C. beijerinckii* DSM 791 como *C. beijerinckii* A1 foram capazes de crescer e produzir 1,3-propanodiol em meio mínimo utilizando glicerol ou glicerina como únicas fontes de carbono. O desenvolvimento de um bioprocesso para a produção deste diol a partir da glicerina, oriunda da produção de biodiesel, é de elevada importância tecnológica, na medida em que se dá um destino a um resíduo, transferindo-o para a posição de matéria prima. Desta forma, incorpora-se o conceito de biorrefinaria à cadeia de produção do biodiesel, buscando sua sustentabilidade econômica, já que o biodiesel, sendo um combustível, enquadra-se na categoria de “low-price/high-volume”.

- Os motivos da escolha do grupo de pesquisa da *The Ohio State University*, para dar continuidade aos estudos, foram: o domínio das técnicas de cultivo de anaeróbios e o comprovado *know-how* na aplicação de *gas stripping* e outras técnicas de *downstream*. Como a técnica de *gas stripping* não se mostrou a mais adequada para a separação de 1,3-propanodiol, investigou-se outra técnica para recuperação do produto – o *salting-out*. Selecionou-se o melhor par solvente/sal e otimizou-se suas concentrações para recuperação de 1,3-propanodiol do meio fermentado por *C. beijerinckii* DSM 791. Empregando o binômio etanol/K_3PO_4, obteve-se um coeficiente de partição (K) de 33 além de 97% de rendimento de

recuperação (Y). Dentre os trabalhos que utilizam o etanol como solvente no sistema *salting-out*, estes resultados são melhores que os reportados na literatura até o momento. Ressalta-se que, tanto o sal como o solvente que fazem parte do sistema de *salting-out*, podem ser recuperados e reutilizados em uma nova etapa de separação.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar experimentos utilizando sistema contínuo com *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1 em biorreator de leito fibroso visando o aumento de produtividade e rendimento em 1,3-propanodiol.

- Avaliação da toxicidade de 1,3-propanodiol por meio da verificação da viabilidade celular de *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1.

- Avaliar de maneira mais pormenorizada a influência do ácido lático em fermentações em biorreator empregando *C. beijerinckii* DSM 791 e *C. beijerinckii* A1, bem como avaliar se é economicamente viável a sua adição ao meio de cultivo.

- Mensurar o menor tempo necessário para a extração de 1,3-propanodiol por *salting-out* e a eficiência de remoção de células e proteínas.

- Realizar extração por *salting-out* com meio fermentados com glicerina e comparar os resultados com os obtidos com fermentados com glicerol, pois os sais residuais presentes na glicerina podem interferir no processo de separação.

- Ensaiar a produção de 1,3-propanodiol em escala piloto para o levantamento de parâmetros técnicos e vislumbar o escalonamento do processo.

Referências

ABUBACKAR, H. N.; BENGELSDORFB, F. R.; VEIGA, C. K. Improved operating strategy for continuous fermentation of carbon monoxide to fuel-ethanol by clostridia. **Applied Energy**, v. 169, p. 210-217, 2016.

AGUILAR, L. L.; ARIAS, M. L. Acetone-butanol-ethanol (ABE) production in fermentation of enzymatically hydrolyzed cassava flour by *Clostridium beijerinckii* BA101 and solvent separation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 1092-1098, 2013.

AHMED, S.; KHOSA, A. N. An introduction to DNA technologies and their role in livestock production: a review. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 20, p. 305-314, 2010.

AIBA, S.; HUMPHREY, A. E. e MILLIS, N. F. - Biochemical engineering. Academic Press, 1973.

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, n. 3, p. 179-186, 2009.

ANAND, P.; SAXENA, R. K.; MARWAH, R. G. A novel downstream process for 1, 3-propanediol from glycerol-based fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1267-1276, 2011.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Produção nacional de biodiesel puro – B100. 2013. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?dw=8739> Acesso em 03/03/2016.

AZEREDO, L. A. I. D., LIMA, M.B.D., COELHO, R. R. R., FREIRE, D. M. G. A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 using feather meal and corn steep liquor. **Current Microbiology,** v. 53 (4), p. 335– 339, 2006.

AYDOGAN, O., BAYRAKTAR, E.,MEHMETOGLU, U., KAEDING, T. Selection and optimization of an aqueous two-phase system for the recovery of 1,3-propandiol from fermentation broth. **Engineering in Life Sciences,** v. 10, p. 121–129, 2010.

AYDOGAN, O.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, U. Aqueous two-phase extraction of lactic acid: optimization by response surface methodology. **Separation Science and Technology**, v. 46, n. 7, p. 1164-1171, 2011.

AYOUB, M.; ABDULLAH, A. Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2671-2686, 2012.

BANEYX, François. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10 (5), p. 411-421, 1999.

BARBIRATO, F.; HIMMI, E. H.; CONTE, T.; BORIES, A. 1,3-Propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**, p. 281–289, 1996.

BASTOS, V. D. Biopolímeros e polímeros de matérias-primas renováveis alternativos aos petroquímicos. **Revista do BNDES.** Rio de Janeiro, v. 14, n. 28, p. 201-234, 2007.

BERRÍOS-RIVERA, S. J.; BENNETT, G. N.; SAN, K. Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD+-dependent formate dehydrogenase. **Metabolic Engineering**, v. 4, n. 3, p. 217-229, 2002.

BIEBL, H., MARTEN, S., HIPPE, H., DECKWER, W. D. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 592–597, 1992.

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

BIODIESEL MAGAZINE. US biodiesel consumption hits nearly 2.1 billion gallons in 2015. 2016. Disponível em: <http://www.biodieselmagazine.com/articles/731989/us-biodiesel-consumption-hits-nearly-2-1-billion-gallons-in-2015>. Acesso em: 13/03/2016.

BOUSEK, J., SCROCCARO, D., SIMA, J., WEISSENBACHER, N., & FUCHS, W. Influence of the gas composition on the efficiency of ammonia stripping of biogas digestate. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 259-266, 2016.

CALADO, V., MONTGOMERY, D. C. Planejamento de experimentos usando o Statistica. **E-papers**. 1nd ed. Rio de Janeiro, RJ. 2003.

CAMARA NACIONAL. Câmara aprova adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no Brasil. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/noticias/POLITICA/504690-CAMARA-APROVA-ADICAO-DE-BIODIESEL-AO-OLEO-DIESEL-COMERCIALIZADO-NO-BRASIL.html>. Acesso em 03/03/2016.

CARDINAL, E.V. & HEDRICK, L.R. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. **Journal of Biological Chemistry**, v. 172(2), p. 609-612, 1948.

CAROLE, T.M.; PELLEGRINO, J.; PASTER, M.D. Opportunities in the industrial biobased products industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 871–885, 2004.

CELIŃSKA, E. Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. **Biotechnology Advances,** v. 28, p. 519–530, 2010.

CELIŃSKA, E. Fully glycerol-independent microbial production of 1, 3-propanediol via non-natural pathway: Paving the way to success with synthetic tiles. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 2, p. 242-243, 2015.

CELIŃSKA, E., DROZDZYNSKA, A., JANKOWSKA, M., BIALAS, W., CZACYK, K., GRAJEK, W. Genetic engineering to improve 1,3-propanediol production in an isolated *Citrobacter freundii* strain. **Process Biochemistry**, 50, 48–60, 2015.

CGEE – CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Química verde no Brasil: 2010 – 2030 – Edição revista e atualizada.** Brasília, p.127 - 139, 2010. Disponível em: <http://www.cgee.org.br/publicacoes/quimica_verde.php>. Acesso em 15/02/2014.

CHATZIFRAGKOU, A.; DIETZ D; KOMAITIS, M; ZENG, A. P. Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1, 3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 1, p. 76-84, 2010.

CHATZIFRAGKOU, A.; AGGELIS, G.; KOMAITIS, M.; ZENG, A.P.; PAPANIKOLAOU, S. Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation. **Bioresource Technology**, p. 10625–10632, 2011.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 13-27, 2012.

CHATZIFRAGKOU, A., PAPANIKOLAOU, S., KOPSAHELIS, N., KACHRIMANIDOU, V., DORADO, M. P., KOUTINAS, A. A. Biorefinery development through utilization of biodiesel industry by-products as sole fermentation feedstock for 1,3-propanediol production. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 167–175, 2014.

CHEN, H.; JIANG, J.; WU, G. Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6178-6182, 2009a.

CHEN, Z.; LIU, H.; LIU, D. Regulation of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in *Klebsiella pneumoniae* by overexpression of dhaT and dhaD genes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 4, p. 305-309, 2009b.

CHO, M. H.; JOEN, S. I.; PYO, S. H.; MUN, S.; KIM, J. H. A novel separation and purification process for 1,3-propanediol. **Process Biochemistry**, v. 41(3), p. 739–744, 2006.

CIRIMINNA, R., PINA, C. D., ROSSI, M., PAGLIARO, M. Understanding the glycerol market. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116(10), p. 1432-1439, 2014.

CLAUDE, S., HEMIN, G., M.; HILL, K. Commercialisation of glycerol, in Proceedings of chemical-technical utilisation of vegetable oils conference, Stelter, W., Kerckow, B., & Hagen, M. (eds) Bonn, June 20–21, p. 129–146, 2000.

COMWIEN, J.; BOONVITHAYA, N., CHULALUKSANANUKUL, W.; GLINWONG, C. Direct Production of Butanol and Ethanol from Cane Sugar Factory Wastewater and Cellulosic Ethanol Pilot Plant Wastewater by *Clostridium beijerinckii* CG1. **Energy Procedia**, v. 79, p. 556-561, 2015.

DA COSTA, A. C. A.; PEREIRA JR, N.; ARANDA, D. A. G. The situation of biofuels in Brazil: new generation technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 9, p. 3041-3049, 2010.

DAI, J. Y., ZHANG, Y. L., XIU, Z. L. Salting-out extraction of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke-based fermentation broth. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 682–686, 2011.

DE GRAEF, MARK R; ALEXEEVA, S; SNOEP J. L.; MATTOS, M. J; T. The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 8, p. 2351-2357, 1999.

DE SOUZA, E. A.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1, 3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1.**Renewable Energy**, v. 72, p. 253-257, 2014.

DECKWER, W. D. Microbial conversion of glycerol production to 1,3-propanediol. **FEMS Microbiologi Reviews**, v. 16, p. 143–149, 1995.

DINIZ, G. De coadjuvante a protagonista: Glicerina bruta obtida na produção de biodiesel pode ter muitas aplicações. **Ciência Hoje Online**, 19/10/05. Disponível em <http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3973>, Acesso em: 24/11/2015.

DROZDZYNSKA, A.; LEJA, K.; CZACZYK, K. Biotechnological production of 1, 3-propanediol from crude glycerol. **BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 1, 2011.

DURGAPAL, M.; KUMAR, V.; YANG, T.H.; LEE, H.J.; SEUNG, D.; PARK, S. Production of 1, 3-propanediol from glycerol using the newly isolated *Klebsiella pneumoniae* J2B. **Bioresource technology**, v. 159, p. 223-231, 2014.

DÜRRE, P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49(6), p. 639-648, 1998.

ENNIS, B. M.; MARSHALL, C. T.; MADDOX, I. S.; PATERSON, A. H. J. Continuous product recovery by in-situ gas stripping/condensation during solvent production from whey permeate using *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 10, p. 725-730, 1986.

EPA. U.S. Energy Information Administration - Monthly Biodiesel Production Report 2016. Disponível em: <http://www.eia.gov/biofuels/biodiesel/production/table1.pdf>. Acesso em: 17/05/2016.

FAN, X.; BURTON, R.; ZHOU, Y. Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals Mini Review. **The Open Fuels & Energy Science Journal**, v. 3, n. 1, 2010.

FORAGE, R. G.; LIN, E. C. DHA system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. **Journal of Bacteriology**, v. 151, n. 2, p. 591-599, 1982.

FORMANEK, J.; MACKIE, R.; BLASCHEK, H. P. Enhanced Butanol Production by *Clostridium beijerinckii* BA101 Grown in Semidefined P2 Medium Containing 6 Percent Maltodextrin or Glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2306-2310, 1997.

FU, H.; SUN, Y.; XIU, Z. Continuous countercurrent salting-out extraction of 1,3-propanediol from fermentation broth in a packed column. **Process Biochemistry**, v. 48(9), p. 1381-1386, 2013.

GAO, S.; ZHANG, D.; SUN, Y.; XIU, Z. Separation of 1,3-propanediol from glycerol-based fermentations of *Klebsiella pneumoniae* by alcohol dilution crystallization. **Frontiers of Chemistry Science and Engineering**, v. 1(2), p. 202–207, 2007.

GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M. **Principles of Biochemistry: with a human focus**, Thomson Brooks/Cole. p. 395-420, 2001.

GONG, Y.; TONG, Y.; WANG, X. L.; LIU, D. H. The possibility of the desalination of actual 1,3-propanediol fermentation broth by electrodialysis. **Desalination**, 161, p. 169–178, 2004.

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

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; SALLES, I. M.; MENDES, F.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLEC, P. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Metabolic Engineering**, p. 329–336, 2005.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; SALLES, M.; MENDES, F.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLEC, P. Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol: Physiological Comparison of a Natural Producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an Engineered Strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5) **Applied and Environmental Microbiology**, p. 96–101, 2006.

GREVE, A.; KULA, M. R. Cost structure and estimation for the recycling of salt in a protein extraction process system. **Bioprocess Engineering**, n. 6, p. 173–177, 1990.

GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; AZBAR, N. Comparative evaluation of *Clostridium beijerinckii* (NRRL B-593) and *Klebsiella pneumoniae* for 1,3-propanediol production. **Journal of Biotechnology**, v. 150S, p. S210–S211, 2010a.

GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; OZDEMIR, G.; AZBAR, N. 1,3-propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. **New Biotechnology**, v. 27 (6), p. 782–788, 2010b.

GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; AZBAR, N. 1,3-Propanediol production potential by a locally isolated strain of *Klebsiella pneumoniae* in comparison to *Clostridium beijerinckii* NRRL B593 from waste glycerol. **Journal of Polymers Environment**, v. 19, p. 812–817, 2011a.

GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; AZBAR, N. Continuous production of 1,3-propanediol using raw glycerol with immobilized *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 in comparison to suspended culture. **Bioprocess Biosystems Engineering**, 34, 727–733, 2011b.

GÜNZEL, B.; YONSEL, S.; DECKWER, W. D. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m^3. **Applied Microbiology Biotechnology**, p. 289-294, 1991.

GUO, T.; SUN, B. J.; JIANG, M.; WU, H.; DU, T. F.; TANG, Y. Enhancement of butanol production and reducing power using a two-stage controlled-pH strategy in batch culture of *Clostridium acetobutylicum* XY16. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 2551-2558, 2012.

GUTKNECHT, R.; BEUTLER, R.; GARCIA-ALLES, L.F;, BAUMANN U.; ERNI, B. The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 10, p. 2480-2486, 2001.

HAO, J., LIU, H. J., LIU, D. H. Novel route of reactive extraction to recover 1,3-propanediol from a dilute aqueous solution. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 44, p. 4380–4385, 2005.

HAO, J.; WANG, W.; TIAN, J.; LI, J.; LIU, D. Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing *dhaT* gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 735–741, 2008.

HATHEWAY, C. L; Toxigenic clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 66-98, 1990.

HEAP, J. T.; PENNINGTON, O. J.; CARTMAN, S. T.; MINTON, N. P. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids.**Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 1, p. 79-85, 2009.

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

HIMMI, E. H.; BORIES, A.; BARBIRATO, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum.* **Bioresource Technology**, p.123-128, 1999.

HUANG, W.; RAMEY, D. E.; YANG, S. T. Continuous production of butanol by *Clostridium acetobutylicum* immobilized in a fibrous bed bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, n. 1-3, p. 887-898, 2004.

HUFFER, S.; CLARK, M. E.; NING, J. C.; BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. **Applied Environmental Microbiology**, n. 77, p. 6400–6408, 2011.

JANG, Y. S.; LEE, J.; MALAVIYA, A.; SEUNG ,D. Y.; CHO, J. H.; LEE, S. Y. Butanol production from renewable biomass: Rediscovery of metabolic pathways and metabolic engineering. **Biotechnology Journal**, v. 7, p. 186-198, 2012.

JENSEN, T.; KVIST, T.; MIKKELSEN, M. J.; WESTERMANN, P. Production of 1, 3-PDO and butanol by a mutant strain of *Clostridium pasteurianum* with increased tolerance towards crude glycerol. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2012.

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

JIANG, L.; SONG P.; ZHU, LI, S.; HU, Y.; FU, N,; HUANG, H. Comparison of metabolic pathway for hydrogen production in wild-type and mutant *Clostridium tyrobutyricum* strain based on metabolic flux analysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 5, p. 2176-2184, 2013.

JIANG, M.; CHEN, J.; HE, N.; WU A.; KONG, X. P. et al. Enhanced acetone/butanol/ethanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH control strategy. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1238-1244, 2014.

JOHNSON, D. T; TACONI, K. A. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, v. 26, n. 4, p. 338-348, 2007.

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

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

KLEMM, W. R. Biological Water and Its Role in the Effects of Alcohol 1. **Alcohol**, v. 15, n. 3, p. 249-267, 1998.

KUBIAK, P.; LEJA, K.; MYSZKA, K.; CELIŃSKA, E.; SPYCHAŁA, M.; POWAŁOWSKA, D. S.; CZACZYK, K.; GRAJEK, W. Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthetize 1,3-propanediol from glycerol. **Process Biochemistry**, p. 1308–1319, 2012.

KULA, M. R.; KRONE K.H.; HUSTEDT H. Purification of enzymes by liquid–liquid extraction. **Advances in biochemical engineering**, v. 24. p. 73–118, 1982.

KUMAR, G. S; WEE, Y.; LEE, I.; SUN, H. J.; ZHAO, X. XIA, S, KIM, J.; et. al. Stabilized glycerol dehydrogenase for the conversion of glycerol to dihydroxyacetone. **Chemical Engineering Journal**, v. 276, p. 283-288, 2015.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zymomonas* ethanol fermentations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63, n. 1, p. 287-304, 1997.

LEE, S. Y.; PARK, J. H.; JANG, S. H.; NIELSEN, L. K. KIM, J.; JUNG, K. S. Fermentative butanol production by Clostridia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 209-228, 2008.

LEE, C. S.; AROUA, M. K.; DAUD, W. M.; LATAPIE, L.; et al. A review: Conversion of bioglycerol into 1, 3-propanediol via biological and chemical method. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 963-972, 2015.

LEJA, K.; MYSZKA, K.; KUBIAK, P.; WOJCIECHOWSKA, J.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; CZACZYK, K.; GRAJEK, W. Isolation and identification of *Clostridium spp*. from natural samples that performs effective conversion of glycerol to 1, 3-propanediol. **Acta Scientiarum Polonorum Biotechnologia**, v. 2, p. 25-34, 2011.

LI S.; TUAN V. A.; FALCONER J. L.; NOBLE R. D. Separation of 1,3- propanediol from glycerol and glucose using a ZSM-5 zeolite membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 191, p. 53–59, 2001.

LI, Z.; JIANG, B.; ZHANG, D.; XIU, Z. Aqueous two-phase extraction of 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation broths. **Separation and Purification Technology**, v. 66, n. 3, p. 472-478, 2009.

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

LI, S.Y.; SRIVASTAVA, LI, R. SRIVASTAVA, S.L. SUIB, Y. LI, R.S. Parnas Performance of batch, fed-batch, and continuous A-B-E fermentation with pH-control. **Bioresource technology**, v. 102, n. 5, p. 4241-4250, 2011.

LI, Z. G.; TENG, H.; XIU, Z. L. Extraction of 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation broths with methanol/phosphate aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 586–591, 2011.

LI, W.; NG, I.-S.; FANG, B.; YU, J.; ZHANG, G. Codon optimization of 1, 3-propanediol oxidoreductase expression in *Escherichia coli* and enzymatic properties. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 7-7, 2011.

LI, C.; LESNIK K. L.; LIU H. Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. **Energies**, v. 6, p. 4739-4768, 2013.

LI, Z. Q.; SUN, Y. Q.; ZHENG W. L.; TENG, H.; XIU, Z. L. A novel and environment-friendly bioprocess of 1,3-propanediol fermentation integrated with aqueous two-phase extraction by ethanol/sodium carbonate system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 68-75, 2013.

LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriological Reviews**, v. 12, n. 4, p. 297, 1948.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v.3, p. 61 – 72, 2001.

LIU, H.; WANG, G.; ZHANG, J. **The Promising Fuel-Biobutanol**. INTECH Open Access Publisher, 2013.

LOUWRIER, A. Model phase separations of proteins using aqueous/ethanol components. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 5, p. 363-365, 1998.

LU, C.; DONG, J.; YANG, S. T. Butanol production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation–gas stripping process. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 467-475, 2013.

LU, K. M.; CHIANG, S. W.; WANG, Y. R.; CHEIN, R. Y.; LI, S. Y.; et. al. Performance of fed-batch acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation coupled with the integrated in situ extraction-gas stripping process and the fractional condensation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2015.

LÜTKE-EVERSLOH, T. Application of new metabolic engineering tools for *Clostridium acetobutylicum.* **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 5823-5837, 2014.

MA, Z.; RAO, Z.; XU, L.; LIAO, X.; FANG, H.; ZHUGE, J.; et. al. Expression of dha operon required for 1, 3-PD formation in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae.* **Current Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 191-198, 2010.

MADDIPATI, P.; ATIYEH, H. K.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6494–6501, 2011.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biología de los Microorganismos**, ed. 10, Santiago: Prentice Hall, p. 403-408, 2004.

