



## X Oktoberfórum – PPGEQ

04 a 07 de outubro de 2011

### BIOCONVERSÃO DE GLICEROL RESIDUAL DA SÍNTESE DE BODIESEL EM 1,3-PROPANODIOL E ETANOL POR *K.PNEUMONIAE*

Daniele Misturini Rossi<sup>1</sup>, Marco Antônio Záchia Ayub<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bioteclab -UFRGS

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,

E-MAIL: [dmisturini@gmail.com](mailto:dmisturini@gmail.com), [mazayub@ufrgs.br](mailto:mazayub@ufrgs.br)

**Resumo:** Glicerol residual oriundo da síntese de biodiesel está se tornando uma grande preocupação ambiental e econômica devido ao seu aumento, já que a produção de biodiesel está em crescente ascensão. No presente estudo, bactérias provenientes de um consórcio ambiental foram isoladas e identificadas pela sua habilidade em converter glicerol residual a 1,3-propanodiol (1,3-PD) e etanol. As melhores produtoras de ambos os produtos foram identificadas por 16 S rDNA como sendo *Klebsiella pneumoniae* e *Pantea agglomerans*. Cultivos em bioreatores batelada foram realizados em aerobiose e anaerobiose com a finalidade de estudar a cinética de consumo de glicerol e formação de produtos. Os resultados mostraram que um isolado, nomeado como *Klebsiella pneumoniae BLh-1*, foi capaz de produzir até 9.4 g/L de 1,3-PD com rendimentos de 0,41 mol.mol<sup>-1</sup> glicerol e 6,1 g/L de etanol com rendimento de 0,14 mol.mol<sup>-1</sup> glicerol sob condições anaeróbicas, mostrando-se de grande potencial para utilização em bioprocessos.

**Palavras-chave:** glicerol residual, 1,3-propanodiol, etanol, biodiesel, consorcio bacteriano.

## 1. Introdução

O desenvolvimento de pesquisas para a produção de bio-combustíveis alternativos têm sido bastante significativo nos últimos anos, devido principalmente à preocupação com a exaustão das reservas de combustíveis fósseis, como por exemplo, o petróleo. Desta forma a produção de biodiesel e bioetanol têm emergido como uma das estratégias mais viáveis no que diz respeito a fontes não convencionais de energia. Dentre os combustíveis renováveis mais promissores destaca-se o biodiesel. Este produto é, em geral, obtido a partir da transesterificação de óleos vegetais com álcoois (metanol e etanol), usando catálise básica ou pela esterificação desses materiais na presença de catalisadores ácidos. A grande produção de biodiesel leva também a formação de bioprodutos secundários, entre eles, o glicerol.

O glicerol é gerado em grandes quantidades durante a produção de biodiesel. Logo, com o aumento evidente da produção deste biocombustível no Brasil e no mundo, o glicerol passará a ser um subproduto excedente. Este grande aumento na produção de biodiesel já surtiu efeito no preço do glicerol, o qual caiu drasticamente nos últimos anos. (YAZDANI & GONZALES, 2007). Uma alternativa para utilização deste subproduto é a sua conversão em bioprodutos como 1,3-PD (monômero básico na indústria de polímeros), PHAs (polihidroxicanoatos), ácido cítrico, bioplásticos, produção de enzimas como lipases,

hidrogênio e etanol (PAPANIKOLAOU et al., 2008, da SILVA et al., 2010).

Há pelos menos 50 anos sabe-se que glicerol é fermentada por bactérias anaeróbicas facultativas a 1,3-PD, etanol, 2,3 butanodiol, ácido acético e lático. Entre estas substâncias, 1,3-PD tem recebido muita atenção devido a sua ampla aplicação em polímeros, cosméticos, alimentos, adesivos, lubrificantes, laminados e solventes (HOMANN et al., 1990; SAXENA et al., 2009).