MAEDA, R. N.; SILVA, M. M. P.; SANTA ANNA, L. M. M.; PEREIRA, JR N. Nitrogen source optimization for cellulase production by *Penicillium funiculosum*, using a sequential experimental design methodology and the desirability function. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 411–422, 2009.

MAERVOET, V. E. T.; DE MEY, M.; BEAUPREZ, J.; DE MAESENEIRE, S.; SOETAERT, W. K. Enhancing the Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol Using Metabolic Engineering. **Organic Process Research & Development**, v. 15, p. 189–202, 2011.

MAERVOET, V. E. T.; BEAUPREZ, J.; DE MAESENEIRE, S. L.; SOETAERT, W. K.; DE MEY M. Enhancing the Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol Using Metabolic Engineering. **Green Chemistry**, v. 14, p. 2168-2178, 2012a.

MAERVOET, V.; BEAUPREZ, J.; DE MAESENEIRE, S.; SOETAERT, W.; DE MEY, M. *Citrobacter werkmanii,* a new candidate for the production of 1,3-propanediol: strain selection and carbon source optimization. **Green Chemistry**, v. 14, p. 2168–2179, 2012b.

MAERVOET, V. E. T.; DE MAESENEIRE, S.; AVCI F. G.; BEAUPREZ, J.; SOETAERT W. K., DE MEY, M. 1,3-propanediol production with *Citrobacter werkmanii* DSM 17579: effect of a dhaD knock-out **Microbial Cell Factories**. v. 13(70), p. 1-11, 2014.

MAERVOET, V. E. T.; DE MAESENEIRE, S.; AVCI, F. G.; BEAUPREZ, J.; SOETAERT, W. K., DE MEY, M. High yield 1, 3-propanediol production by rational engineering of the 3-hydroxypropionaldehyde bottleneck in Citrobacter werkmanii. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1, 2016.

MAKRIDES, S. C.; DE MAESENEIRE, S.; AVCI, F. G.; BEAUPREZ, J.; et. al. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 3, p. 512-538, 1996.

MALINOWSKI, J. J. Reactive extraction for downstream separation of 1,3-propanediol. **Biotechnology Progress**, v.16, p. 76–79, 2000.

MALINOWSKI, J. J. Evaluation of liquid extraction potentials for downstream separation of 1,3-propanediol. **Biotechnology Technology**, v. 13, p. 127–130, 1999.

MANGAYIL, R.; AHO, T.; KARP, M.; SANTALA, V. Improved bioconversion of crude glycerol to hydrogen by statistical optimization of media components. **Renewable Energy**, v. 75, p. 583-589, 2015.

MARKETS&MARKETS. 1,3-Propanediol Market worth $621.2 Million by 2021. Disponível em:<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/1-3-propanediol-pdo.asp> Acesso em 20/01/2016.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Valorization of Waste Frying Oils and Animal Fats for Biodiesel Production. **Advanced Biofuels and Bioproducts**, v. 28, p. 671-693, 2013.

MEIQ – **Manual econômico da indústria Química.** Produtos orgânicos. v. 1, 8 ed. Camaçari BA, CEPED, 2006, p. 177 – 183; 371-376.

MENDES, A. P. A.; COSTA, R. C. Mercado brasileiro de biodiesel e perspectivas futuras. **Biocombustíveis - BNDES Setorial**, p. 253-280, 2010.

MORANDI, S.; CREMONESI, P.; SILVETTI, T.; CASTIGLIONI, B.; BRASCA, M. Development of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium sporogenes* and *Clostridium tyrobutyricum* in milk. **Anaerobe**, v. 34, p. 44-49, 2015.

MOON, C.; AHN, J. H.; KIM, S. W.; SANG, B.; UM, Y. Effect of Biodiesel-derived Raw Glycerol on 1,3-Propanediol Production by Different Microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 502–510, 2010.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**. p. 639-648, 2009.

MUSCATINE, L. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and Tridacna and its control by the host. **Science**, v. 156, n. 3774, p. 516-519, 1967.

MUSKA, C. F.; ALLES, C. Biobased 1, 3-Propanediol A New Platform Chemical For The 21st Century. In: **BREW Symposium**. 2005.

NAE. Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República – Caderno número 2, – **Biocombustíveis.** Brasília, p. 105-108, 2005. Disponível em: <http://www.sae.gov.br/site/wp-content/uploads/02biocombustiveis.pdf> Acesso em 12/01/2014.

NAKAMURA, C. E.; WHITEDY, G. M. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 454–459, 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US). Committee on Economic and Environmental Impacts of Increasing Biofuels Production. **Renewable fuel standard: the potential economic and environmental effects of US biofuel policy**, National Academies Press, 2011. Disponível em: <http://dels.nas.edu/resources/static-assets/materials-based-on-reports/reports-in-brief/Renewable-Fuel-Standard-Final.pdf>. Acesso em: 06/03/2016.

ONUKI, S.; KOZIEL, J. A.; JENKS, W. S.; CAI, L.; RICE, S.; VAN LEEUWEN, J. H. Ethanol purification with ozonation, activated carbon adsorption, and gas stripping. **Separation and Purification Technology**, v. 151, p. 165-171, 2015.

OTTE, B.; GRUNWALDT, E.; MAHMOUD, O.; JENNEWEIN, S. Genome shuffling in *Clostridium diolis* DSM 15410 for improved 1,3- propanediol production. **Applied Environmental Microbiology**. v. 75 (24), p. 7610–7616, 2009.

PAGLIARO, M.; CIRIMINNA, R.; KIMURA, H.; ROSSI, M.; DELLA, PINA, C. From glycerol to value-added products. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 24, p. 4434-4440, 2007.

PAREKH, M.; FORMANEK, J.; BLASCHEK, H. P. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51 (2), p. 152–157, 1999.

PEREIRA JR. N; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de Bioprocessos. **Séries em Biotecnologia.** Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, v. I, p. 56-57. 2008.

PERRY, G.; GREEN, D. W.; MALONEY, J. O. H. Perry's chemical engineers' handbook, 7ª ed. McGraw-Hill, 1997.

PINTO, B. P.; MOTA, C. J. A. Developments in glycerol byproduct-based biorefineries. **Advances in Biorefineries**: Biomass and Waste Supply Chain Exploitation (Waldron K., ed.), Woodhead publishing, Sawston, Cambridge, UK, p. 364–385, 2014.

PINTO, F. V. BOLETIM MENSAL DO BIODIESEL – ANP Janeiro de 2016. **Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.** 2016.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**. v.33 (4), p. 305–325. 1946.

POSADA, J. A., HIGUITA, J. C., CARDONA, C. A. Optimization on the use of crude glycerol from the biodiesel to obtain poly-3-hydroxybutyrate. **World Renewable Energy Congress**, May 8–13, Linkoping, Sweden, 2011.

POWALOWSKA, D. S. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.18, p. 128–133, 2015.

PRZYSTAŁOWSKA, H.; ZEYLAND, J.; SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, D.; SZALATA, M.; SLOMSKI, R.; LIPINSKI, D. 1, 3-Propanediol production by new recombinant *Escherichia coli* containing genes from pathogenic bacteria. **Microbiological Research**, v. 171, p. 1-7, 2015.

QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. **Renewable Energy**, v. 22(4), p. 557-564, 2001.

QURESHI, N.; SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. **Bioprocess Biosystems Engineering**, n. 30, p. 419–427, 2007.

QURESHI, N.; EZEJI, T. C. Butanol: a superior biofuel production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. **Biofuels Bioprod Biorefining,** v. 2, p. 319-330, 2008.

QURESHI, N.; EZEJI, T. C.; EBENER, J.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; BLASCHEK, H. P. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5915-5922, 2008.

RACINE, F. M., SAHA, B. C. Production of mannitol by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 in fed-batch and continuous cell–recycle fermentations. **Process Biochemistry**, v. 42 (12), p. 1609–1613, 2007.

RENEWABLE ENERGY. Medium-Term Market Report 2015. Disponível em: <https://www.iea.org/Textbase/npsum/MTrenew2015sum.pdf>. Acesso em: 14/05/2016.

RODRIGUES, D. A.; VINHAS, G. M. Uso da glicerina na produção fermentativa de 1,3-propanodiol pelo *Clostridium acetobutyricum* ATCC 4259. XIX CONIC III CONITI VII JOIC CTG – UFPE, 2011.

RODRIGUEZ, A.; WOJTUSIK, RIPOLL, M.; SANTOS, V.; GARCIA-OCHOA, F. 1, 3-Propanediol production from glycerol with a novel biocatalyst *Shimwellia blattae* ATCC 33430: Operational conditions and kinetics in batch cultivations. **Bioresource technology**, v. 200, p. 830-837, 2016.

RODRIGUES, M.I. & IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. **Casa do Pão Editora**, 2005.

ROE, A. J.; O'BYRNE, C., MCLAGGAN, D.; BOOTH, I. R. Inhibition of Escherichia coli growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. **Microbiology**, v. 148, n. 7, p. 2215-2222, 2002.

SABRA, W.; GROEGER, C.; ZENG, A-P. Microbial Cell Factories for Diol Production. In: **Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications I**. Springer Berlin Heidelberg, p. 165-197, 2015.

SAINT-AMANS, S.; PERLOT, P.; GOMA, G.; SOUCAILLE, P. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed- batch system. **Biotechnology Letters**, v. 16 (8), p. 831-836, 1994.

SAINT-AMANS, S.; GIRBAL, L.; ANDRADE, J.; AHRENS, K.; SOUCAILLE, P. Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures. **Journal of Bacteriology**, v. 183 (5), p. 1748–1754, 2001.

SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. **Annals of Microbiology**, v. 64 (3), p. 891-898, 2014.

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

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v. 2, 2001.

SEO, J. W.; SEO, M. Y OH B. R.; HEO, S. Y.; BAEK, J. O.; KIM, C. H.; et. al. Identification and utilization of a 1, 3-propanediol oxidoreductase isoenzyme for production of 1, 3-propanediol from glycerol in *Klebsiella pneumoniae.* **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, (3), p. 659-666, 2010.

SEO, M. Y.; SEO, J. W.; HEO, S. Y.; BAEK, J. O.; RAIRAKHWADA, D.; OH, B. R.; SEO, P.S.; CHOI, M. H.; KIM, C. H. Elimination of by-product formation during production of 1,3- propanediol in *Klebsiella pneumoniae* by inactivation of glycerol oxidative pathway. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 527–534, 2009.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30–39, 2009.

SILVA, G. P.; CONTIERO, J.; ÁVILA NETO, P. M.; LIMA, C. J. B . 1, 3-propanodiol: produção, aplicações e potencial biotecnológico. **Química Nova**, p. 527-534, 2014.

SILVA, G. P.; LIMA, C. J. B.; CONTIERO, J. Production and productivity of 1, 3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. **Catalysis Today**, v. 257, p. 259-266, 2015.

SISTEMA ALICEWEB. Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/> Acesso em 19/01/2016.

SUN J.; VAN DEN HEUVEL J.; SOUCAILLE P.; QU Y.; ZENG A. P. Comparative Genomic Analysis of *dha* Regulon and Related Genes for Anaerobic Glycerol Metabolism in Bacteria. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 263-272, 2003.

SUN, J. N.; RAO, B.; ZHANG, L. Y.; SHEN, Y. L. Extraction of acetoin from fermentation broth using an acetone/phosphate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering Communications**, v. 199, p. 1492–1503, 2012.

SUN, Y.; YAN, L.; FU, H.; XIU, Z. Selection and optimization of a salting-out extraction system for recovery of biobutanol from fermentation broth. **Engineering in Life Sciences**, p. 464-471, 2013.

TANG, X.M., TAN, Y.S., ZHU, H., ZHAO, K., SHEN, W. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1628–1634, 2009.

UBRABIO. **Aprovada urgência para projeto que aumenta biodiesel adicionado ao diesel**. Disponível em: <http://www.ubrabio.com.br/1891/Noticias/AprovadaUrgenciaParaProjetoQueAumentaBiodieselAdicionado_257191/>. Acesso em 03/03/2016.

U.S. DEPARTMENT OF ENERGY. Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I —Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. **Energy Efficiency and Renewable Energy**, 2004. Disponível em: <http://www.osti.gov/scitech/biblio/926125> Acesso em 20/01/2016.

VANE, L. M. Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. **Biofuls, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p. 553-588, 2008.

VASCONCELOS, I.; GIRBAL, L.; SOUCAILLE P. Regulation of carbon electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. **Journal of Bacteriology**, p. 1443-1450, 1994.

VENKATARAMANAN, K. P.; BOATMAN, J.J.; KURNIAWAN, Y.; TACONI, K. A.; BOTHUN, G. D.; SCHOLZ C. Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1325–1335, 2011.

VIANA, Y.A.; FILHO, M.S.G.; SILVA, N.P. Protein stabilization by osmolytes. **Biosciences Journal**, v. 21(2), p. 83-88, 2005.

VILLADSEN, J.; NIELSEN, J.; LIDÉN, G. **Design of Fermentation Processes**. Springer US; p. 74, 528. 2011.

VIVEK, N.; PANDEY, A.; BINOD, P. Biological valorization of pure and crude glycerol into 1, 3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9. 3.3. **Bioresource Technology**, 2016.

VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**, ed. 4, Editora: JOHN WILEY & SONS, INC. 2011.

WANG, Z. X., ZHUGE, J., FANG, H., PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201–223, 2001.

WANG, X.; CHEN, J.; QUINN, P. J. Reprogramming Microbial Metabolic Pathways **Subcellular Biochemistry**, v. 64, p.165-168, 2012.

WANG, Z.; YANG, S. T. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 116-123, 2013.

WANG, Y.; CAI D.; HE M.; WANG Z.; QIN P.; TAN T. Open fermentative production of L-lactic acid using white rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 664–672, 2015.

WARNECKE, T.; GILL, R. T. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, p. 25, 2005.

WATSON, J. D. **The secret of life.** New York: Alfred Knopf. p. 85-94. 2003.

WEI, B. C.; SONG, Z. Y.; SUN, Y. Q.; XIU, Z. L. Salting-out extraction of lactic acid from fermentation broths. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 12, p. 44–48, 2012.

WELSH, D.T. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 263-290, 2000.

WHITE, D. **The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**, New York: Oxford University Press, Inc.; 1995.

WILKENS, E.; RINGEL, A. K.; HORTIG, D.; WILLKE, T.; VORLOP, K. D. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1057-1063, 2012.

WISCHRAL, D.; BARCELOS, C. A.; PEREIRA, N.; PESSOA, F. L. P. 1,3-propanediol: Statistical optimization of medium to improve production by *Clostridium beijerinckii* DSM 791. **Journal of Advances in Biotechnology**, v. 5(2), p. 614-623, 2015.

WISCHRAL, D.; ZHANG, J.; CHENG, C.; LIN, M.; DE SOUZA, L. M.; PESSOA, F. L.; PEREIRA, N.; YANG, S.T. Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 100-110, 2016.

XIU, Z. L.; ZHANG, D.; LI, X. Recovery of 1,3-propanediol from fermentation broths by using ammonium sulfate salting out, Chinese Patent, 2006101346958, 2007a.

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

XIU, Z. L.; LI, Z.; JIANNG, B.; SUN, Y.; ZHANG, D. Aqueous two-phase extraction of 1,3-propanediol from fermentation broth, Chinese Patent, 200710010201.X, 2007.

XU, M.; ZHAO, J.; YU, L.; TANG, I. C.; XUE, C.; YANG, S. T. Engineering Clostridium acetobutylicum with a histidine kinase knockout for enhanced n-butanol tolerance and production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 1011-1022, 2015.

XU, Y.Z.; GUO, N.N.; ZHENG, Z. M.; OU, X. J.; LIU, H. J., LIU, D.H. Metabolism in 1, 3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 5, p. 965-972, 2009.

XUE, C.; ZHAO, J.; LIU, F.; LU, C.; YANG, S. T.; BAI, F. W. Two-stage in situ gas stripping for enhanced butanol fermentation and energy-saving product recovery. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 396-402, 2013.

YANG, S. T.; ZHAO, J. **Adaptive engineering of Clostridium for increased butanol production**. U.S. Patent n. 8,450,093, 28 mai 2013.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 213–219, 2007.

YU, M.; DU, Y.; JIANG, W.; CHANG, W. L.; YANG, S. T.; TANG, I. C. Effects of different replicons in conjugative plasmids on transformation efficiency, plasmid stability, gene expression and n-butanol biosynthesis in *Clostridium tyrobutyricum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 881-889, 2012.

YU, L. **Metabolic Engineering of Clostridium tyrobutyricum for Enhanced n-Butanol Production and Sugar Utilization**. 2015. Tese - The Ohio State Biochemistry Program. Columbus, 2015.

YU, L.; ZHAO, J.; XU, M.; DONG, J.; VARGHESE, S.; YU, M., TANG, C.; YANG, S. T. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production: effects of CoA transferase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99, p. 4917–4930, 2015.

YUAN, M. H.; CHEN, Y. H.; TSAI, J. Y.; CHANG, C. Y. Removal of ammonia from wastewater by air stripping process in laboratory and pilot scales using a rotating packed bed at ambient temperature. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, p. 13-47, 2016.

ZENG, A. P.; BIEBL, H.; DECKWER, W. D. Microbial conversion of glycerol to 1, 3-propanediol: recent progress. **Fuels and Chemicals from Biomass**, 1997.

ZENG, A. P.; BIEBL, H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1, 3-propanediol production and the new trends. In: **Tools and Applications of Biochemical Engineering Science**, Springer Berlin Heidelberg, p. 239-259, 2002.

ZHANG, Y.; HUANG, Z.; DU, C.; LI, Y.; CAO, Z. A. Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. **Metabolic Engineering**, v.31, n. 11, p. 101-106, 2009.

ZHAO, L.; ZHENG, Y.; MA, X.; WIE; D. Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1, 3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into 1, 3-propandediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 3, p. 313-320, 2009.

ZHENG, P.; WEREATH, K.; WEREATH, P.; SUN, J.; VAN DEN HEUVEL, J.; ZENG, A. P. Overexpression of genes of the dha regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1, 3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 2160-2169, 2006.

ZHU, C.; FANG, B. Application of a two-stage temperature control strategy to enhance 1,3-propanediol productivity by *Clostridium butyricum*. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**, p. 853–857, 2013.

ZHU, J.G.; LI, S.; JI, X. J.; HUANG, H.; HU, N. Enhanced 1, 3-propanediol production in recombinant *Klebsiella pneumoniae* carrying the gene *yqhD* encoding 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1217–1223, 2009.

APÊNDICE A - Sequência original de DNA de *glda*, para o aumento de expressão da glicerol dehidrogenase, gene usado na construção do plasmídeo pMTL82151-gldA-dhaKLM (em amarelo).

AGGGCGGAGACGGCATTCGTACGGTTCAGGAGCTGCAAACGCTGTTAGAAATGCACGCGCCAG
AAAGCATGGTGCTGGCAGCCAGCTTTAAAACGCCGCGTCAGGCGCTGGACTGTTTACTGGCAGG
ATGTGAATCCATCACCCTGCCCTTAGATGTAGCGCAACAAATGCTCAACACCCCTGCGGTAGAGT
CAGCTATAGAGAAGTTCGAACACGACTGGAATGCCGCATTTGGCACTACTCATCTCTAAAGGAGC
AATTATGGACCGCATTATTCAATCACCGGGTAAATACATCCAGGGCGCTGATGTGATTAATCGTCT
GGGCGAATACCTGAAGCCGCTGGCAGAACGCTGGTTAGTGGTGGGTGACAAATTTGTTTTAGGT
TTTGCTCAATCCACTGTCGAGAAAAGCTTTAAAGATGCTGGACTGGTAGTAGAAATTGCGCCGTTT
GGCGGTGAATGTTCGCAAAATGAGATCGACCGTCTGCGTGGCATCGCGGAGACTGCGCAGTGT
GGCGCAATTCTCGGTATCGGTGGCGGAAAAACCCTCGATACTGCCAAAGCACTGGCACATTTCAT
GGGTGTTCCGGTAGCGATCGCACCGACTATCGCCTCTACCGATGCACCGTGCAGCGCATTGTCT
GTTATCTACACCGATGAGGGTGAGTTTGACCGCTATCTGCTGTTGCCAAATAACCCGAATATGGT
CATTGTCGACACCAAAATCGTCGCTGGCGCACCTGCACGTCTGTTAGCGGCGGGTATCGGCGAT
GCGCTGGCAACCTGGTTTGAAGCGCGTGCCTGCTCTCGTAGCGGCGCGACCACCATGGCGGGC
GGCAAGTGCACCCAGGCTGCGCTGGCACTGGCTGAACTGTGCTACAACACCCTGCTGGAAGAA
GGCGAAAAAGCGATGCTTGCTGCCGAACAGCATGTAGTGACTCCGGCGCTGGAGCGCGTGATT
GAAGCGAACACCTATTTGAGCGGTGTTGGTTTTGAAAGTGGTGGTCTGGCTGCGGCGCACGCAG
TGCATAACGGCCTGACCGCTATCCCGGACGCGCATCACTATTATCACGGTGAAAAAGTGGCATTC
GGTACGCTGACGCAGCTGGTTCTGGAAAATGCGCCGGTGGAGGAAATCGAAACCGTAGCTGCC
CTTAGCCATGCGGTAGGTTTGCCAATAACTCTCGCTCAACTGGATATTAAAGAAGATGTCCCGGC
GAAAATGCGAATTGTGGCAGAAGCGGCATGTGCAGAAGGTGAAACCATTCACAACATGCCTGGC
GGCGCGACGCCAGATCAGGTTTACGCCGCTCTGCTGGTAGCCGACCAGTACGGTCAGCGTTTCC
TGCAAGAGTGGGAATAACCTACTCCAAACTCCCGGCTTGTCCGGGAGTTTGAACGCAAAATTGCC
TGATGCGCTACGCTTATCAGGCCTACGCAATCTCTGCAATATATTGAATTTGCGTGCTTTTGTAGG
CCGGATAAGGCGTTCACTCCGCATCCGGCACTCTGTGCCAGTAATCTGAAACTCCCACGTTGTTC
AGGAATTTTTTATCCGCTTCTGGACATTTTCTCTACAGAACAATCGTTAGCCCGGAAGGTCGAATC
TGTGACTCTTATTTTCACGGACGAACCAGATGAAAGCTTCACTGGCGCTGCTCAGCCTGCTAA

APÊNDICE B - Sequência original de DNA de *dhaKLM*, para o aumento de expressão da dihidroxiacetona quinase, gene usado na construção do plasmídeo pMTL82151-gldA-dhaKLM (em amarelo).

AGTTTCAATATGGAACATTCATTAAAGCATATGTTTCACTATGAAACATAATTTGGGCTAATTTTCTT
TTCCCTTGCCTGATGCACAATGGATTCATCGGCAGTCAGTGGTCGCCGTGTCGTTGAACATCATC
CATGCCCTACCGTAATTGCTGGAGCAAAATAATGAAAAAATTGATCAATGATGTGCAAGACGTACT
GGACGAACAACTGGCAGGACTGGCGAAAGCGCATCCATCGCTGACACTGCATCAGGATCCGGT
GTATGTCACCCGAGCTGATGCCCCTGTTGCAGGAAAAGTCGCCCTGCTGTCGGGTGGCGGCAG
CGGACACGAGCCGATGCACTGTGGTTATATCGGTCAGGGGATGCTTTCGGGGGCCTGTCCGGG
CGAAATTTTCACCTCACCGACGCCCGATAAAATCTTTGAATGCGCCATGCAAGTTGATGGCGGCG
AAGGTGTACTGTTGATTATCAAAAATTACACCGGCGATATTCTTAACTTTGAAACAGCGACCGAGT
TACTGCACGATAGCGGCGTAAAAGTGACCACTGTGGTCATTGATGACGACGTTGCGGTAAAAGA
CAGTCTTTATACTGCCGGGCGACGCGGCGTTGCCAACACCGTATTAATTGAAAAACTCGTAGGCG
CAGCGGCGGAGCGTGGCGACTCACTGGACGCCTGTGCGGAACTGGGGCGTAAGCTGAATAATC
AAGGCCACTCAATAGGTATCGCTCTCGGTGCCTGTACCGTTCCTGCCGCGGGCAAACCTTCTTTT
ACCCTGGCGGATAATGAGATGGAGTTTGGCGTCGGCATTCATGGTGAGCCGGGTATTGACCGCC
GCCCCTTCTCTTCCCTTGATCAAACCGTCGATGAAATGTTCGACACCCTGCTGGTAAATGGCTCA
TACCATCGCACTTTGCGTTTCTGGGATTATCAACAAGGCAGTTGGCAGGAAGAACAACAAACCAA
ACAACCGCTCCAGTCTGGCGATCGGGTGATTGCGCTGGTTAACAATCTTGGCGCAACTCCGCTTT
CTGAGCTGTACGGCGTCTATAACCGCCTGACCACACGTTGCCAGCAAGCGGGATTGACTATCGA
ACGTAATTTAATTGGCGCGTACTGCACCTCACTGGATATGACCGGTTTCTCAATCACCTTACTGAA
AGTTGATGACGAAACGCTGGCACTCTGGGACGCCCCGGTCCACACCCCGGCCCTTAACTGGGG
TAAATAAGGAGAAAGCAATGTCACTGAGCAGAACTCAAATTGTTAACTGGCTCACTCGTTGTGGC
GATATTTTCAGCACCGAGAGCGAGTATCTTACCGGACTGGATCGCGAAATTGGCGATGCTGACCA
CGGGCTAAATATGAACCGAGGCTTTAGCAAAGTGGTGGAAAAACTCCCTGCTATCGCAGATAAAG
ATATCGGTTTCATTCTCAAGAATACCGGTATGACGCTGCTTTCCAGCGTCGGTGGTGCCAGTGGT
CCGCTGTTCGGTACCTTCTTTATCCGCGCCGCACAGGCGACCCAGGCACGGCAAAGCCTGACAC
TGGAAGAGCTTTATCAGATGTTCCGCGATGGCGCGGACGGCGTAATCAGTCGCGGGAAAGCCGA
ACCTGGCGATAAAACCATGTGTGATGTGTGGGTGCCGGTGGTGGAATCGTTACGTCAGTCCAGC
GAGCAAAATCTCTCTGTTCCGGTGGCGCTCGAAGCTGCCAGTAGCATCGCCGAATCCGCTGCAC
AAAGTACGATTACGATGCAAGCCCGCAAAGGCCGCGCCAGTTATCTCGGTGAACGCAGTATTGG
TCACCAGGATCCCGGCGCGACCTCGGTGATGTTTATGATGCAAATGTTGGCGTTAGCCGCAAAA
GAGTAAGGAATTGGTGATGGTAAACCTGGTCATAGTTTCACATAGCAGCCGACTGGGAGAAGGT
GTCGGTGAATTAGCCCGTCAGATGTTAATGAGTGATAGTTGTAAAATCGCCATTGCCGCGGGAAT
TGACGATCCACAAAATCCCATTGGTACCGATGCCGTCAAAGTGATGGAGGCCATCGAATCTGTTG
CTGATGCCGACCATGTGCTGGTCATGATGGATATGGGTAGCGCATTATTGAGTGCTGAAACTGCG
CTGGAATTGCTGGCTCCCGAGATCGCCGCAAAAGTACGTTTGTGTGCTGCGCCGTTGGTCGAAG
GTACACTGGCAGCAACGGTCAGCGCGGCCTCGGGGGCGGATATCGACAAAGTTATCTTTGACGC
CATGCATGCGCTGGAAGCCAAACGTGAACAACTGGGTTTACCGTCCTCCGACACTGAAATCTCTG

ACACATGTCCTGCGTACGATGAAGAAGCCCGTTCTCTGGCGGTGGTCATAAAAAACCGTAACGG
CCTGCATGTACGTCCGGCCTCCCGGCTGGTTTATACCTTATCGACATTTAATGCCGATATGTTGC
TGGAAAAAAACGGCAAATGCGTCACACCAGAGAGTATTAACCAGATTGCGTTACTACAAGTTCGC
TATAACGATACGCTGCGCCTGATTGCGAAAGGGCCAGAAGCTGAAGAGGCACTGATCGCTTTCC
GTCAGCTGGCTGAAGATAACTTTGGTGAAACGGAGGAAGTCGCTCCACCTACTCTGCGTCCCGT
TCCGCCTGTTTCGGGTAAAGCCTTTTATTATCAACCAGTTTTATGTACGGTACAGGCAAAATCAAC
CCTGACCGTGGAAGAAGAACAAGATCGATTACGCCAGGCTATTGACTTCACGTTATTAGATCTGA
TGACGTTAACAGCGAAAGCAGAAGCCAGCGGGCTTGACGATATTGCCGCAATCTTTTCTGGTCAC
CATACACTGTTAGATGATCCGGAACTGCTGGCGGCGGCAAGCGAACTCCTTCAGCATGAACATT
GCACGGCAGAATATGCCTGGCAGCAAGTTCTTAAAGAACTTAGCCAGCAATACCAGCAACTGGAT
GATGAATATCTACAAGCTCGCTATATTGATGTGGACGATCTTCTGCATCGCACCCTGGTCCACCT
GACCCAAACGAAAGAAGAACTCCCGCAGTTTAACTCGCCAACTATTCTACTGGCGGAGAACATTT
ATCCTTCCACAGTACTGCAACTGGATCCGGCGGTTGTAAAAGGTATCTGCCTTAGCGCCGGAAGT
CCGGTATCCCACAGCGCCCTAATCGCCCGTGAACTGGGGATTGGCTGGATTTGCCAGCAGGGTG
AGAAACTGTATGCGATACAACCAGAAGAAACGCTAACGCTGGACGTTAAAACGCAACGTTTCAAC
CGTCAGGGTTAA

APÊNDICE C - Sequência original de DNA do plasmídeo pMTL82151

GGGCCCGATCGGTCTTGCCTTGCTCGTCGGTGATGTACTTCACCAGCTCCGCGAAGTCGCTCTT
CTTGATGGAGCGCATGGGGACGTGCTTGGCAATCACGCGCACCCCCCGGCCGTTTTAGCGGCT
AAAAAAGTCATGGCTCTGCCCTCGGGCGGACCACGCCCATCATGACCTTGCCAAGCTCGTCCTG
CTTCTCTTCGATCTTCGCCAGCAGGGCGAGGATCGTGGCATCACCGAACCGCGCCGTGCGCGG
GTCGTCGGTGAGCCAGAGTTTCAGCAGGCCGCCCAGGCGGCCCAGGTCGCCATTGATGCGGGC
CAGCTCGCGGACGTGCTCATAGTCCACGACGCCCGTGATTTTGTAGCCCTGGCCGACGGCCAG
CAGGTAGGCCGACAGGCTCATGCCGGCCGCCGCCGCCTTTTCCTCAATCGCTCTTCGTTCGTCT
GGAAGGCAGTACACCTTGATAGGTGGGCTGCCCTTCCTGGTTGGCTTGGTTTCATCAGCCATCC
GCTTGCCCTCATCTGTTACGCCGGCGGTAGCCGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTGA
GCACCGCCAGGTGCGAATAAGGGACAGTGAAGAAGGAACACCCGCTCGCGGGTGGGCCTACTT
CACCTATCCTGCCCGGCTGACGCCGTTGGATACACCAAGGAAAGTCTACACGAACCCTTTGGCA
AAATCCTGTATATCGTGCGAAAAAGGATGGATATACCGAAAAAATCGCTATAATGACCCCGAAGC
AGGGGGCCCTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGT
TCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG
GATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCG
CGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGT
CAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG
TGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAG
CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGC
TGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCT
TGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTA
GAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTAC
GCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGA
ACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGAGTTTAAACTTAGGGTAAC
AAAAAACACCGTATTTCTACGATGTTTTTGCTTAAATACTTGTTTTTAGTTACAGACAAACCTGAAG
TTAACTATTTATCAATTCCTGCAATTCGTTTACAAAACGGCAAATGTGAAATCCGTCACATACTGCG
TGATGAACTTGAATTGCCAAAGGAAGTATAATTTTGTTATCTTCTTTATAATATTTCCCCATAGTAAA
AATAGGAATCAAATAATCATATCCTTTCTGCAAATTCAGATTAAAGCCATCGAAGGTTGACCACGG
TATCATAGATACATTAAAAATGTTTTCCGGAGCATTTGGCTTTCCTTCCATTCTATGATTGTTTCCA
TACCGTTGCGTATCACTTTCATAATCTGCTAAAAATGATTTAAAGTCAGACTTACACTCAGTCCAAA
GGCTGGAAAATGTTTCAGTATCATTGTGAAATATTGTATAGCTTGGTATCATCTCATCATATATCCC
CAATTCACCATCTTGATTGATTGCCGTCCTAAACTCTGAATGGCGGTTTACAATCATTGCAATATA
ATAAAGCATTGCAGGATATAGTTTCATTCCCTTTTCCTTTATTTGTGTGATATCCACTTTAACGGTC
ATGCTGTAGGTACAAGGTACACTTGCAAAGTAGTGGTCAAAATACTCTTTTCTGTTCCAACTATTTT
TATCAATTTTTTCAAATACCATCTAAGTTCCCTCTCAAATTCAAGTTTATCGCTCTAATGAACAAAG
ATATTATACCACATTTTTGTGAATTTTTCAACTTGCCCACTGGCCGGCCGAATTTGTAAATAAACCA
CAAACTATTAAAGTTAAACATAAAAATAACATCGAAAACCTTTTTTTCATAAATTTTTATCCCCCTAA
TTTTTGATAGTTTGCTATAAAATTTAAACAAACACTTCCTTTCTTTATATTTATGTAAAATTTTGTCTA
CATTAAAAATATTCTACATATTCCCGTTATGTCCTTTTTATGGTAACATAAATTTAATAAAAAGGAGG
CCAATAATGAAATTTAAAAAGATAATCCTATATATTTTTATAGTTATAATTCCTTTAAGTATAACTGG
TTGTTCGATTAATCAAATTACAACACCAGTTCCCAAAAATTATTTAGATAATATAGTAAAAAAATATG
TTGGACCAGAAGGAGTACAACCTTCTTTTGGTGGTAAAACTTTTTATGATTATAAAATAATAGATTC
AGAAAAAAGTAAAAATATAATAAAAATATATTTATACTATATAGGTCAAGAATATTATATTGAAGATG
ATAAACTAGTTGAAGGAACAGGTTCAGCTTCTTTTGCAACTGTTACAATTAAAAAAGAAAATAATAA
TTATAAATTAGTAAGTTATGAAGTTCCAAAATCACCGGCGCAAGAAGATACTGTTAAAATATTTCCT
AAGTCTGTTAGAAAAAAGGCAATTCATGCAAATACTCCTTCTTTAAAAAATATTGAAAAAGAGGCT
GAAACTTATTTTAAAAAAGAACTAAAAACTAAAAATTAAAAAAATTAATAAAGAAAATAAAAAACAAC
AACCTAATAGGCTGTTGTTTTTTATTTTTTTAATCATATATATATAAAGTATAGTTACACTTTAATCTA
TTTCTATTTCATCTATTAAATCTTGATTTAATTCTTCTTTTTCATCTTCCGTAAGTTCCCTTATTCTAG
TTTTTTCATATTGTTTTTTGCACCAATTATAATAAACTATATAGACATATTTAATTTCATCTTTCTTTT
TATAAACATCAAGTTTTCCTTGCTTGTACAATTTGTGTGCATCTTTAAAAAATCCACTAAAAACTAAT
ACCTGCTTGCCTTTTAATGCTTTATAAAAAATTTCAAATACTGGCCTCGATATTAAATAATCAGTGT
CTTTAGCTGAATATTTCGCAAGTTCGTAAACCTCTTTATAATCATTAATTTTTGCTTTTCTAACATCA
ACTTGAGTTATAGAATCATCCTTAGTAGCAAACTTCCATAATTCCAACCATCTTTCTCGATTTATAT
AATAATTTTTATCTGTAAAATAACTTTTATTAACTGCAATAACTACATGAAAATGAGGATTATAAGTA

TCAAAATTAGGTTCTAAATCACCAATTTCAAGTCCTTTTTTTTGATAATAATCTTTTTTTATTTTCCAT
AAATCCTTTGTTATGTATTTTTCCTTTTGGTAAGTTACTTCTAATTTTCTTATATAACCTTTAGTTATA
TCCTTAACTTCCTTACGCTCCATTAATTTTTTAAAAGATTTATTATATTGTTTAATAGAATAATTAAGA
TCATAACTTTTTACATTTGGAGTTGTAAGAGTTAAAAATATAAACTCTTTATTTTCTTCTTTTCTTAAA
TGCTCCATAAGAATAGATATTTCTAAACTATCCTTACAAGCAAGTCGCCAACTACACATTGGACAA
AATCTATTACCGCAAAAATTACCTTTATGTAATTTAAAATGTTCTAAGTCTGCATCACTCAACATAAA
CAAATAATCTCCACAAGTGGAAGTCCTTTCAATATTTTTCTTAGTAGTTAAAGGTGCTATGTATGAC
GTAAATCTAGGATTTTTTCTTTTTTTATCAGTACATTTCTCTAAAGCAGTTTTTACCTCTTGTTTATTT
TCATTTTTTTGATTATAATTAGTCATATAACGAAATAGAATTTTAAAAGGAAAAATTTTTCCTTATTAA
AAAACTTGCTCCTTTCCTGGTAAATTATACTTTTAAACTCGACACTTAAAATTATAAATTACTAGGTA
GAAAAATGCAAGTTTTTTGTTTTTTAACCATTGATTTTACTAGCTTAATTGACAATGAAGTCAAATC
GAAAATAGTTACGTATAGTATCAAGAATGAAGAAACTCCTCCGGAGTTTTAAAAAAAAGGGGCTAA
AAAGCCCCTTTTTATATTTCAAAAACAAAAGTGAACAGAAGATTCTATAGGTATCGAGATAGCCAA
TAGAAAAAATATATTAAATTAAACTACCAATCAATTTCAAAACCATTTGAACTCATTTTAGGCTCTTT
TAACGCATTTTCTTTTTCATTAGCACATTTTATATACACGTCTTCATTAAATGCCTTAGAATCCATTA
CAGACTTATCCAGGGTGCTATCTTCGTCATAGTTACCTGTTGAACCATTAGCTAAGGATTCAGAAC
GGCGCGCCATAAAAATAAGAAGCCTGCAAATGCAGGCTTCTTATTTTTATGCTAGCGCCATTCGC
CATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCT
GGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
CGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTCTGAATATTCAGCGAAAATAGTATATTATATAATTA
TAAATTGATGAATAGCTAGAGTGGTCAGACCTCCTAGCTATTGTTTTAGAAAACTTTGTGTTTTTTT
TAACAAAAATATTGATAAATTTTTAATTATCTAGTATAATGAAGTTGTTGGTAAAAAGGTTTGTAATC
AATTTAAATTTGGATCCAGGAGGAGGAGCAATTATGGACCGCATTATTCAATCACCGGGTAAATAC
ATCCAGGGCGCTGATGTGATTAATCGTCTGGGCGAATACCTGAAGCCGCTGGCAGAACGCTGGT
TAGTGGTGGGTGACAAATTTGTTTTAGGTTTTGCTCAATCCACTGTCGAGAAAAGCTTTAAAGATG
CTGGACTGGTAGTAGAAATTGCGCCGTTTGGCGGTGAATGTTCGCAAAATGAGATCGACCGTCT
GCGTGGCATCGCGGAGACTGCGCAGTGTGGCGCAATTCTCGGTATCGGTGGCGGAAAAACCCT
CGATACTGCCAAAGCACTGGCACATTTCATGGGTGTTCCGGTAGCGATCGCACCGACTATCGCC
TCTACCGATGCACCGTGCAGCGCATTGTCTGTTATCTACACCGATGAGGGTGAGTTTGACCGCTA
TCTGCTGTTGCCAAATAACCCGAATATGGTCATTGTCGACACCAAAATCGTCGCTGGCGCACCTG
CACGTCTGTTAGCGGCGGGTATCGGCGATGCGCTGGCAACCTGGTTTGAAGCGCGTGCCTGCT
CTCGTAGCGGCGCGACCACCATGGCGGGCGGCAAGTGCACCCAGGCTGCGCTGGCACTGGCT
GAACTGTGCTACAACACCCTGCTGGAAGAAGGCGAAAAAGCGATGCTTGCTGCCGAACAGCATG
TAGTGACTCCGGCGCTGGAGCGCGTGATTGAAGCGAACACCTATTTGAGCGGTGTTGGTTTTGA
AAGTGGTGGTCTGGCTGCGGCGCACGCAGTGCATAACGGCCTGACCGCTATCCCGGACGCGCA
TCACTATTATCACGGTGAAAAAGTGGCATTCGGTACGCTGACGCAGCTGGTTCTGGAAAATGCGC
CGGTGGAGGAAATCGAAACCGTAGCTGCCCTTAGCCATGCGGTAGGTTTGCCAATAACTCTCGC
TCAACTGGATATTAAAGAAGATGTCCCGGCGAAAATGCGAATTGTGGCAGAAGCGGCATGTGCA
GAAGGTGAAACCATTCACAACATGCCTGGCGGCGCGACGCCAGATCAGGTTTACGCCGCTCTGC
TGGTAGCCGACCAGTACGGTCAGCGTTTCCTGCAAGAGTGGGAATAAccAGGAGGGAGCAAAATA
ATGAAAAAATTGATCAATGATGTGCAAGACGTACTGGACGAACAACTGGCAGGACTGGCGAAAGC
GCATCCATCGCTGACACTGCATCAGGATCCGGTGTATGTCACCCGAGCTGATGCCCCTGTTGCA
GGAAAAGTCGCCCTGCTGTCGGGTGGCGGCAGCGGACACGAGCCGATGCACTGTGGTTATATC
GGTCAGGGGATGCTTTCGGGGGCCTGTCCGGGCGAAATTTTCACCTCACCGACGCCCGATAAAA
TCTTTGAATGCGCCATGCAAGTTGATGGCGGCGAAGGTGTACTGTTGATTATCAAAAATTACACC
GGCGATATTCTTAACTTTGAAACAGCGACCGAGTTACTGCACGATAGCGGCGTAAAAGTGACCAC
TGTGGTCATTGATGACGACGTTGCGGTAAAAGACAGTCTTTATACTGCCGGGCGACGCGGCGTT
GCCAACACCGTATTAATTGAAAAACTCGTAGGCGCAGCGGCGGAGCGTGGCGACTCACTGGACG
CCTGTGCGGAACTGGGGCGTAAGCTGAATAATCAAGGCCACTCAATAGGTATCGCTCTCGGTGC
CTGTACCGTTCCTGCCGCGGGCAAACCTTCTTTTACCCTGGCGGATAATGAGATGGAGTTTGGC
GTCGGCATTCATGGTGAGCCGGGTATTGACCGCCGCCCCTTCTCTTCCCTTGATCAAACCGTCG
ATGAAATGTTCGACACCCTGCTGGTAAATGGCTCATACCATCGCACTTTGCGTTTCTGGGATTATC
AACAAGGCAGTTGGCAGGAAGAACAACAAACCAAACAACCGCTCCAGTCTGGCGATCGGGTGAT
TGCGCTGGTTAACAATCTTGGCGCAACTCCGCTTTCTGAGCTGTACGGCGTCTATAACCGCCTGA
CCACACGTTGCCAGCAAGCGGGATTGACTATCGAACGTAATTTAATTGGCGCGTACTGCACCTCA
CTGGATATGACCGGTTTCTCAATCACCTTACTGAAAGTTGATGACGAAACGCTGGCACTCTGGGA
CGCCCCGGTCCACACCCCGGCCCTTAACTGGGGTAAATAAGGAGAAAGCAATGTCACTGAGCAG
AACTCAAATTGTTAACTGGCTCACTCGTTGTGGCGATATTTTCAGCACCGAGAGCGAGTATCTTAC
CGGACTGGATCGCGAAATTGGCGATGCTGACCACGGGCTAAATATGAACCGAGGCTTTAGCAAA
GTGGTGGAAAAACTCCCTGCTATCGCAGATAAAGATATCGGTTTCATTCTCAAGAATACCGGTAT