A maior parte do 1,3-PD produzido comercialmente tem sido produzido, principalmente, através da conversão química da acroleína pela DuPont ou através do óxido de etileno pela Shell. A DuPont utiliza acroleína na síntese a qual sofre uma hidratação catalítica a 3-hidroxiopropanol seguida por hidrogenação para produzir 1,3-PD. A Shell produz 1,3-PD pela hidroformilação do óxido de etileno seguido por hidrogenação. No primeiro caso, o rendimento não excede 40% e está em torno de 80% no segundo caso. Os problemas destes processos convencionais são as altas pressões aplicadas nas etapas de hidroformilação e hidrogenação seguidas de altas temperaturas, uso de catálise de alto custo e liberação de intermediários tóxicos (BIEBL et al., 1999; HOMANN et al., 1990; SAXENA et al., 2009). Diante deste fato, a utilização de microrganismos para a produção de 1,3-PD poderia diminuir grandemente os custos de produção.

1,3-PD é um típico produto da fermentação do glicerol e não tem sido encontrado em conversões anaeróbicas de outros substratos orgânicos. Somente

poucos organismos, a maioria deles bactérias, são capazes de formá-lo. Estes organismos incluem enterobactérias do gênero *klebsiella* (*klebsiella pneumoniae*), *enterobacter* e *citrobacter* (*c.freundii*), *lactobacillus* (*l. brevis* e *l. buchneri*) e espécies de *clostridiuns* dos grupos *C. butyricum* e *C. parteurianum* (CHEN & LIN, 2003; CHENG, LIU e LIU, 2004; BARBIRATO, SOUCAILLE e BORIES, 1996; BIEBL *et al.*, 1992).

Em relação à produção de etanol existem na literatura poucos trabalhos voltados para sua produção a partir de glicerol residual. O trabalho desenvolvido por Ito *et al.* (2005), é um dos únicos artigos voltados especificamente para a produção de etanol e hidrogênio a partir do glicerol proveniente da produção de biodiesel. Neste trabalho, os autores utilizaram o microrganismo *Enterobacter aerogenes* HU-101, isolado de um lodo metanogênico alcançando rendimentos de 0,67 mol/mol glicerol residual. Estudos utilizando o microrganismo *klebsiella pneumoniae* para a produção de 1,3-propanodiol têm mostrado uma significativa produção de etanol como bioproduto. Mu *et al.* (2006), utilizaram *klebsiella pneumoniae* DSM 2026, para a produção de 1,3-propanodiol com glicerol puro e glicerol derivado da síntese química e da síntese catalisada por enzima em fermentações em shaker e batelada alimentada. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que houve uma significativa produção de etanol tanto no cultivo com glicerol puro (10,3 g/L) como com o glicerol derivada da síntese química (11,9 g/L).

O objetivo do trabalho foi isolar novas bactérias capazes de converter eficientemente o glicerol em produtos biotecnológicos como o 1,3-PD e etanol. Desta forma, pretende-se agregar valor ao processo de síntese de biodiesel, pela recuperação do glicerol, pela produção de produtos de valor agregado, além de contribuir para a formulação de processos ambientalmente mais limpos.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1-Glicerol residual

O glicerol residual foi obtido de uma empresa local (Passo Fundo, RS, Brasil). O glicerol residual continha: 80,93% de glicerol, 6,65% NaCl e o restante era composto de umidade e cinzas. O pH é de 7,26.

### 2.2-Isolamento bacteriano e degradação do glicerol residual usando consórcio microbiano

O consórcio microbiano foi coletado de um reator de fluxo ascendente (reator UASB) de uma planta de tratamento de soja localizada em Canoas, RS. Amostras foram coletadas e imediatamente refrigeradas para posterior utilização. Fermentações em bioreatores de 2L foram realizadas primeiramente para testar a habilidade das bactérias do consórcio microbiano em consumir o glicerol residual como única fonte de carbono e verificar a produção de produtos de interesse. Antes de iniciar o inóculo, o consórcio microbiano foi submetido a um tratamento térmico (95°C, 15 min) para inibir a presença de bactérias metanogênicas e então foi inoculado a 10% (v/v) nos bioreatores a pH 7,0, 35 °C, 250 rpm por 48 horas. Para assegurar as condições anaeróbias nitrogênio foi borbulhado por um período de 30 minutos antes do início da fermentação. O meio sintético utilizado na fermentação

continha (g/l): 4 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.0125 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.12 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.01 MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0.025 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.005 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.125 CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, e 70 g de glicerol residual. Fermentações nas mesmas condições foram realizadas com glicerol puro (> 95% pureza) como controle.