GACGCTGCTTTCCAGCGTCGGTGGTGCCAGTGGTCCGCTGTTCGGTACCTTCTTTATCCGCGCC
GCACAGGCGACCCAGGCACGGCAAAGCCTGACACTGGAAGAGCTTTATCAGATGTTCCGCGATG
GCGCGGACGGCGTAATCAGTCGCGGGAAAGCCGAACCTGGCGATAAAACCATGTGTGATGTGT
GGGTGCCGGTGGTGGAATCGTTACGTCAGTCCAGCGAGCAAAATCTCTCTGTTCCGGTGGCGCT
CGAAGCTGCCAGTAGCATCGCCGAATCCGCTGCACAAAGTACGATTACGATGCAAGCCCGCAAA
GGCCGCGCCAGTTATCTCGGTGAACGCAGTATTGGTCACCAGGATCCCGGCGCGACCTCGGTG
ATGTTTATGATGCAAATGTTGGCGTTAGCCGCAAAAGAGTAAGGAATTGGTGATGGTAAACCTGG
TCATAGTTTCACATAGCAGCCGACTGGGAGAAGGTGTCGGTGAATTAGCCCGTCAGATGTTAATG
AGTGATAGTTGTAAAATCGCCATTGCCGCGGGAATTGACGATCCACAAAATCCCATTGGTACCGA
TGCCGTCAAAGTGATGGAGGCCATCGAATCTGTTGCTGATGCCGACCATGTGCTGGTCATGATG
GATATGGGTAGCGCATTATTGAGTGCTGAAACTGCGCTGGAATTGCTGGCTCCCGAGATCGCCG
CAAAAGTACGTTTGTGTGCTGCGCCGTTGGTCGAAGGTACACTGGCAGCAACGGTCAGCGCGGC
CTCGGGGGCGGATATCGACAAAGTTATCTTTGACGCCATGCATGCGCTGGAAGCCAAACGTGAA
CAACTGGGTTTACCGTCCTCCGACACTGAAATCTCTGACACATGTCCTGCGTACGATGAAGAAGC
CCGTTCTCTGGCGGTGGTCATAAAAAACCGTAACGGCCTGCATGTACGTCCGGCCTCCCGGCTG
GTTTATACCTTATCGACATTTAATGCCGATATGTTGCTGGAAAAAAACGGCAAATGCGTCACACCA
GAGAGTATTAACCAGATTGCGTTACTACAAGTTCGCTATAACGATACGCTGCGCCTGATTGCGAA
AGGGCCAGAAGCTGAAGAGGCACTGATCGCTTTCCGTCAGCTGGCTGAAGATAACTTTGGTGAA
ACGGAGGAAGTCGCTCCACCTACTCTGCGTCCCGTTCCGCCTGTTTCGGGTAAAGCCTTTTATTA
TCAACCAGTTTTATGTACGGTACAGGCAAAATCAACCCTGACCGTGGAAGAAGAACAAGATCGAT
TACGCCAGGCTATTGACTTCACGTTATTAGATCTGATGACGTTAACAGCGAAAGCAGAAGCCAGC
GGGCTTGACGATATTGCCGCAATCTTTTCTGGTCACCATACACTGTTAGATGATCCGGAACTGCT
GGCGGCGGCAAGCGAACTCCTTCAGCATGAACATTGCACGGCAGAATATGCCTGGCAGCAAGTT
CTTAAAGAACTTAGCCAGCAATACCAGCAACTGGATGATGAATATCTACAAGCTCGCTATATTGAT
GTGGACGATCTTCTGCATCGCACCCTGGTCCACCTGACCCAAACGAAAGAAGAACTCCCGCAGT
TTAACTCGCCAACTATTCTACTGGCGGAGAACATTTATCCTTCCACAGTACTGCAACTGGATCCG
GCGGTTGTAAAAGGTATCTGCCTTAGCGCCGGAAGTCCGGTATCCCACAGCGCCCTAATCGCCC
GTGAACTGGGGATTGGCTGGATTTGCCAGCAGGGTGAGAAACTGTATGCGATACAACCAGAAGA
AACGCTAACGCTGGACGTTAAAACGCAACGTTTCAACCGTCAGGGTTAACCGCGGTCATAGCTGT
TTCCTGATAAAAAAATTGTAGATAAAACTATTTTATAAAATTTATCTACAATTTTTTTATCCTGCAGG

ANEXOS

ISSN 2348-6201

1,3-PROPANEDIOL: STATISTICAL OPTIMIZATION OF MEDIUM TO IMPROVE PRODUCTION BY *Clostridium beijerinckii* DSM 791

Daiana Wischral[1], Carolina Araújo Barcelos[1], Nei Pereira Jr[1], Fernando L. Pellegrini Pessoa[2]
[1]Laboratories of Bioprocess Development, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, 21949-900
[2]Chemical Engineering Department, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, 21949-900

ABSTRACT

Biodiesel is a promising alternative biofuel, and as its production increases, so does production of the principal co-product, glycerol. The present study is aimed at maximizing the glycerol consumption and 1,3-propanediol (1,3-PDO) production by *C. beijerinckii* DSM 791, using sequential experimental design methodology for optimization of nutrients concentration for the fermentation medium. Three sequential experimental designs were performed: Plackett-Burman, fractional factorial and central composite rotational. The following nutrients of the medium were evaluated: urea, yeast extract, $C_2H_3NaO_2$, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, glycerol, butyric acid, glucose and $CaCO_3$. Urea, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, butyric acid, glucose and $CaCO_3$ were removed from the medium optimization since they had an insignificant statistical effect on 1,3-PDO production. The optimal concentrations of yeast extract, $C_2H_3NaO_2$, K_2HPO_4 and glycerol predicted by the optimization were as follows (g/l): 0.5, 0.005, 5 and 8, respectively, which were validated experimentally. Desirability function allows the maximization of the 1,3-PDO production and percentage glycerol consumption simultaneously, which resulted in yield of 0.58 mol/mol of 1,3-PDO and 100 % of glycerol consumption. The results showed that the use of sequential experimental design and the use of the desirability function led to the optimization of the 1,3-PDO fermentation by *C. beijerinckii* DSM 791.

Indexing terms/Keywords

1,3-propanediol; Glycerol; *Clostridium beijerinckii* DSM 791; Fractional factorial; Central composite rotatable design.

Academic Discipline And Sub-Disciplines

Biotechnology, Bioprocess Engineering, Design of experiments.

SUBJECT CLASSIFICATION

Biotechnology, Biochemistry, Bioprocess Engineering, Design of experiments, Statistical analysis.

TYPE (METHOD/APPROACH)

Biotechnology, Biochemistry, Bioprocess Engineering, Anaerobic fermentation, Design of experiments, Statistical analysis.

Council for Innovative Research

Peer Review Research Publishing System

Journal: JOURNAL OF ADVANCES IN BIOTECHNOLOGY

Vol .5, No. 2

www.cirworld.com, editor@cirworld.com,
jbt@cirworld.com, www.cirjbt.org

INTRODUCTION

In recent years, concern over the biological production of commercially important metabolites has been growing. This is mainly attributed to escalating global energy and environmental problems, which have led researchers worldwide to devise methods for producing almost everything in a “green” way [1,2]. Of these, the production of biofuels has attracted a great deal of attention [1]. Biodiesel is an alternative fuel that reduces net greenhouse effects and its use has become mandatory in many countries. The main by-product of the biodiesel plant is glycerol, a chemical compound of importance as an end product and as a starting material for other useful products [3].

The production of waste glycerol follows increasing biodiesel production; since the stoichiometry of the reaction dictates that for each 100 kg of biodiesel approximately 10 kg of glycerol is produced [4, 5]. The surplus of glycerol coming from biodiesel fabrication has increased enormously, representing about 65 % of the world’s glycerol production [3]. Compared to direct application and chemical transformation, microbial conversion of waste glycerol is a viable alternative without certain disadvantages, such as low product specificity, high energy input (pressure/temperature), intensive pretreatment requirements and/or release of environmentally toxic intermediate compounds [2, 4, 5]. In addition, compared to conventional biorefinery substrates, such as glucose and sucrose, waste glycerol presents a class of substrates that are inexpensive, sustainable, and not considered a suitable human food source [4, 5]. Moreover, bioprocess should be periodically reviewed and incorporate to technological innovations in order to increase their performance and lucrativeness [6].

Glycerol is the natural substrate for microbial production of 1,3-propanediol (1,3-PDO). First the glycerol is dehydrated to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) by glycerol dehydratase. Then the product of dehydration reaction, 3-HPA, is reduced to 1,3-PDO by an NAD-dependent oxidoreductase [7, 8]. Since 50% of the entire cost of microbial production of 1,3-PDO is due to the price of raw materials, waste glycerol from biodiesel production processes may be an interesting renewable carbon source for microorganisms that produce 1,3-PDO [9]. 1,3-PDO can be successfully produced fermentatively from glycerol by bacteria of *Enterobacteriaceae* and *Clostridiaceae* families, mainly *Klebsiella* spp., *Clostridium* spp. [5, 7, 10] and *E. coli* modified [11].

1,3-PDO is a bifunctional organic compound that could potentially be used for many synthesis reactions, in particular as a monomer for polycondensations to produce polyesters, polyethers and polyurethanes [7]. Products obtained by 1,3-PDO polymerization are characterized by good biodegradability, better specificity and higher industrial safety, in addition to being cheaper than those based on 1,2-propanediol, ethylene glycol or butanediol [4]. It has a number of other interesting applications in addition to that of polymer constituent, for example, synthesis of polytrimethylene terephthalate (PTT) that in turn can be used to make carpets (CorterraW, Shell), special textile fibers (SoronaW, DuPont), monofilaments, films, and nonwoven fabrics [12]. Furthermore, 1,3-PDO can improve the properties of solvents, adhesives, laminates, resins, detergents and cosmetics [13]. Therefore, this work is aimed at optimizing the fermentation medium to improve glycerol consumption and 1,3-PDO production by *C. beijerinckii* DSM 791 using sequential experimental design methodology.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and culture medium

C. beijerinckii DSM 791 was obtained from the Leibniz-Institut DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures and was maintained in microtubes at -80 °C on Reinforced Clostridial Medium (RCM) [14] with 30 % (v/v) of glycerol. Cellular growth was performed in two steps. First, the cells were cultured anaerobically in a rotary shaker (New Brunswick Scientific – Edison N. J., USA) at 37ºC, initial pH 6.5 and 80 rpm. The medium used for pre-culture and inoculum contained (g/l): peptone, 10; beef extract, 10; yeast extract, 3; NaCl, 3; cysteine, 0.5; $C_2H_3NaO_2$, 3; agar, 0.5; and glycerol, 5. The medium was reduced with nitrogen gas and sterilized before inoculation. Then the pre-culture, inoculum and fermentation medium were grown anaerobically in 100 mL flasks, containing 70 mL of medium, at 37 °C and 80 rpm. The pre-culture and inoculum times were respectively 16 h and 9 h, determinate in previous experiments. The inoculum culture was initialized with 10 % (v/v) from pre-culture medium and the fermentation medium with 20 % (v/v) from inoculum culture.

Optimization of the fermentation medium for 1,3-PDO production

A strategy of three sequential experimental designs was adopted to optimize the fermentation medium to improve 1,3-PDO production and glycerol consumption. The design experiment and the statistical treatment of the results were performed by the software package STATISTICA, version 6.0 (StatSoft, Inc.) including ANOVA, to obtain the impact and significance of each term and the interactions between the process variables and response. The fit quality of the polynomial model was expressed via the determination coefficient R^2, and its statistical significance was verified with the *F*-test using the same software program, considering a confidence level of 95 % or *p-value* less than 0.05 [15, 16].

In the first experimental design, a Plackett-Burman design was chosen to screen and identify variables that had significant influence. This design is based on the first order polynomial model [17]:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i . X_i$$

where Y is the response, β_0 is the model intercept and β_i is the coefficient of linear equation, and X_i is the level of independent variable.

Twelve components were selected for analysis: urea, yeast extract, $C_2H_3NaO_2$, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, glycerol, butyric acid, glucose and $CaCO_3$; in two levels, minimum and maximum, coded as "−1" and "+1", respectively, and three replicates of the center point, coded as "0" (Table 1) resulting in 19 runs performed at 37 °C and 80 rpm.

Table 1. Factors and levels used in the Plackett-Burman design for optimization of fermentation medium

Factor (g/l)	Code	Minimum -1	Center Point 0	Maximum +1
Urea	x1	0.50	1.50	3.00
Yeast extract	x2	0.50	1.50	3.00
$C_2H_3NaO_2$	x3	0.005	0.01	0.05
KH_2PO_4	x4	0.10	0.50	1.50
K_2HPO_4	x5	0.20	2.00	4.00
$MgSO_4.7H_2O$	x6	0.10	0.20	0.40
$MnSO_4.H_2O$	x7	0.005	0.01	0.02
$FeSO_4.7H_2O$	x8	0.01	0.30	0.50
Glycerol	x9	5.00	35.00	70.00
Butyric acid	x10	0.20	0.50	2.00
Glucose	x11	0.00	6.00	12.00
$CaCO_3$	x12	0.30	1.00	2.00

After the first screening experiments using Plackett-Burman design, a fractional factorial design was used to find significant factors affecting 1,3-PDO production. This design was used because it is accurate for estimating the main effects and interaction, with a reduced number of experiments if compared to a complete factorial design [18]. Yeast extract, $C_2H_3NaO_2$, K_2HPO_4, urea, $MgSO_4.7H_2O$ and glycerol were used as independent variables and the 1,3-PDO production was used as a dependent variable. Therefore, to analyze these six components the second experimental fractional factorial design (2^{6-2}) was performed with two levels, minimum and maximum, coded as "−1" and "+1", respectively, and three replicates of the center point (Table 2) resulting in 19 runs performed at 37 °C and 80 rpm.

Table 2. Factors and levels used in the fractional factorial (2^{6-2}) design for optimization of fermentation medium

Factor (g/l)	Code	Minimum -1	Center Point 0	Maximum +1
Urea	x1	0.00	0.50	1.00
Yeast extract	x2	0.50	1.50	3.00
$C_2H_3NaO_2$	x3	0.005	0.01	0.05
K_2HPO_4	x4	0.20	2.00	4.00
$MgSO_4.7H_2O$	x5	0.00	0.10	0.20
Glycerol	x6	5.00	10.00	20.00

Finally, a central composite rotatable design (CCRD) was carried out to optimize 1,3-PDO production using the response surface methodology. The concentrations of K_2HPO_4 and glycerol, ranging from 0.5 to 5.0 g/L and 2.0 to 12.0 g/L, respectively, were chosen as independent variables (Table 3). The experiment comprised 12 runs (3 replicate runs at the center point and 2 axial levels). The concentration of yeast extract and $C_2H_3NaO_2$ were maintained at 0.5 and 0.005 g/L, respectively, in accordance with the results obtained from the fractional factorial design performed at 37 °C and 80 rpm. 1,3-PDO production and percentage reduction of substrate (PRS) were used as response variables. The fundamental of this method, for quantitative variables, involves fitting first-order (linear) or second-order (quadratic) functions of the predictors to one or more response variables, and then examining the characteristics of the fitted surface to decide the appropriated action [18]. A quadratic polynomial equation was proposed to describe the mathematical relationship between the independent variables and response variables under the current conditions [15]:

$$Y = \beta_0 + \beta_1.x_1^2 + \beta_2.x_2^2 + \beta_3.x_1 + \beta_4.x_2 + \beta_5.x_1.x_2$$

where Y is the response, β_n are the coefficients and x_n the independent variables.

Table 3. Factors and levels used in the experimental CCRD for optimization of fermentation medium

Factor (g/l)	Code	Axial -1.41	Minimum -1	Center Point 0	Maximum +1	Axial +1.41
K_2HPO_4	x1	0.50	0.90	2.60	4.30	5.00
Glycerol	x2	2.00	3.50	7.00	10.50	12.00

The global desirability function (D) was performed to maximize the 1,3-PDO production and percentage reduction of substrate (PRS) simultaneously. This function consists in converting each response into a single *desirability* function (di) that ranges from 0 to 1 ≤ 0 ≤ d. For a function with two independent variables, a plot of composite *desirability* can be constructed as a function of filler alone, using the equation [19]:

$$D = (d_1.d_2)^{1/2}$$

The predicted values were validated experimentally in batch fermentation (three replicates), carried out in predicted conditions during 24 h.

Analytical methods

The concentrations of 1,3-PDO, glycerol and organic acids were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a refractive index detector and UV detector. Samples were first centrifuged at 10.000 rpm for 10 minutes at 4 °C (Sigma Laborzentrifugen 2K15). The supernatants were filtered (Millex-HV, PVDF membrane, 0.2 µm pore size, 13 mm diameter - Millipore) for measurements of 1,3-PDO, glycerol and acids (lactic, acetic and butyric). The column used for separation was Hi Plex H, 300 x 7.7 mm (Agilent Technologies) at 45 °C. Analyses performed at a flow rate of 0.6 mL/min at a constant temperature of 45 °C, H_2SO_4 (0.5 mN) were the mobile phase and a wavelength of 210 nm. External standards were applied for identification and quantification of peak areas. The cell concentration (g/l) was determined using a linear equation derived from the relationship of cell dry weight (90 °C until constant weight) and the optical density (OD) at 600 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

The Plackett-Burman design was the first step in the sequential strategy to select the factors to optimize the medium. The 1,3-PDO concentrations ranged from 0.34 g/l to 7.23 g/l (Table 4). In accordance with ANOVA (analysis of variance), using 95 % of confidence level ($p \leq 0.05$) and standard error, the r squared was shown to be a good fit to the experimental results of 0.98 and the r squared adjusted 0.93. These results allowed made it possible to plot the Pareto chart (Fig 1), which provided important data about the statistical relevance of the factors. From this chart, one can see that urea, yeast extract, $C_2H_3NaO_2$, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, glycerol and glucose had significant relevance for 1,3-PDO production. On the contrary, KH_2PO_4, $MnSO_4.H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, butyric acid and $CaCO_3$ presented insignificant effect for 1,3-PDO production and then were removed from medium composition.

The glucose was eliminated from the medium composition since it presented the significant but negative effect for 1,3-PDO production and the interest of this work is to use glycerol. Even though the glycerol had a significant positive effect, the analysis range was decreased based on the residual glycerol results shown in Table 4, since the amount for residual glycerol reached was 68.18 g/l. The range for urea and $MgSO_4.7H_2O$ were reduced, since these nutrients presented a significant but negative effect. The other significant factors that presented a positive effect had the analysis range maintained and the significant factors with a negative effect had the analysis range decreased.

Nonetheless, the 1,3-PDO production can still be enhanced, as the center points are still lower than the other points, showing an increasing tendency in the direction of the maximum point. According to the results of the second experimental design, the fractional factorial (2^{6-2}), which are shown in Table 5, the 1,3-PDO production ranged from 2.32 g/l to 4.55 g/l. The ANOVA, using 95 % of confidence interval ($p \leq 0.05$), of fractional factorial design results with replicated center points, the curvature in the tested region was significant with a *p-value* of less than 0.05, which suggests that a response surface study with a quadratic model is required to optimize 1,3-PDO production with the selected significant variables in this design. These results (Table 5) allowed made it possible the plotting of the Pareto chart (Fig 2), which provided important data about the statistical relevance of the factors, as well as of their interactions. From this chart, one can see K_2HPO_4 and glycerol had significant relevance for 1,3-PDO production. The K_2HPO_4 that presented a positive effect had the analysis range increased.

Even though the glycerol had a significant positive effect, the analysis range was decreased based on residual glycerol results shown in Table 5, since the amount for residual glycerol reached was 16.09 g/l. The urea and $MgSO_4.7H_2O$ was eliminated from the medium, since the minimum concentration analyzed was zero and these factors had a negative effect on 1,3-PDO production. The $C_2H_3NaO_2$ and yeast extract factors presented an insignificant effect on 1,3-PDO production, so these concentrations were kept to a minimum. The analysis of the Pareto chart also depicted significant curvature denoting that there exists a point of maximum 1,3-PDO productivity. Moreover, the values of the center points are close to the maximum obtained in the studied range, indicating the need to add axial points to the following experiment to optimize the 1,3-PDO production.

Table 4. Matrix of experimental Plackett-Burman design and their corresponding results of 1,3-PDO production and residual glycerol (Res. gly.)

Run	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	x9	x10	x11	x12	1,3-PDO (g/l)	Res. gly. (g/l)
1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	0.51	67.72
2	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	2.59	64.82
3	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	0.34	5.45
4	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	0.42	4.93
5	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	7.23	55.43
6	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	3.05	0.81
7	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0.37	4.87
8	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	2.87	0.00
9	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	3.57	60.94
10	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	5.68	59.00
11	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0.41	68.04
12	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	0.69	67.47
13	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	0.46	5.33
14	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	0.77	68.18
15	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	2.80	0.34
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.96	0.15
17 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.62	34.69
18 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.64	36.90
19 (PC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.64	36.42

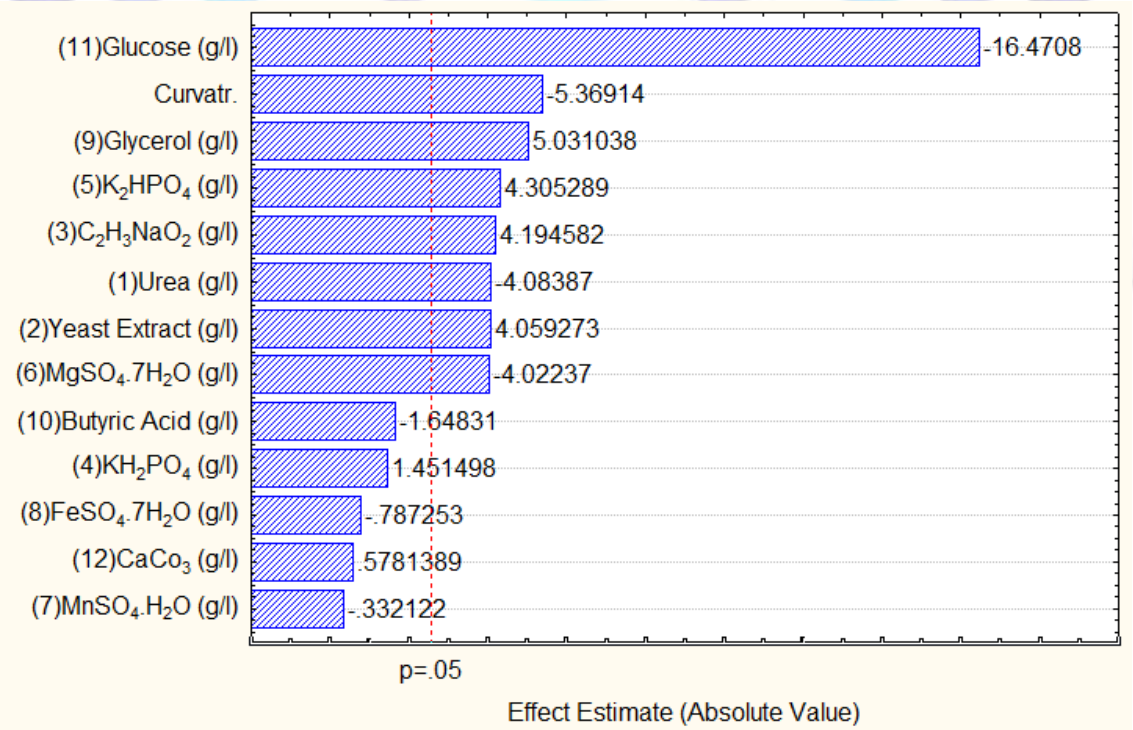

Fig 1: Pareto chart for 1,3-PDO production in the Plackett-Burman design

Table 5. Matrix of experimental fractional factorial (2^{6-2}) design and their corresponding results of 1,3-PDO production and residual glycerol (Res. gly)

Run	x1	x2	x3	x4	x5	x6	1,3-PDO (g/l)	Res. gly. (g/l)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.46	0.44
2	1	-1	-1	-1	1	-1	2.57	0.27
3	-1	1	-1	-1	1	1	3.35	13.37
4	1	1	-1	-1	-1	1	2.98	12.78
5	-1	-1	1	-1	1	1	2.64	14.24
6	1	-1	1	-1	-1	1	2.32	16.09
7	-1	1	1	-1	-1	-1	2.62	0.28
8	1	1	1	-1	1	-1	2.76	0.00
9	-1	-1	-1	1	-1	1	4.27	13.21
10	1	-1	-1	1	1	1	4.14	12.38
11	-1	1	-1	1	1	-1	2.89	0.10
12	1	1	-1	1	-1	-1	2.86	0.00
13	-1	-1	1	1	1	-1	2.86	0.00
14	1	-1	1	1	-1	-1	2.65	0.00
15	-1	1	1	1	-1	1	5.23	10.71
16	1	1	1	1	1	1	5.31	9.97
17 (PC)	0	0	0	0	0	0	4.41	6.11
18 (PC)	0	0	0	0	0	0	4.51	5.70
19 (PC)	0	0	0	0	0	0	4.55	5.57

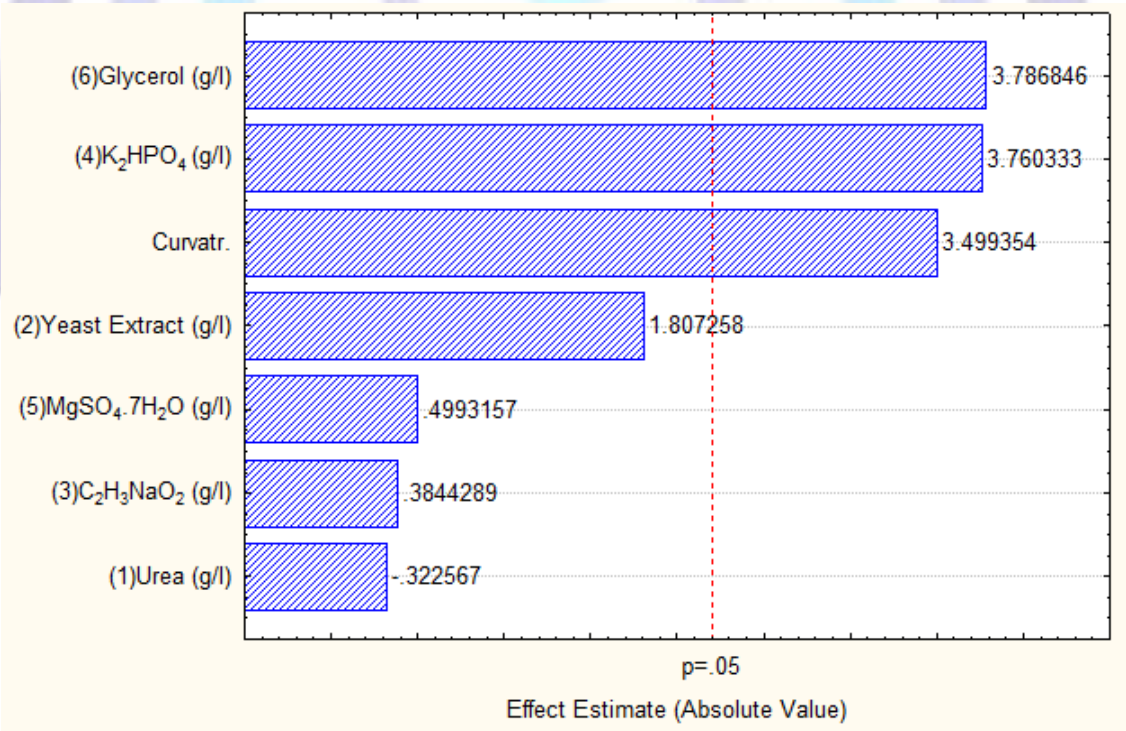

Fig 2: Pareto chart for 1,3-PDO production in the fractional factorial (2^{6-2}) design

Thus, the next step was to optimize the K_2HPO_4 and glycerol concentrations, evaluating the 1,3-PDO production and percentage reduction of substrate using the Central Composite Rotational Design (DCCR), since it allows the predicting of

the response surface with curvature plots and visualize of the maximum values of the dependent variables. The ANOVA of CCRD results were presented in Table 6 and 7, using 95 % of confidence interval ($p \leq 0.05$) and pure error, shows in both K_2HPO_4 and glycerol concentrations significant linear effects; this means the factors presented mutual interference in 1,3-PDO production and PRS (percentage reduction of substrate). The CCRD showed quadratic effect for glycerol ($p \leq 0,05$) on 1,3-PDO production and also for PRS, thus denoting a curvilinear plan, as can be observed in ANOVA.

Table 6. Analysis of variance (ANOVA) of factors for 1,3-PDO production

Factor	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean Square	*F*	*p-value*
K_2HPO_4 (L)	0.407	1	0.407	85.906	0.003
Glycerol (L)	4.907	1	4.907	1035.532	0.001
Glycerol (Q)	1.358	1	1.358	286.589	0.001
1L by 2L	0.125	1	0.125	26.312	0.014
lack of fit	0.020	4	0.005	1.080	0.495
Pure error	0.014	3	0.005		
Total SS	6.831	11			

Table 7. Analysis of variance (ANOVA) of factors for PRS

Factor	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean Square	*F*	*p-value*
K_2HPO_4 (L)	276.294	1	276.294	60.345	0.004
Glycerol (L)	2059.883	1	2059.883	449.901	0.001
Glycerol (Q)	310.569	1	310.569	67.832	0.004
1L by 2L	92.719	1	92.719	20.251	0.020
lack of fit	10.998	4	2.749	0.600	0.690
Pure error	13.736	3	4.579		
Total SS	2764.199	11			

Analyzing the data from Tables 6 and 7, the model adequately adjusts to the experimental points, representing the confidence of the results for both dependent variables analyzed. Considering the confidence level of 95 %, the models obtained were significant and were able to explain 99 % of variance (R^2), since the determination coefficient R^2 values (99 % to 1,3-PDO product and PRS), R adjust values (99 % to 1,3-PDO product and PRS), the *lack of fit* was insignificant (above 0,05) combined with the significant *F* and *p-values*. By means of ANOVA, for both response factors, significant effects quadratic and linear were found for the glycerol, while only a linear effect was found for K_2HPO_4, the quadratic term of K_2HPO_4 was removed from models because it presented insignificant effect. This means the glycerol concentration has more influence than K_2HPO_4 for both response factors analyzed (1,3-PDO production and PRS).

The response surface of the third experimental design is presented in Fig 3. The surfaces present the relation between dependent factors (Fig 3a: 1,3-PDO production and Fig 3b: PRS) and independent factors (glycerol and K_2HPO_4 concentrations). At the range studied, the higher production of 1,3-PDO was obtained at the higher level of glycerol and K_2HPO_4, presenting the maximum results of around 4 g/l to 1,3-PDO. The analysis of the PRS surface made it possible to observe the higher percentage of PRS was obtained at lower level of glycerol, while in the lower level of glycerol the influence of K_2HPO_4 level was the same.

The equations representing 1,3-PDO production and PRS, where x_1 is the K_2HPO_4 concentration (g/l) and x_2 is the glycerol concentration (g/l), follow:

$$\text{1,3-PDO (g/l)} = 3.43 - 0.45x_2^2 + 0.22x_1 + 0.78x_2 + 0.18x_1x_2$$

$$\text{PRS (\%)} = 90.88 - 6.82x_2^2 + 5.88x_1 - 16.05x_2 + 4.81x_1x_2$$

The global desirability value to reach the optimum for the two factors simultaneously was 0.93, meaning that the optimization by this function fulfills 93 % of the maximum obtainable for each dependent variable (response variable). The optimum concentration for K_2HPO_4 was 5 g/l and for glycerol was 8 g/l. The predicted values using the global desirability function and the experimental validation of the results in optimized conditions for 1,3-PDO production and PRS are presented in Table 8. It is observed that the experimental values are within the confidence limits −95 % and +95 %, showing that these experimental findings were in close agreement with the model prediction.

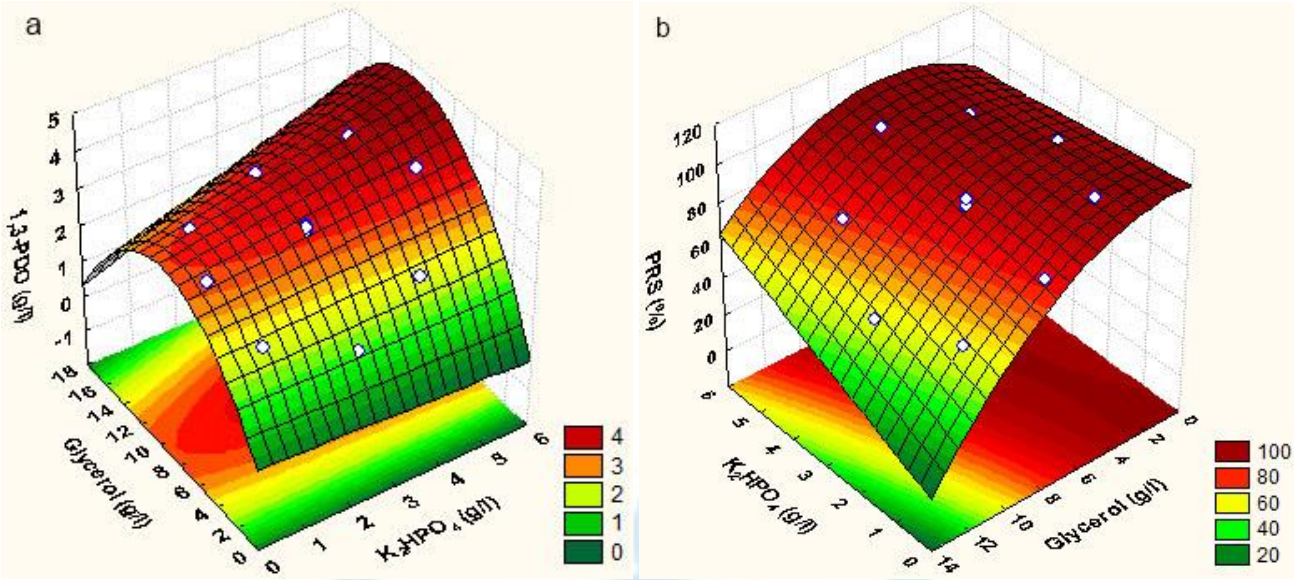

Fig 3: Response surface of K_2HPO_4 and glycerol concentrations for a: 1,3-PDO production and b: PRS

According to the results of Table 8 and Fig 4, the yield obtained was 0.58 mol/mol of 1,3-PDO per consumed glycerol in 12 h of fermentation without pH control. The efficiency of the glycerol fermentation by *C. beijerinckii* DSM 791 with the medium optimized in this study was 81 %, since Biebl et al. (1999) conclude the maximum yield for 1,3-PDO from glycerol by fermentation is 0.72 mol/mol of 1,3-PDO per consumed glycerol. It was demonstrated that *C. beijerinckii* DSM 791 was perfectly able to grow and produce 1,3-PDO on glycerol as the sole source of carbon and energy (Fig 4).

Table 8. Validation of the fermentation medium for improve glycerol consumption and 1,3-PDO production

Factor	Limits		Predict value	Experimental result
	-95 %	+95 %		
1,3-PDO (g/l)	3.85	4.14	3.99	3.85 ± 0.06
PRS (%)	91.70	100	96.18	100 ± 0.00

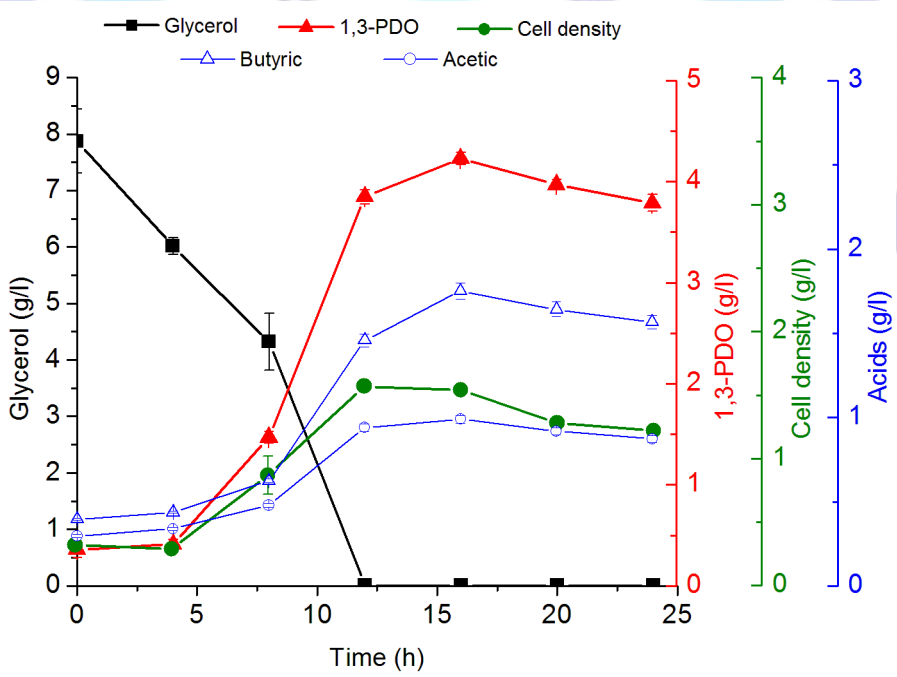

Fig 4: Kinetic profile using optimized conditions for improve glycerol consumption and 1,3-PDO production by *C. beijerinckii* DSM 791

The results of this study are comparable with those obtained by Gungormusler et al. (2010a), who obtained the yield of 0.58 mol/mol of 1,3-PDO per consumed glycerol in 24 h by *C. beijerinckii.* In another study, Gungormusler et al. (2010b) compared the 1,3-PDO production potential, without pH control, by different *Clostridium* spp. (*C. saccharobutylicum*, *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum*, *C. beijerinckii* and *C. butyricum*). Yields varied between 0.37 mol/mol to 0.54 mol/mol of 1,3-PDO per consumed glycerol while the PRS varied between 38 % and 93 % in 24 h of fermentation. Moon et al. (2011) optimized the medium for 1,3-PDO production from glycerol without pH control, by *C. pasteurianum* and obtained yield of 0.36 mol/mol of 1,3-PDO per consumed glycerol in 24 h.

The pH certainly influenced the metabolism of *Clostridium* spp. and some authors obtained higher yields of 1,3-PDO by controlling the pH during the glycerol fermentation. For example, Biebl et al. (1992) obtained 0.62 mol/mol of 1,3-PDO per consumed glycerol by *C. butyricum* and Otte et al. (2009) obtained 0.64 mol/mol of 1,3-PDO per consumed glycerol by *C. diolis*, controlling this important process variable.

CONCLUSIONS

The sequential experimental design strategy combined with the use of the desirability function for the optimization of the composition medium was shown to be an important tool for maximizing 1,3-PDO production and glycerol consumption by *C. beijerinckii* DSM 791, resulting in the yield of 0.58 mol/mol of 1,3-PDO per consumed glycerol. Among the evaluated factors, glycerol and K_2HPO_4 are of greater importance to 1,3-PDO production and percentage reduction of substrate by *C. beijerinckii* DSM 791. An optimum condition was successfully found and validated in this interval of study. The optimal concentrations for the medium compounds are 0.5 g/l of yeast extract, 0.005 g/l of $C_2H_3NaO_2$, 5 g/l of K_2HPO_4 and 8 g/l of glycerol.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Human Resources Program 13 of the National Petroleum Agency (ANP - PRH 13) for scholarship.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical statement

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors. The authors confirm that principles of ethical and professional conduct have been followed in this research and in the preparation of this article.

REFERENCES

[1] Kaur G., Srivastava A. K., Chand S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. Biochemical Engineering Journal. 64 (2012), 106–18.

[2] Yang F. X., Hanna M. A., Sun R. C.Value-added uses for crude glycerol — A byproduct of biodiesel production. Biotechnol Biofuels. 5 (2012), 13.

[3] Pinto B. P., Mota C. J. A. (2014). in Developments in glycerol byproduct-based biorefineries. Advances in Biorefineries: Biomass and Waste Supply Chain Exploitation (Waldron K., ed.), Woodhead publishing, Sawston, Cambridge, UK, pp. 364–385.

[4] Silva G. P., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnology Advances. 27 (2009), 30–39.

[5] Yazdani S. S., Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. Current Opinion in Biotechnology. 18 (2007), 213–219.

[6] Pereira Jr N., Bon E. P.S., Ferrara M. A. (2008). in Séries em Biotecnologia, vol. 1: Tecnologia de Bioprocessos, Biblioteca Nacional, Rio de Janeiro, RJ, pp. 56.

[7] Biebl H., Menzel K., Zeng A. P., Deckwer W. D. Microbial production of 1,3-propanediol. Appl Microbiol Biotechnol. 52 (1999), 289–297.

[8] Venkataramanan K. P., Boatman J. J., Kurniawan Y., Taconi K. A., Bothun G. D., Scholz C. Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. Appl Microbiol Biotechnol. 93 (2011), 1325–1335.

[9] Gonzalez-Pajuelo M., Andrade J. C., Vasconcelos I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 9 (2004), 442–446.

[10] Celińska E. Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. Biotechnology Advances. 28 (2010), 519–530.

[11] Hartlep M., Hussman W., Prayitno N., Meynial-Salles I., Zeng A. P. Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-propanediol from glycerol. Appl Microbiol Biotechnol. 60 (2002), 60–66.

[12] Li C., Lesnik K. L., Liu H. Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. Energies. 6 (2013), 4739-4768.

[13] Zeng A. P., Biebl H. (2002). in Bulk-Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-Propanediol Production and the New Trends, vol. 47: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (Scheper T., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 239–259.

[14] Powalowska D. S. 1,3-Propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum* DSP1 in repeated batch. Electronic Journal of Biotechnology. 17 (2014), 322–328.

[15] Rodrigues M. I., Iemma A. F. (2009). Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos, 2nd ed., Casa do Pão, Campinas, SP.

[16] Maeda R. N., Silva M. M. P., Santa Anna L. M. M., Pereira Jr N. Nitrogen source optimization for cellulase production by *Penicillium funiculosum*, using a sequential experimental design methodology and the desirability function. Appl Biochem Biotechnol. 161 (2009), 411–422.

[17] Plackett R. L., Burman J. P. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika. 33 (4) (1946), 305–325.

[18] Calado V., Montgomery D. C. (2003). Planejamento de experimentos usando o Statistica, 1nd ed., E-papers, Rio de Janeiro, RJ.

[19] A Balancing Act: Optimizing a Product's Properties 1994. Available from: www.statease.com/pubs/derringer.pdf. Accessed June 15, 2015.

[20] Gungormusler M., Gonen C., Azbar N. Comparative evaluation of *Clostridium beijerinckii* (NRRL B-593) and *Klebsiella pneumoniae* for 1,3-propanediol production. Journal of Biotechnology. 150S (2010a), S210–S211.

[21] Gungormusler M., Gonen C., Ozdemir G., Azbar N. 1,3-propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. New Biotechnology. 27 (6) (2010b), 782–788.

[22] Moon C., Lee C. H., Sang B., Um Y. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum*. Bioresource Technology. 102 (2011), 10561–10568.

[23] Biebl H., Marten S., Hippe H., Deckwer W. D. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. Appl Microbiol Biotechnol. 36 (1992), 592–597.

[24] Otte B., Grunwaldt E., Mahmoud O., Jennewein S. Genome shuffling in *Clostridium diolis* DSM 15410 for improved 1,3- propanediol production. Appl Environ Microbiol. 75 (24) (2009), 7610–7616.

Bioresource Technology 212 (2016) 100–110

Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering

Daiana Wischral [a,b], Jianzhi Zhang [a], Chi Cheng [a], Meng Lin [a], Lucas Monteiro Galotti De Souza [a], Fernando L. Pellegrini Pessoa [c], Nei Pereira Jr. [b], Shang-Tian Yang [a,*]

[a] William G. Lowrie Department of Chemical and Biomolecular Engineering, The Ohio State University, 151 West Woodruff Avenue, Columbus, OH 43210, USA
[b] School of Chemistry, Department of Biochemical Engineering, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Horácio Macedo 2030, Bloco E., Rio de Janeiro, RJ 21949-900, Brazil
[c] School of Chemistry, Department of Chemical Engineering, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Horácio Macedo 2030, Bloco E., Rio de Janeiro, RJ 21949-900, Brazil

HIGHLIGHTS

- *C. beijerinckii* DSM 791 is a robust organism for 1,3-PDO production from glycerol.
- Replacing yeast extract with corn steep liquor increased cell growth and productivity.
- Stable, long-term 1,3-PDO production was obtained in repeated batch fermentations.
- Cell was engineered to overexpress GDH and DHAK.
- 1,3-PDO productivity increased 26.8–37.5% with a greatly increased growth rate.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 February 2016
Received in revised form 4 April 2016
Accepted 5 April 2016
Available online 7 April 2016

Keywords:
1,3-Propanediol
Glycerol
Clostridium beijerinckii DSM 791
Dihydroxyacetone kinase
Glycerol dehydrogenase

ABSTRACT

1,3-Propanediol (1,3-PDO) production from crude glycerol, a byproduct from biodiesel manufacturing, by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 was studied with corn steep liquor as an inexpensive nitrogen source replacing yeast extract in the fermentation medium. A stable, long-term 1,3-PDO production from glycerol was demonstrated with cells immobilized in a fibrous bed bioreactor operated in a repeated batch mode, which partially circumvented the 1,3-PDO inhibition problem. The strain was then engineered to overexpress *Escherichia coli gldA* encoding glycerol dehydrogenase (GDH) and *dhaKLM* encoding dihydroxyacetone kinase (DHAK), which increased 1,3-PDO productivity by 26.8–37.5% compared to the wild type, because of greatly increased specific growth rate (0.25–0.40 h^{-1} vs. 0.13–0.20 h^{-1} for the wild type). The engineered strain gave a high 1,3-PDO titer (26.1 g/L), yield (0.55 g/g) and productivity (0.99 g/L·h) in fed-batch fermentation. Overexpressing GDH and DHAK was thus effective in increasing 1,3-PDO production from glycerol.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

1,3-Propanediol (1,3-PDO) is an important chemical widely used in the production of polymers (polyesters, polyethers and polyurethanes) and as an intermediate for the synthesis of heterocyclic compounds (Lee et al., 2015). The market demand for 1,3-PDO has increased rapidly as a result of the increased production of polytrimethylene terephthalate (PTT) used in manufacturing carpets, special textile fibers, and nonwoven fabrics, and is projected to reach 150,000 tons or $560 million by 2019. Current 1,3-PDO production via chemical routes, such as acrolein hydrolysis and ethylene oxide reaction with carbon monoxide and hydrogen, are costly and not environmentally friendly. There is a worldwide interest to produce bio-based 1,3-PDO from renewable biomass, including crude glycerol produced as a low-value byproduct in the biodiesel industry (de Souza et al., 2014; Kaur et al., 2012; Chatzifragkou et al., 2014).

Many bacteria including *Klebsiella*, *Clostridium*, *Citrobacter* and *Lactobacillus* can produce 1,3-PDO, along with other alcohols and organic acids, from glycerol as the sole carbon source (Maervoet et al., 2011). These bacteria use glycerol via two parallel pathways (see Fig. 1). The reductive pathway using glycerol dehydratase (GDHt, *dhaB*) and 1,3-propanediol dehydrogenase (PDDH, *dhaT*)

* Corresponding author.
E-mail address: yang.15@osu.edu (S.-T. Yang).

http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.020
0960-8524/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

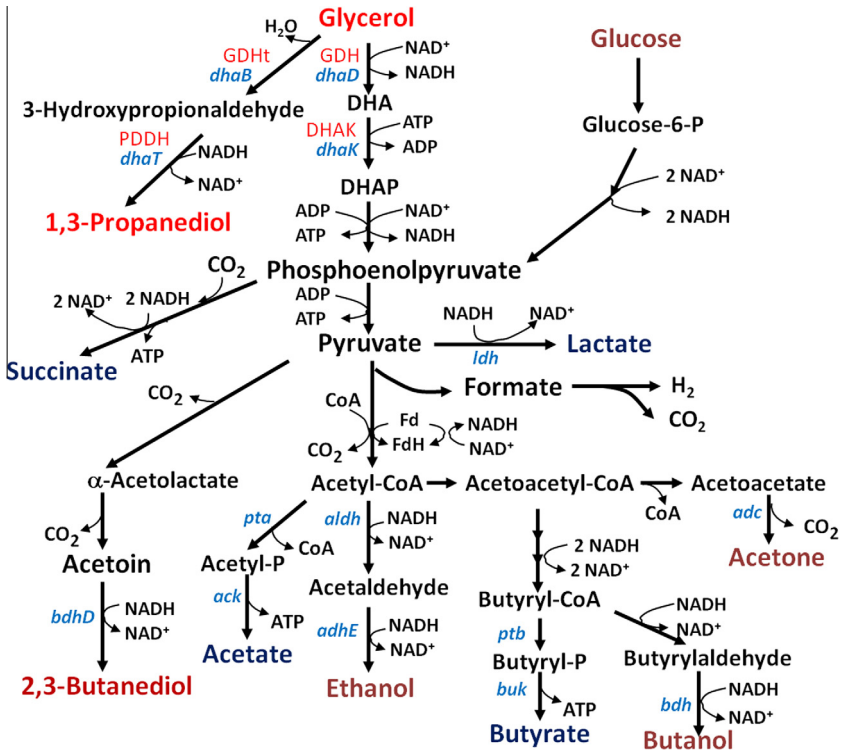

Fig. 1. Metabolic pathways for glycerol metabolism to 1,3-propanediol biosynthesis and production of other solvents and organic acids in *Clostridium*. DHA: dihydroxyacetone; DHAK: dihydroxyacetone kinase; DHAP: dihydroxyacetone-P; GDH: glycerol dehydrogenase; GDHt: glycerol dehydratase; PDDH: 1,3-PDO dehydrogenase. Key genes: *ack*: acetate kinase; *adc*; alcohol decarboxylase; *adhE*: alcohol dehydrogenase; *aldh*: aldehyde dehydrogenase; *bdh*: butanol dehydrogenase; *bdhD*: 2,3-butanediol dehydrogenase; *buk*: butyrate kinase; *dhaB*: glycerol dehydratase; *dhaD*: glycerol dehydrogenase; *dhaK*: dihydroxyacetone kinase; *dhaT*: 1,3-PDO dehydrogenase; *ldh*: lactate dehydrogenase; *pta*: phosphotransacetylase; *ptb*: phosphotransbutyrylase.

or 1,3-propanediol oxidoreductase (PDOR, *yqhD*) for the production of 1,3-PDO with the reducing power (NADH) generated in the oxidative pathway, which uses glycerol dehydrogenase (GDH, *dhaD* or *gldA*) and dihydroxyacetone kinase (DHAK, *dhaK*) to produce phosphoenolpyruvate (PEP) and NADH. PEP is then converted to pyruvate and then to various organic acids (mainly acetic, butyric, and lactic) and alcohols (i.e., 2,3-butanediol, ethanol, butanol), and hydrogen and CO_2, depending on the species and growth conditions. The maximum theoretical yield for 1,3-PDO from glycerol is 0.72 mol/mol or 0.60 g/g (Maervoet et al., 2011).

There have been extensive efforts to develop bioprocesses and engineered strains for 1,3-PDO production from glycerol (Kaur et al., 2012; Maervoet et al., 2011; Saxena et al., 2009). To date, most of the studies have focused on *Klebsiella pneumonia* (Xu et al., 2009) and *Clostridium butyricum* (Wilkens et al., 2012), which can produce 1,3-PDO at a relatively high titer (>100 g/L), yield (~0.5 g/g), and productivity (~2 g/L·h). However, *K. pneumonia* is a pathogen and also produces large amounts of 2,3-butanediol, ethanol and lactate, which impose additional burden on the separation and purification of 1,3-PDO, while *C. butyricum* also produces large amounts of butyric and acetic acids and is difficult to be metabolically engineered due to lack of cloning tools (Celińska, 2010). Interests have thus turned to other *Clostridium* species (Kubiak et al., 2012), including *Clostridium diolis* (Otte et al., 2009), *Clostridium saccharobutylicum* (Gungormusler et al., 2010a), *Clostridium pasteurianum* (Jensen et al., 2012) and *Clostridium beijerinckii* (Gungormusler et al., 2010b), for their potential to produce 1,3-PDO from glycerol. Among them, *C. beijerinckii* is of particular interest because of its ability to produce n-butanol as the main product when glucose is used as the carbon source (Lu et al., 2013) and 1,3-PDO as the main product from glycerol, which has been observed for only a few strains, including NRRL B-593 (Gungormusler et al., 2010b) and DSM 791 (Wischral et al., 2015), but has not been exploited for their metabolic robustness for potential industrial application.

Thus, this work aims at optimizing 1,3-PDO production from crude glycerol by *C. beijerinckii* DSM 791 through fermentation process optimization and metabolic engineering. We first investigated the feasibility of replacing yeast extract with corn steep liquor as the nitrogen source and then applying cell immobilization in a fibrous bed bioreactor for stable, long-term 1,3-PDO production in repeated batch fermentations, which partially circumvented the 1,3-PDO inhibition problem. Fed-batch strategy to alleviate glycerol inhibition and increase 1,3-PDO production was also studied. Finally, the strain was engineered to overexpress heterologous GDH (*gldA*) and DHAK (*dhaKLM*) from *Escherichia coli*, which for the first time, was demonstrated as an effective strategy to increase the production rate of 1,3-PDO from glycerol in clostridial fermentation.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and culture media

C. beijerinckii DSM 791 (from the Leibniz-Institut DSMZ) and its metabolically engineered strain A1 (see description below) were cultured under anaerobic conditions, at 37 °C, in Reinforced Clostridial Medium (RCM), unless otherwise noted. RCM contained (g/L): peptone, 10.0; yeast extract, 3.0; NaCl, 3.0; cysteine, 0.5; sodium acetate, 3.0; agar, 0.5; and glycerol, 5.0 as carbon source. In the fermentation studies, crude glycerol present in wastewater from a biodiesel manufacturing plant was also used as the carbon source and corn steep liquor (CSL, ~50% w/v solids) from a corn

wet-milling plant was used as the nitrogen source. The biodiesel wastewater contained ~48% (w/v) glycerol and had a pH of 9.2, which was adjusted to 6.0 with 10% (v/v) HCl before use. *E. coli* CA434 used in the metabolic engineering study was grown aerobically at 37 °C in Luria-Bertani (LB) medium or on LB agar plates. All media were autoclaved at 121 °C for 30 min. Antibiotic (25 μg/mL chloramphenicol or 30 μg/mL thiamphenicol) was added to the sterile medium in culturing the engineered strain.

2.2. Construction of plasmid and strain overexpressing gldA and dhaKLM

To overexpress GDH and DHAK, the plasmid pMTL82151-gldA-dhaKLM was constructed by inserting *E. coli gldA* (for GDH) and *dhaKLM* (for DHAK) sequentially into pMTL82151 (Yu et al., 2012) at the SacII restriction site (Fig. 2A) using the Clontech infusion cloning kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA). *E. coli gldA* and *dhaKLM*, which consisted of three contiguous genes *dhaK*, *dhaL*, and *dhaM* on the same operon (Gutknecht et al., 2001), were PCR-amplified from *E. coli* genomic DNA using the following primers: gldA-FOR (ATTTAAATTTGGATCCAGGAG GAGGAGCAATTATGGACCGCA), gldA-REV (GAAACAGCTATG ACCGCGGTTATTCCCACTCTTGCAGGAAACGC), DhaKLM-FOR (AGAG TGGGAATAACCAGGAGGGAGCAAAATAATGAAAAAATTGATCAATG), and DhaKLM-REV (GAAACAGCTATGACCGCGGTTAACCCTGACGGTT GAAACGTTGC). Briefly, *gldA* was first ligated to pMTL82151 digested with *BamH* I and *Sac* II, and *dhaKLM* was then inserted at *Sac* II site after *gldA*. The constitutive co-expressions of these two genes were driven by the *Clostridium tyrobutyricum* thiolase (*Pthl*) promoter (Genbank accession no. HM989902), with the original ribosome binding site of each gene replaced with the consensus sequence "AGGAGG" to optimize their expression.

The pMTL82151-gldA-dhaKLM was transformed into *C. beijerinckii* by conjugation as described previously (Yu et al., 2012). *E. coli* CA434 carrying the plasmids to be transformed were cultivated in the LB medium containing 25 μg/mL chloramphenicol at 37 °C overnight to reach OD_{600} of 1.5–2.0. The donor cells were collected by centrifugation at 4000×*g* for 2 min, washed once using 1 mL sterile phosphate-buffered saline (PBS), and mixed with 200 μL of *C. beijerinckii* cells pre-cultured at 37 °C overnight. The mixture was pipetted onto RCM with 5.0 g/L of glycerol agar plates. After incubating in an anaerobic chamber at 37 °C for 8–24 h, cells were collected and re-suspended in 1 mL PBS and then spread onto RCM agar plates containing 5.0 g/L glycerol as carbon source and 30 μg/mL thiamphenicol for selection. The plates were incubated for 2–3 days to obtain colonies, and positive transformants confirmed by colony PCR screening and plasmid extraction, were selected and stored at −80 °C. Fig. 2B shows the PCR result confirming that the plasmid was successfully introduced into *C. beijerinckii*. The transformant or engineered strain was designated as *C. beijerinckii* A1.

2.3. Reverse transcription (RT)-PCR analysis of gene expression

RT-PCR was performed to confirm *gldA* and *dhaKLM* expressions in the engineered strain A1. For mRNAs isolation and purification, cells were cultured in medium containing 20 g/L glycerol as the carbon source and 30 μg/mL thiamphenicol overnight. mRNAs were then extracted and purified from the collected cells using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Reverse transcription reactions were performed using SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the primers (*gdh_for*: CCAAAGCACTGGCACATTTC; *gdh_rev*: CGCCGGGACATCTTCTTTAATA; *dhak_for*: GGAGAAGGTGTCGGT-GAATTAG; *dhak_rev*: CTCTCTGGTGTGACGCATTT) under the following conditions: 30 min at 65 °C for cDNA synthesis, 2 min at 94 °C as a hot start, 42 thermal cycles (15 s at 95 °C for denaturation, 1 min at 65 °C for annealing, 1 min at 68 °C for extension), and 5 min at 68 °C for final extension. RNAs extracted from DSM 791 cells were used as negative control. Fig. 2C shows the RT-PCR result, confirming that both *gldA* and *dhaKLM* were expressed in the engineered strain A1

2.4. Fermentation

Batch fermentations with the wild-type and engineered strains were studied at 37 °C in serum bottles (100 mL containing 50 mL medium) and 1 L stirred-tank bioreactor containing 500 mL of a previously optimized medium (g/L): K_2HPO_4, 5.0; yeast extract, 0.5; sodium acetate, 0.005 and glycerol, 20–30 (Wischral et al., 2015). The fermentation was later studied with CSL (30 g/L) as the nitrogen source, replacing yeast extract. The bioreactor was autoclaved at 121 °C for 30 min and then sparged with nitrogen for 30 minutes to reach anaerobiosis, while the serum bottles were sparged with nitrogen before autoclaving. A 16 h precultured culture was used to inoculate the reactor at 10% medium volume.

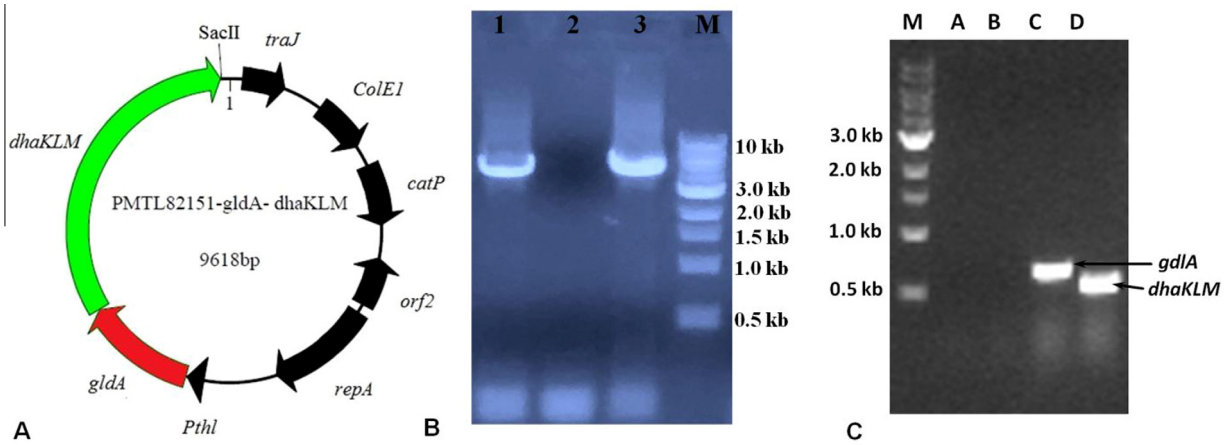

Fig. 2. (A) Plasmid map of pMTL82151-gldA-dhaKLM; (B) PCR verification of the transformant. Lane 1: *C. beijerinckii* A1 (transformant); Lane 2: *C. beijerinckii* DSM 791 (wild type; negative control); Lane 3: plasmid pMTL82151-gldA-dhaKLM (positive control); M: DNA ladder. (C) RT-PCR confirmation of gene expression in *C. beijerinckii* A1 overexpressing glycerol dehydrogenase (*gldA*) and dihydroxyacetone kinase (*dhaKLM*). No RT-PCR product band was obtained using RNA extracted from *C. beijerinckii* wild type (negative control) and primer pairs *Gdh_for/Gdh_rev* (Lane A) and *Dhak_for/Dhak_rev* (Lane B), whereas RT-PCR products with expected sizes of 662 bp and 560 bp were obtained using RNA extracted from *C. beijerinckii* A1 and primer pairs *Gdh_for/Gdh_rev* (Lane C) and *Dhak_for/Dhak_rev* (Lane D), respectively.

When necessary, thiamphenicol (30 μg/mL) was added at the time of inoculation to ensure plasmid stability during the fermentation. The pH in the bioreactor was maintained at 5.5 with 40% ammonium hydroxide solution and samples were collected at regular intervals. For fermentations in serum bottles, the pH was maintained at ~5.5 with $CaCO_3$ and samples (1 mL each) were taken daily. The fermentations were repeated at least once and representative data with averages and standard errors are reported.

Fermentation was also studied with cells immobilized in a fibrous-bed bioreactor (FBB) (Jiang et al., 2014). The FBB, which was made of a cotton towel (approximately 27 × 25 cm) spirally wound together with a stainless steel mesh packed in a glass column (~200 mL) fitted with a water jacket, was connected to a 1-L stirred-tank fermentor agitated at 100 rpm. Unless otherwise noted, the system containing 700 mL of the medium recirculated, using a peristaltic pump, through the FBB from its bottom to top, was controlled at 37 °C and pH 5.5 with ammonia hydroxide. A 16 h culture in a serum bottle was inoculated into the fermentor at a volume ratio of 10%, and cells were allowed to grow for approximately 15 h without recirculation. When the cell concentration had reached ~4.0 g/L (before the end of the exponential phase), cell immobilization was carried out by circulating the fermentation broth through the FBB at a flow rate of 16 mL/min. After ~24 h of continuous circulation and glycerol in the medium was nearly completely consumed, ~80% of the broth in the system was replaced with fresh medium to start the batch fermentation in a repeated-batch mode, with cells immobilized in the FBB as seeds for each subsequent batch fermentation.

2.5. Enzyme activity assay

Cells cultured in RCM at 37 °C for 24 h were collected, washed and re-suspended in phosphate buffer (20 mM, pH 7.5). After sonication (Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 100) to disrupt cells, the cell lysate was centrifuged at 13,000×g for 10 min and the supernatant was collected to measure the GDH activity. Briefly, 34 μL of cell lysate or phosphate buffer (blank as negative control) were added to 966 μL of assay mixture containing 0.20 M bicarbonate buffer (pH 11), 0.30 M glycerol, 10 mM NAD^+ and 0.3 M ammonium sulfate (final pH 10). Change of OD_{340} (ΔOD) reflecting NADH increase was recorded with a UV-spectrophotometer (Shimadzu Model UV-1609). One unit is defined as the enzyme activity causing the formation of one μM of NADH per minute. The specific activity based on the amount of total protein, which was determined by the Bradford assay (BioRad Protein Assay), and the extinction coefficient of NADH (6.22) can be calculated from ΔOD as follows:

$$\text{Specific activity (U/mg)} = \frac{\Delta\text{OD/min} \times 4.82 \times \text{dilution}}{\text{Amount of protein}} \quad (1)$$

2.6. Analytical methods

The cell concentration (g/L) was determined using a linear equation derived from the relationship of cell dry weight (90 °C until constant weight) and the optical density (OD) at 600 nm, measured with a spectrophotometer (UV-16-1, Shimadzu, Columbia, MD). Glycerol and fermentation products, including 1,3-PDO and butyric and acetic acids, were analyzed using a high performance liquid chromatograph (HPLC) equipped with an organic acid analysis column (Bio-Rad HPX-87H) and a refractive index detector (Shimadzu RID-10A). Analyses were performed with 0.0035 M H_2SO_4 as the mobile phase at 0.6 mL/min at 65 °C. External standards of glycerol, 1,3-PDO, and butyric and acetic acids (2 g/L each) were applied for identification and quantification of peak areas.

3. Results and discussion

3.1. 1,3-PDO production from glycerol

Fig. 3 shows batch fermentation profiles of *C. beijerinckii* DSM 791 in the medium with glycerol as the sole carbon source in the stirred-tank fermentor. Regardless of the nitrogen source used in the fermentation, 1,3-PDO was the only main product from glycerol, with butyric and acetic acids as two by-products. It should be noted that 1,3-PDO was produced by DSM 791 only when glycerol was used as the carbon source. No 1,3-PDO was produced from glucose, which in fact inhibited glycerol consumption and 1,3-PDO biosynthesis when it was present as a co-substrate with glycerol in the fermentation (Supplemental Figs. S1 and S2). These results suggested that glycerol was required to induce the expression of genes in the 1,3-PDO biosynthesis pathway and glucose inhibited glycerol uptake and utilization by DSM 791. Unlike other solventogenic clostridia such as *C. beijerinckii* NRRL B-593 (Gungormusler et al., 2010b), DSM 791 did not produce any other solvents, such as butanol and ethanol, from glycerol, which would be an advantage in downstream purification of the fermentation product.

CSL, a low-cost by-product of the corn wet-milling industry, has been used in several clostridial fermentations, including *C. beijerinckii* for acetone–butanol–ethanol fermentation (Parekh et al., 1999). However, most of the prior studies of 1,3-PDO fermentation used synthetic media with yeast extract as the nitrogen source. The feasibility and advantages of using CSL to replace yeast extract, the most expensive component of the synthetic medium, were thus studied. The optimal concentration of CSL was found to be 30 g/L in serum bottles using the optimized medium replacing the yeast extract with CSL in concentrations varying from 0 g/L to 90 g/L (data not shown). With 30 g/L CSL as the nitrogen source, cell growth was much faster and the fermentation reached a higher final 1,3-PDO concentration at a much shorter time (Fig. 3A), as compared to 10 g/L yeast extract (Fig. 3B). Compared to the fermentation with yeast extract, CSL gave a much higher specific growth rate (0.20 h^{-1} vs. 0.14 h^{-1}) and productivity (0.72 g/L·h vs. 0.12 g/L·h) (see Table 1). The 1,3-PDO yield from glycerol was also 10% higher with CSL (0.55 g/g vs. 0.50 g/g for yeast extract), which was comparable to 0.48–0.57 g/g reported in the literature (see Table 2). Clearly, CSL is an excellent nitrogen source for DSM 791 and can replace yeast extract and give superior performance for 1,3-PDO production from glycerol.

3.2. 1,3-PDO production from crude glycerol

Batch fermentation of *C. beijerinckii* DSM 791 was then studied with crude glycerol from biodiesel production as the carbon source and CSL as the nitrogen source. About 75 g/L of crude glycerol were added to the RCM to get the initial glycerol concentration of ~30 g/L in the medium. As shown in Fig. 3C, ~20 g/L of 1,3-PDO was produced in 48 h, corresponding to a volumetric productivity of 0.42 g/L·h. The 1,3-PDO yield was 0.55 g/g glycerol or ~92% of the maximum theoretical yield, which was similar to the one obtained from pure glycerol. Although a similar amount of 1,3-PDO was produced from both pure and crude glycerol, the 1,3-PDO production rate was ~22% lower in the fermentation with crude glycerol present in the biodiesel wastewater, which also contained residual oils and salts (mainly NaCl) that could inhibit cell growth and productivity (Chatzifragkou et al., 2010). The specific growth rate for cells grown in the medium containing crude glycerol was significantly lower at 0.13 h^{-1} (vs. 0.20 h^{-1} with pure glycerol) (see Table 1). Wilkens et al. (2012) also reported a similar 1,3-PDO yield of 0.52 g/g from both pure and crude glycerol, but 20–30% lower final 1,3-PDO titer and productivity with

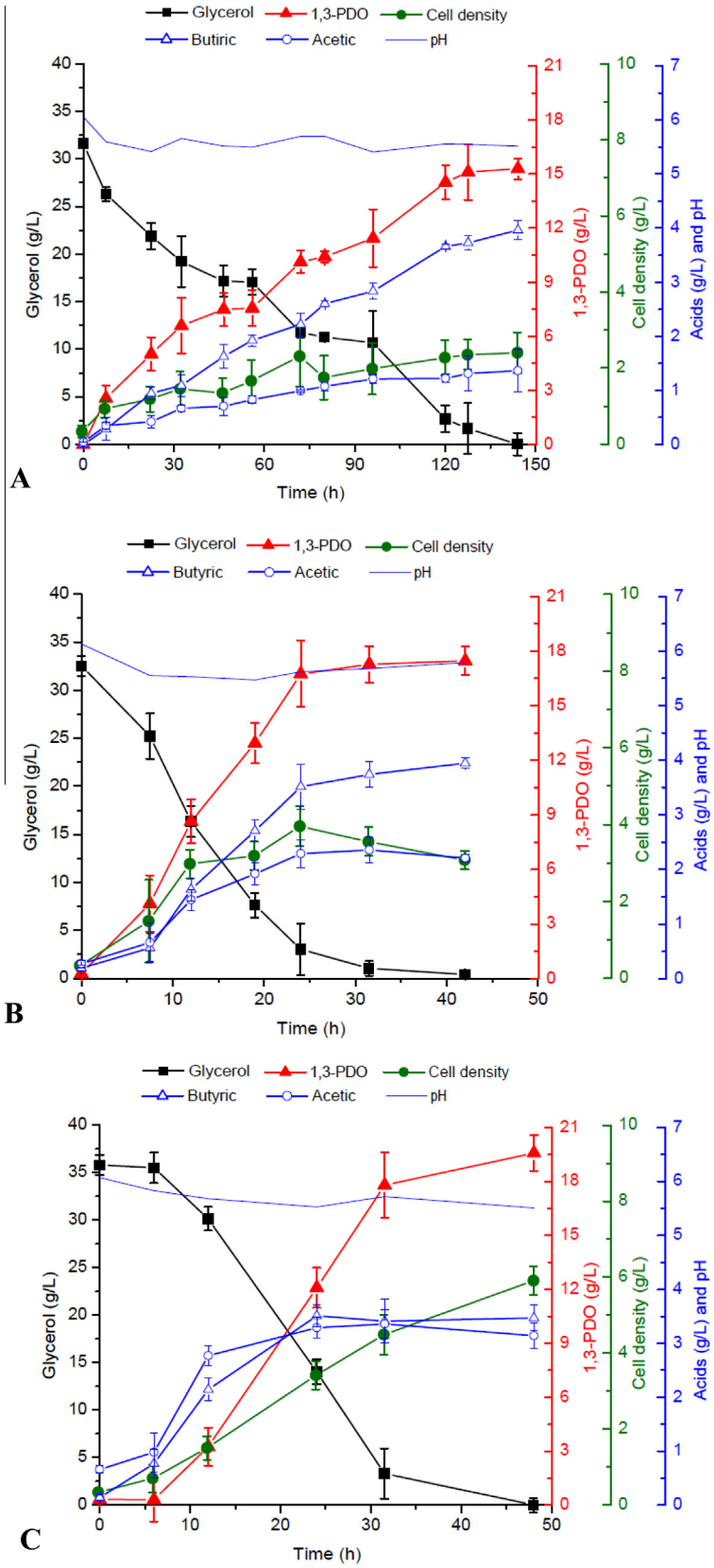

Fig. 3. Batch fermentation of glycerol by *C. beijerinckii* DSM 791 (wild type) in stirred-tank bioreactor at pH 5.5. (A) With yeast extract and pure glycerol; (B) with CSL and pure glycerol; (C) with CSL and crude glycerol.

crude glycerol in fed-batch fermentation by *C. butyricum* AKR102a. Similar results were also reported for *C. diols* GSHM 2, a 1,3-PDO tolerant strain developed through mutagenesis and genome shuffling, which produced ~30% less 1,3-PDO from crude glycerol compared to pure glycerol (Otte et al., 2009) (see Table 2). On the other hand, similar 1,3-PDO production, in terms of product

Table 1
Comparison of 1,3-PDO, butyrate and acetate production from glycerol by *C. beijerinckii* DSM 791 and *C. beijerinckii* A1 in stirred-tank bioreactor at pH 5.5.

	DSM 791			A1		
	YE, G	CSL, G	CSL, CG	CSL, G	CSL, G, FB	CSL, CG
Sp. growth rate (h^{-1})	0.14 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.02
1,3-PDO (g/L)	15.3 ± 0.6	17.5 ± 0.8	19.7 ± 1.0	18.9 ± 0.3	26.1 ± 0.1	20.0 ± 0.3
Yield (g/g)	0.50 ± 0.02	0.55 ± 0.02	0.55 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.54 ± 0.02
Productivity (g/L·h)	0.12 ± 0.05	0.72 ± 0.08	0.56 ± 0.06	0.98 ± 0.16	0.99 ± 0.15	0.71 ± 0.11
Butyric acid (g/L)	3.97 ± 0.18	3.94 ± 0.09	3.94 ± 0.09	3.94 ± 0.31	4.87 ± 0.16	3.67 ± 0.31
Yield (g/g)	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.10 ± 0.02
Acetic acid (g/L)	1.36 ± 0.40	2.21 ± 0.07	3.53 ± 0.07	2.36 ± 0.16	2.82 ± 0.32	3.43 ± 0.16
Yield (g/g)	0.04 ± 0.01	0.066 ± 0.01	0.062 ± 0.01	0.065 ± 0.01	0.058 ± 0.01	0.077 ± 0.01

YE: yeast extract (10 g/L); CSL: corn steep liquor (30 g/L); G: pure glycerol; CG: crude glycerol from biodiesel wastewater; FB: fed-batch fermentation

Table 2
1,3-PDO production from pure and crude glycerol by various microorganisms in batch and fed-batch fermentations.

Strain	Operation mode	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/L·h)	References
C. acetobutylicum DG1[1]	Fed-batch	84	0.54	1.7	González-Pajuelo et al. (2005)
C. beijerinckii NRRL B-593	Batch	(10.0)	(0.48)	(0.42)	Gungormusler et al. (2010b)
C. beijerinckii DSM 791	Batch	17.5 (19.7)	0.55 (0.55)	0.72 (0.56)	**This study**
C. beijerinckii A1[2]	Batch	18.9 (20.0)	0.54 (0.54)	0.98 (0.71)	
	Fed-batch	26.1	0.55	0.99	
C. butyricum AKR102a	Fed-batch	93.7 (76.2)	0.52 (0.51)	3.3 (2.3)	Wilkens et al. (2012)
C. butyricum DSM 5431	Batch	56.0	0.51	1.93	Biebl et al. (1992)
	Fed-batch	47.0	0.57	2.24	
C. butyricum DSP1	Batch	27.5 (26.2)	0.55 (0.52)	1.18 (0.94)	Szymanowska-Powałowska (2015)
C. butyricum VPI 1718	Batch	11.3	0.60	0.94	Chatzifragkou et al. (2010)
	Repeated batch	(65.5)	(0.52)	(1.15)	Chatzifragkou et al. (2014)
C. butyricum VPI3266	Batch	14.8 (15.8)	0.49 (0.51)	1.54 (1.59)	González-Pajuelo et al. (2004)
C. butyricum VPI3266	Fed-batch	65.0	0.57	1.21	Saint-Amans et al. (1994)
C. diolis DSM 15410	Fed-batch	47.5	0.49	2.15	Otte et al. (2009)
C. diolis GSHM 2[3]		78.5 (53.7)	0.53 (0.40)	2.82 (1.92)	
C. pasteurianum MNO6	Fed-batch	(27.0)	(0.21)	(1.20)	Jensen et al. (2012)
C. saccharobutylicum NRRL B-643	Batch	6.7	0.36	0.28	Gungormusler et al. (2010a)
E. coli K12 ER2925[4]	Fed-batch	104.4	0.90	2.61	Tang et al. (2009)
K. pneumonia KG1	Fed-batch	98.8	0.42	3.29	Zhao et al. (2009)
KG1-dhaT[5]		90.9	0.53	2.16	
K. pneumonia HR526	Fed-batch	95.4	0.40	1.98	Xu et al. (2009)
LDH526[6]		102.1	0.43	2.13	

Values in parenthesis are from crude glycerol; values without parenthesis are from pure or technical grade glycerol.
[1] Metabolically engineered strain overexpressing *C. butyricum dhaB* (GDHt) and *dhaT* (PDDH).
[2] Metabolically engineered DSM 791 overexpressing *E. coli gldA* (GDH) and *dhaKLM* (DHAK).
[3] Mutant of DSM 15410 obtained from mutagenesis followed with genome shuffling.
[4] Metabolically engineered strain overexpressing *dhaB1*, *dhaB2*, *yqhD*.
[5] KG1 overexpressing *dhaT*.
[6] HR526 with *ldhA* knockout.

titer, yield, and productivity, was found for *C. butyricum* VPI3266 (González-Pajuelo et al., 2004) and *C. butyricum* DSP1 (Szymanowska-Powałowska, 2015) in batch fermentations with pure and crude glycerol (see Table 2). A severe growth inhibition on *C. butyricum* VPI3266 was observed with crude glycerol at 100 g/L, although there was no significant difference in the 1,3-PDO yield from the crude and pure glycerol used in the fermentation media (González-Pajuelo et al., 2004). These results suggest that crude glycerol at high concentrations could be toxic to cells and thus would inhibit the fermentation.

3.3. Repeated batch fermentation in FBB

C. beijerinckii DSM 791 was strongly inhibited by 1,3-PDO (see Supplemental Table S1), which limited its production from glycerol to less than ~20 g/L in batch fermentation. Repeated batch fermentation as a strategy to circumvent the inhibition caused by 1,3-PDO and organic acids was thus performed with cells immobilized in the FBB, with the initial glycerol concentration of ~20 g/L in each repeated batch to avoid possible glycerol inhibition (Szymanowska-Powałowska, 2015). The use of FBB has the advantages that the cells can be reused and the desired product can be easily removed from the production medium in repeated batch fermentations. Fig. 4 shows the fermentation kinetics for 8 consecutive batches operated in 170 h. About 11 g/L of 1,3-PDO, 3.56 g/L of butyric acid and 1.75 g/L of acetic acid were produced from ~20 g/L of glycerol. In general, the fermentation process was stable, giving consistent 1,3-PDO production (10–12 g/L) and yield (0.54 ± 0.02 g/g) for all 8 batches (Fig. 4B), indicating that cells could be stably maintained and used to produce 1,3-PDO from glycerol in the repeated batch operation. The total amount of glycerol consumed was 166.8 g/L and 88.9 g/L of 1,3-PDO was produced, which compared favorably to the total 1,3-PDO production of 65.5 g/L (~12.0 g/L in each cycle) from glycerol with a yield of 0.52 g/g by *C. butyricum* VPI 1718 in repeated batch fermentation (Chatzifragkou et al., 2014). The volumetric productivity for the last 6 batches based on the total liquid volume in the system was 0.48 ± 0.04 g/L·h, which was a significant drop from 0.84–0.90 g/L·h for the first two batches (Fig. 4B). The lower productivity could be attributed partially to the significantly higher initial 1,3-PDO concentration in the later 6 batches. In the study, only ~80% of the spent medium was changed and replaced with fresh medium to start a new batch, resulting in a relatively high initial 1,3-PDO concentration of 4.7–5.7 g/L, which could have been

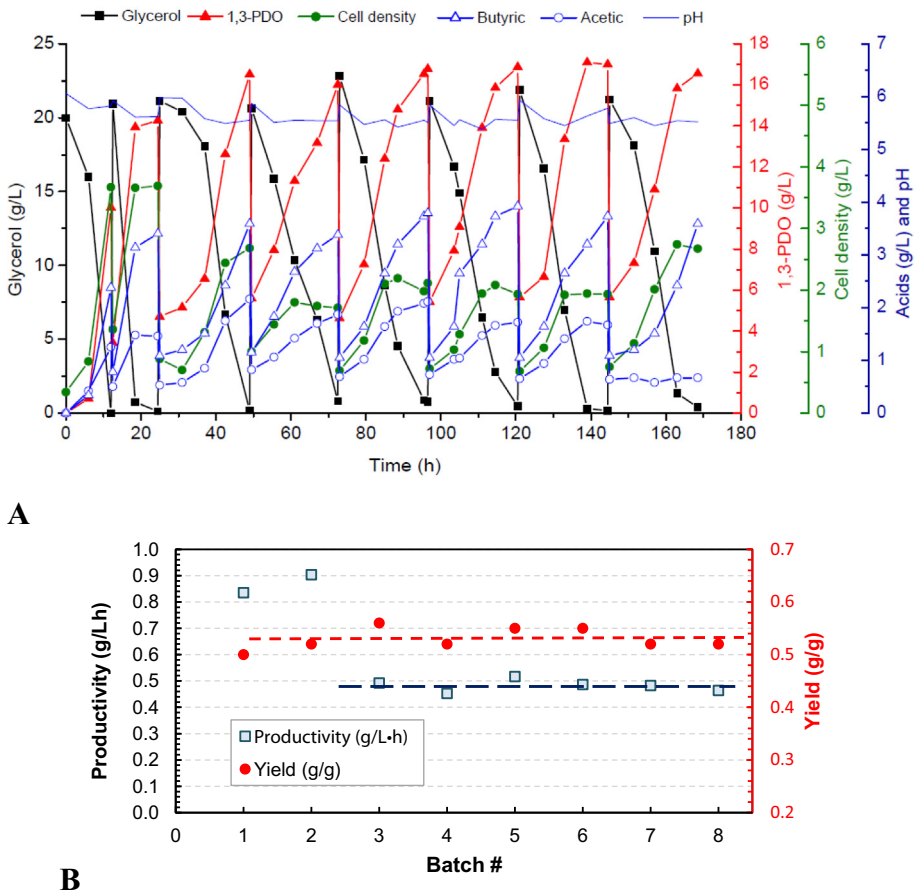

Fig. 4. Kinetics of repeated batch fermentations of *C. beijerinckii* DSM 791 with cells immobilized in the FBB and medium containing CSL and pure glycerol at pH 5.5. (A) Time course data; (B) productivity and yield for each batch in the repeated batch fermentations.

avoided with 100% medium refreshing. Nevertheless, the FBB system displayed a high process stability, which is a requisite for industrial applications. It should be noted that the 1,3-PDO productivity in the FBB, where the majority of the cells were present, was much higher at >2 g/L·h, which was comparable to those reported in the literature (see Table 2). The productivity can be further increased by increasing the density of viable cells immobilized in the FBB (Jiang et al., 2014).

3.4. Metabolic engineering to improve 1,3-PDO production

The anaerobic metabolism of glycerol and 1,3-PDO biosynthesis in *Clostridium* and *Klebsiella* involve four enzymes (genes): GDH (*dhaD*) and DHAK (*dhaK*) in the oxidative pathway and GDHt (*dhaB*) and PDDH (*dhaT*) or PDOR (*yqhD*) in the reductive pathway (see Fig. 1). These enzymes (genes) are coordinately expressed and their expression is induced by dihydroxyacetone (DHA) or glycerol (Sun et al., 2003). To improve 1,3-PDO production from glycerol, various metabolic engineering strategies have been studied for *K. pneumonia*, including overexpressing genes in the oxidative and reductive pathways and inactivating genes in the byproduct formation pathways (see Supplemental Table S2 and review articles by Celińska (2010) and Maervoet et al. (2011)). In general, overexpresssing *dhaB* would cause the accumulation of toxic 3-HPA (Zheng et al., 2006) while overexpressing *dhaT* alone did not improve 1,3-PDO production (Hao et al., 2008; Zhao et al., 2009), probably due to shortage of NADH needed for the reaction catalyzed by PDDH. Simultaneous overexpressions of *dhaT* and *dhaD*, which increased the ratio of NADH/NAD$^+$, led to 56.3% higher 1,3-PDO product titer in a batch culture but not in a 5-L fed-batch bioreactor (Chen et al., 2009). Zhao et al. (2009) also reported that increasing PDDH activity did not increase 1,3-PDO titer, but led to slower cell growth.

Therefore, in this study GDH and DHAK in the oxidative pathway, which generates the necessary NADH for the reductive pathway, were selected as targets for overexpression. We cloned and overexpressed *E. coli* gldA (encoding GDH) and dhaKLM (encoding DHAK) in *C. beijerinckii* DSM 791 and studied their effects on the engineered strain A1. We chose to overexpress *E. coli* GDH and DHAK because they would not be regulated by the host's dha regulon (Sun et al., 2003) and engineered *E. coli* strain overexpressing genes (dhaB and yqhD) in the reductive pathway was able to produce 1,3-PDO from glycerol at titer, yield, and productivity higher than those from native 1,3-PDO producers (Tang et al., 2009), suggesting the robustness of *E. coli* GDH and DHAK for glycerol uptake and utilization.

Fig. 5 shows fermentation kinetics of *C. beijerinckii* A1 grown on glycerol in batch (Fig. 5A) and fed-batch (Fig. 5B) fermentations and crude glycerol in batch fermentation (Fig. 5C), all with CSL as the nitrogen source. Compared to the wild type DSM 791 (Fig. 3), the engineered strain A1 grew faster and produced more 1,3-PDO in shorter fermentation periods, resulting in a much higher volumetric productivity of ~1.0 g/L·h from glycerol (vs. 0.72 g/L·h for the wild type) and 0.71 g/L·h from crude glycerol (vs. 0.56 g/L·h for the wild type) (see Table 1). A higher 1,3-PDO concentration of 26.1 g/L was also reached in fed-batch fermentation with A1, which was unattainable with the wild type (max. 1,3-PDO titer was less than ~20 g/L under all conditions studied), suggesting that the engineered strain A1 had a better tolerance to 1,3-PDO and the toxic intermediate metabolite 3-HPA (and also possibly

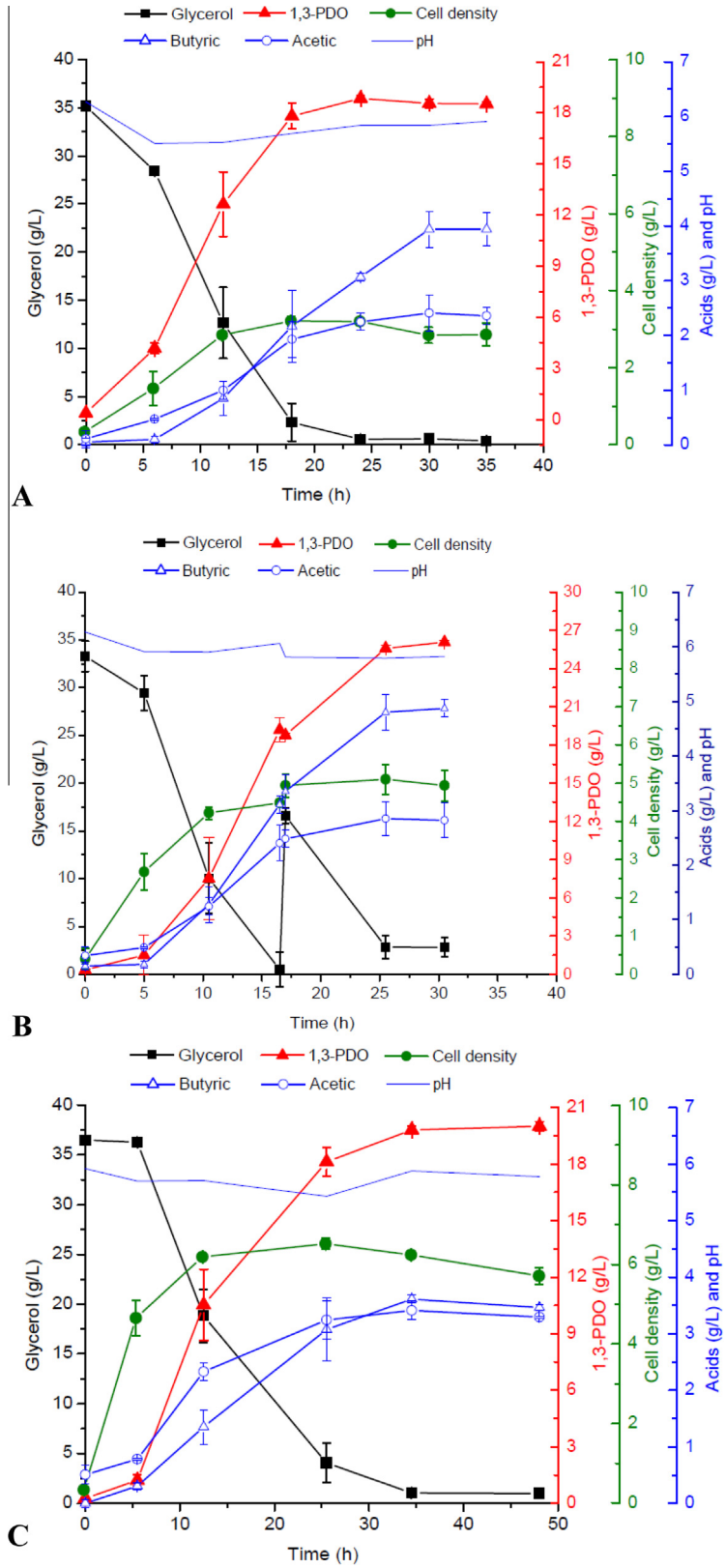

Fig. 5. Fermentation profiles of *C. beijerinckii* A1 (engineered strain) grown on glycerol with CSL as nitrogen source in stirred-tank bioreactor at pH 5.5. (A) Batch with pure glycerol; (B) fed-batch with pure glycerol; (C) batch with crude glycerol.

DHA). The higher 1,3-PDO production could also be attributed to the partially relieved gene regulation on the *dha* operon with the constitutional expressions of the heterologous *gldA* and *dhaKLM*.

Compared to the wild type DSM 791, the engineered strain A1 expressing *E. coli gldA* and *dhaKLM* showed a three-fold GDH activity (0.35 ± 0.05 U/mg vs. 0.12 ± 0.01 U/mg for the wild type) and

grew much faster on glycerol (Fig. 6), with a higher specific growth rate of 0.25–0.40 h^{-1} (vs. 0.13–0.20 h^{-1} for the wild type) in the exponential growth phase. This finding is consistent with a previous study that showed *K. pneumoniae* mutants with inactivated GDH and DHAK had significantly reduced growth rates compared to the parental wild type strains (Seo et al., 2010). In addition, no notable growth was observed for *Citrobacter werkmanii* DSM 17579 with GDH knockout because glycerol metabolism in the oxidative pathway was blocked (Maervoet et al., 2014). Apparently, the increased GDH activity in the engineered strain A1 allowed for a faster glycerol oxidation, which is the first and perhaps the rate-limiting step in the oxidative pathway leading to NADH and ATP generation required for cell growth. Consequently, GDH overexpression resulted in faster growth and fermentation. It should be noted, however, that the increased cell growth rate with the engineered strain A1 could also be partially attributed to the expression of *E. coli* DHAK, which utilized a phosphoprotein instead of ATP as the phosphoryl donor (Gutknecht et al., 2001), thus affording more ATP for cell growth.

However, the 1,3-PDO product yield from glycerol and the amounts of butyric and acetic acids produced by the engineered strain A1 were not different from those by the wild type DSM 791, indicating that the metabolic flux distributions were not changed with the overexpression of GDH and DHAK. Apparently, increasing the flux or reaction rate through the oxidative pathway also increased the flux or reaction rate through the reductive pathway so that redox balance or NADH/NAD^+ ratio can be maintained in cells. Glycerol oxidation generates NADH that must be oxidized to NAD^+ in order to maintain redox balance, and the reduction of glycerol to 1,3-PDO appeared to be the preferred way for this purpose, over converting acetyl-CoA to ethanol or to butyryl-CoA and then to butanol, probably because *adhE* and *bdh* were repressed or inhibited by glycerol, which corroborated well with the observation that only 1,3-PDO and no ethanol or butanol was produced in glycerol fermentation by DSM 791. This preference for 1,3-PDO production is different from other *C. beijerinckii* strains producing acetone, butanol, and ethanol, but not 1,3-PDO because of lacking GDHt and PDDH, as the main solvent products from glycerol (and glucose). Acetate and butyrate production from their corresponding acyl-CoA generates ATP but do not involve NADH and thus would not be affected by increased NADH availability or flux through the glycerol oxidative pathway.

It should be noted that deleting genes (i.e., *ack* and *buk*) in the acids formation pathways could be detrimental to cell survival and would not improve 1,3-PDO production by DSM 791. On the other hand, overexpressing *E. coli yqhD* encoding PDOR, which catalyzes the reaction from 3-HPA to 1,3-PDO using both NADH and NADPH, could be an effective strategy to increase 1,3-PDO

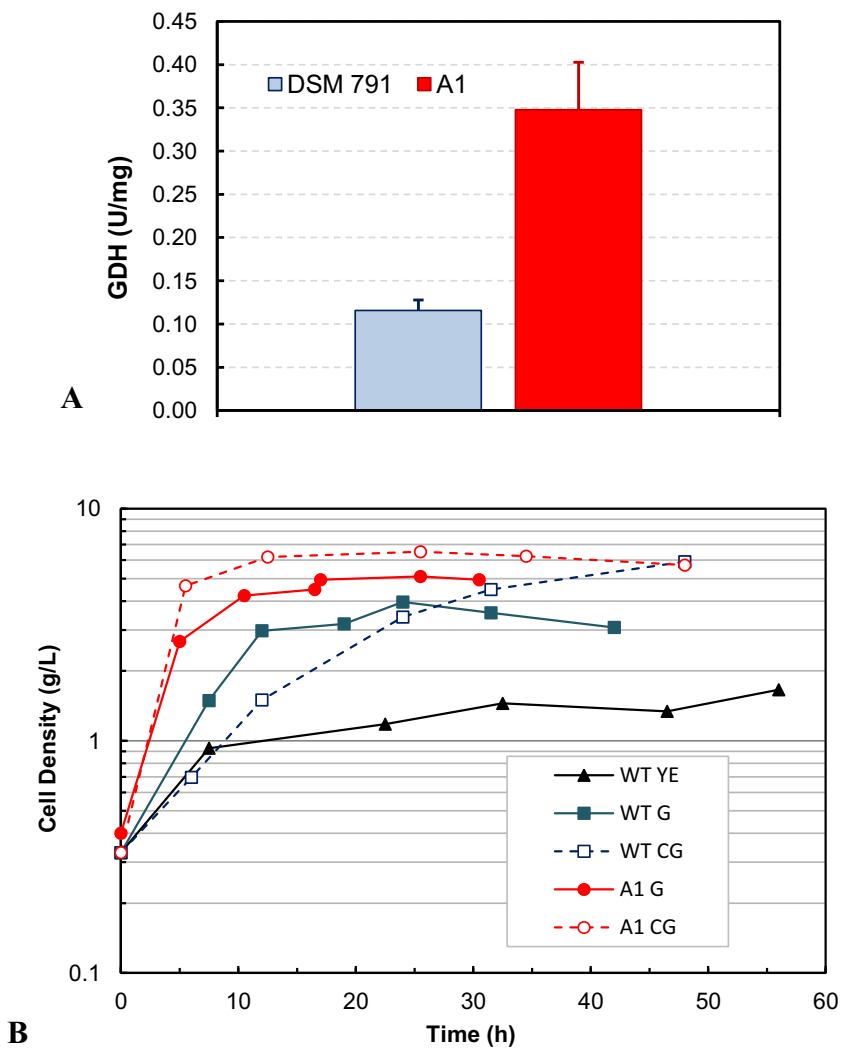

Fig. 6. Comparison of GDH activity (A) and cell growth profiles (B) of *C. beijerinckii* DSM 791 (WT) and A1 (engineered strain) in bioreactor at pH 5.5 with pure glycerol (G) or crude glycerol (CG) as carbon source. Except for the one with yeast extract (YE), corn steep liquor was the nitrogen source used in these fermentations.

production from glycerol, as demonstrated with *K. pneumonia* (Zhu et al., 2009). It should also be mentioned that an engineered strain of *Clostridium acetobutylicum* overexpressing *C. butyricum dhaB* (GDHt) and *dhaT* (PDDH) produced more 1,3-PDO than did *C. butyricum* wild-type and product-tolerant mutant strains (González-Pajuelo et al., 2005). Interestingly, the engineered *C. acetobutylicum*, without GDH and DHAK encoding genes in its genome, used glycerol kinase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase to oxidize glycerol, which is normally used under aerobic conditions. This aerobic glycerol oxidation pathway is thus of interest for further metabolic engineering study.

3.5. Comparison to other 1,3-PDO producers

Table 2 summarizes and compares the results from this work and related studies. Compared to other high-level 1,3-PDO producers, *C. beijerinckii* DSM 791 has comparable 1,3-PDO yield and productivity, but lower final product titer, probably because of its higher sensitivity to1,3-PDO inhibition. In general, native producers such as *C. butyricum* and *K. pneumonia* can produce 1,3-PDO at a high titer close to 100 g/L, but the co-production of by-products such as 2,3-BDO, ethanol, and lactate not only compromised product yield but also hindered their industrial application due to high product purification cost (Lee et al., 2015). In addition, *K. pneumonia* is pathogenic and *C. butyricum* is difficult to be genetically engineered. Efforts have thus turned to non-pathogenic, heterologous hosts, such as *E. coli* (Tang et al., 2009) and *C. acetobutylicum* (González-Pajuelo et al., 2005), that can be readily genetically engineered. As an alternative host, we engineered *C. beijerinckii* DSM 791 to increase its ability to produce 1,3-PDO from glycerol by overexpressing *E. coli* GDH and DHAK, which have not been studied in previous metabolic engineering studies for 1,3-PDO production. Further enhancement in 1,3-PDO production by *C. butyricum* A1 may be achieved by also expressing *E. coli yqhD* (PDOR).

4. Conclusions

C. beijerinckii DSM 791 produced 1,3-PDO from glycerol as the main product at a high yield of 0.55 g/g. Replacing yeast extract with corn steep liquor as the nitrogen source can not only reduce the medium cost but also improve cell growth and fermentation productivity. Cell immobilization in a fibrous bed bioreactor allowed for stable, long-term 1,3-PDO production in repeated batch fermentations, which partially circumvented the 1,3-PDO inhibition problem. Overexpressing *E. coli* GDH and DHAK, was an effective metabolic engineering strategy to increase 1,3-PDO production from glycerol because of increased growth rate and possibly increased tolerance to 1,3-PDO.

Acknowledgements

The authors acknowledge CNPq, FAPERJ, CAPES through PDSE Program and the Human Resources Program 13 of the National Petroleum Agency (ANP – PRH 13) for scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.020.

References

Biebl, H., Marten, S., Hippe, H., Deckwer, W.D., 1992. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 592–597.
Celińska, E., 2010. Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. Biotechnol. Adv. 28, 519–530.
Chatzifragkou, A., Dietz, D., Komaitis, M., Zeng, A.P., Papanikolaou, S., 2010. Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. Biotechnol. Bioeng. 107, 76–84.
Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Kopsahelis, N., Kachrimanidou, V., Dorado, M.P., Koutinas, A.A., 2014. Biorefinery development through utilization of biodiesel industry by-products as sole fermentation feedstock for 1,3-propanediol production. Bioresour. Technol. 159, 167–175.
Chen, Z., Liu, H., Liu, D., 2009. Regulation of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in *Klebsiella pneumoniae* by overexpression of *dhaT* and *dhaD* genes. Enzyme Microbiol. Technol. 45, 305–309.
de Souza, E.A., Rossi, D.M., Ayub, M.A.Z., 2014. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1. Renewable Energy 72, 253–257.
González-Pajuelo, M., Andrade, J.C., Vasconcelos, I., 2004. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31, 442–446.
Gonzalez-Pajuelo, M., Meynial-Salles, I., Mendes, F., Andrade, J.C., Vasconcelos, I., Soucaille, P., 2005. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. Metab. Eng. 7, 329–336.
Gungormusler, M., Gonen, C., Ozdemir, G., Azbar, N., 2010a. 1,3-Propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. New Biotechnol. 27, 782–788.
Gungormusler, M., Gonen, C., Azbar, N., 2010b. Comparative evaluation of *Clostridium beijerinckii* (NRRL B-593) and *Klebsiella pneumoniae* for 1,3-propanediol production. J. Biotechnol. 150, 210–211.
Gutknecht, R., Beutler, R., Gaarcia-Alles, L.F., Baumann, U., Erni, B., 2001. The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor. EMBO J. 20, 2480–2486.
Hao, J., Wang, W., Tian, J., Li, J., Liu, D., 2008. Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing *dhaT* gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 735–741.
Jensen, T.O., Kvist, T., Mikkelsen, M.J., Westermann, P., 2012. Production of 1,3-PDO and butanol by a mutant strain of *Clostridium pasteurianum* with increased tolerance towards crude glycerol. AMB Express 44, 1–7.
Jiang, W., Zhao, J., Wang, Z., Yang, S.T., 2014. Stable high-titer n-butanol production from sucrose and sugarcane juice by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in repeated batch fermentations. Bioresour. Technol. 163, 172–179.
Kaur, G., Srivastava, A.K., Chand, S., 2012. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. Biochem. Eng. J. 64, 106–118.
Kubiak, P., Leja, K., Myszka, K., Celińska, E., Spychała, M., Szymanowska-Powałowska, D., Czaczyk, K., Grajek, W., 2012. Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthetize 1,3-propanediol from glycerol. Process Biochem. 47, 1308–1319.
Lee, C.S., Aroua, M.K., Daud, W.M.A.W., Cognet, P., Pérès-Lucchese, Y., Fabre, P.-L., Reynes, O., Latapie, L., 2015. A review: conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. Renewable. Sustainable Energy Rev. 42, 963–972.
Lu, C., Dong, J., Yang, S.T., 2013. Butanol production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation-gas stripping process. Bioresour. Technol. 143, 467–475.
Maervoet, V.E., De Mey, M., Beauprez, J., De Maeseneire, S., Soetaert, W.K., 2011. Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. Org. Process Res. Dev. 15, 189–202.
Maervoet, V.E., De Maeseneire, S.L., Avci, F.G., Beauprez, J., Soetaert, W.K., De Mey, M., 2014. 1,3-propanediol production with *Citrobacter werkmanii* DSM17579: effect of a *dhaD* knock-out. Microb. Cell Fact. 13, 70.
Otte, B., Grunwaldt, E., Mahmoud, O., Jennewein, S., 2009. Genome shuffling in *Clostridium diolis* DSM 15410 for improved 1,3-propanediol production. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7610–7616.
Parekh, M., Formanek, J., Blaschek, H.P., 1999. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 152–157.
Saint-Amans, S., Perlot, P., Goma, G., Soucaille, P., 1994. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. Biotechnol. Lett. 16, 831–836.
Saxena, R.K., Anand, P., Saran, S., Isar, J., 2009. Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. Biotechnol. Adv. 27, 895–913.
Seo, J.W., Seo, M.Y., Oh, B.R., Heo, S.Y., Baek, J.O., Rairakhwada, D., Luo, L.H., Hong, W. K., Kim, C.H., 2010. Identification and utilization of a 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme for production of 1,3-propanediol from glycerol in *Klebsiella pneumoniae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, 659–666.
Sun, J., van den Heuvel, J., Soucaille, P., Qu, Y., Zeng, A.P., 2003. Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. Biotechnol. Progr. 19, 263–272.
Szymanowska-Powałowska, D., 2015. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. Electron. J. Biotechnol. 18, 128–133.
Tang, X.M., Tan, Y.S., Zhu, H., Zhao, K., Shen, W., 2009. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 75, 1628–1634.
Wilkens, E., Ringel, A.K., Hortig, D., Willke, T., Vorlop, K.D., 2012. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93, 1057–1063.

Wischral, D., Barcelos, C.A., Pereira Jr., N., Pessoa, F.L.P., 2015. 1,3-Propanediol: statistical optimization of medium to improve production by *Clostridium beijerinckii* DSM 791. J. Adv. Biotechnol. 5, 614–623.

Xu, Y.Z., Guo, N.N., Zheng, Z.M., Ou, X.J., Liu, H.J., Liu, D.H., 2009. Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. Biotechnol. Bioeng. 104, 965–972.

Yu, M., Du, Y., Jiang, W., Chang, W.-L., Yang, S.-T., Tang, I.-C., 2012. Effects of different replicons in conjugative plasmids on transformation efficiency, plasmid stability, gene expression and *n*-butanol biosynthesis in *Clostridium tyrobutyricum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93, 881–889.

Zhao, L., Zheng, Y., Ma, X., Wie, D., 2009. Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1,3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. Bioprocess Biosyst. Eng. 32, 313–320.

Zheng, P., Wereath, K., Sun, J., Van den Heuvel, J., Zeng, A.P., 2006. Overexpression of genes of the *dha* regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. Process Biochem. 41, 2160–2169.

Zhu, J.G., Li, S., Ji, X.J., Huang, H., Hu, N., 2009. Enhanced 1,3-propanediol production in recombinant *Klebsiella pneumoniae* carrying the gene *yqhD* encoding 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme. World J. Microbiol. Biotechnol. 25, 1217–1223.