Para o isolamento, amostras foram coletadas a cada 3 horas e foram diluídas seriamente em água peptonada estéril (0,1%), sendo que 0,1 mL destas diluições foram plaqueadas em triplicata em ágar nutriente e Agar McConkey e incubadas por 24/48 horas a 35°C. Após incubação a contagem de colônias foi realizada e colônias representativas foram plaqueadas isoladamente em agar LB (Luria Bertani) e armazenadas em glicerol a -20°C para posterior identificação. A morfologia das células foi determinada através da coloração de Gram.

### 2.3-Identificação por 16 S rDNA e análise genética

O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

### 2.4 Fermentações em shaker

As bactérias isoladas na fermentação com consórcio microbiano ambiental foram cultivadas separadamente para testar a habilidade de produzirem 1,3-PD e etanol. Ensaios em shaker foram realizados em aerobiose e anaerobiose. Os cultivos aeróbios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio a 37 °C, pH inicial 7,0 e 150 rpm em agitador orbital por 24 horas. Os ensaios em anaerobiose foram realizados em frascos de penicilina de 60 mL com volume de trabalho de 30 mL fechados com tampas de borracha e posteriormente selados com lacres de alumínio. O headspace dos frascos foram insuflados com nitrogênio imediatamente antes de serem lacrados. As condições de cultivo utilizadas foram: temperatura de 37 °C, pH inicial 7,0 e 150 rpm por 24 horas. Os frascos foram inoculados com seringa e agulha estéreis. As amostras foram coletadas após 24 horas e centrifugadas (Sigma Laboratory Centrifuges 4K15, England) a 3500 g por 15 minutos a 4 °C, filtradas em membrana de 0,22 µm (Sartorius, Alemanha) e congeladas para posterior análise cromatográfica. Ambos os ensaios foram inoculados a 5% (v/v), com D.O (densidade óptica) 1,0 a 600 nm, com um inóculo crescido overnight a 37 °C e 150 rpm. O meio utilizado nas fermentações foi (g/L): 4 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.52 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.5 extrato de levedura, 1 peptona, 30 g de glicerol residual e 1 ml de elemento traço, o qual continha (g/L): 0.1 MnCl<sub>2</sub>.4 H<sub>2</sub>O, 0.06 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.0037 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.2 CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.025 NiCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O, 0.035 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O, 0.14 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.9 mL HCl 37%.

### 2.5. Fermentações em bioreatores

A bactéria isolada, identificada como *Klebsiella pneumoniae* BLh-1, foi selecionada para os cultivos em bioreatores batelada por apresentar maior produção de 1,3-PD e etanol nas fermentações em shaker. Os experimentos foram realizados em bioreatores de 2L (biostat-b.braun-

germany). a 37 °c , 350 rpm e 1 vvm (2 l/min) com pH controlado a 7,0 pela adição de NaOH 1M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M. Os bioreatores foram inoculados com 10% (v/v) de um inóculo crescido overnight a 37 °C e 150 rpm em frasco erlenmeyer de 500 ml com 200 ml de meio. O inóculo foi padronizado a D.O 1,0 a 600 nm antes de ser inoculado, o que corresponde a 0,78 g/l de células. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

## 2.6- Análises cromatográficas

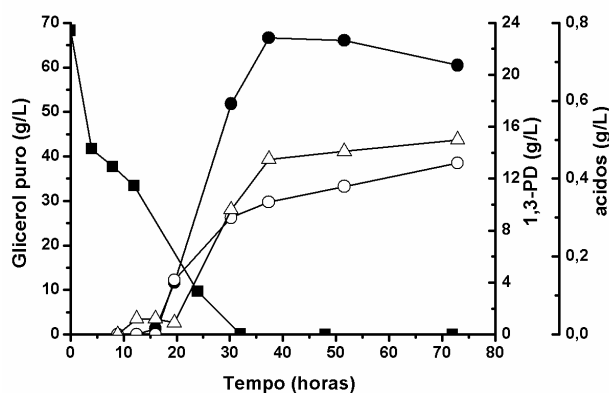
A análise dos produtos formados foi determinada por cromatografia de alto desempenho (HPLC), equipamento Shimadzu equipado com uma coluna aminex HPX-87H (Bio-rad) e detector de índice de refração, utilizando fase móvel ácido sulfúrico 0,005 M (0,8 ml/min) e temperatura do forno de 65°C.

## 3. Resultados e Discussões

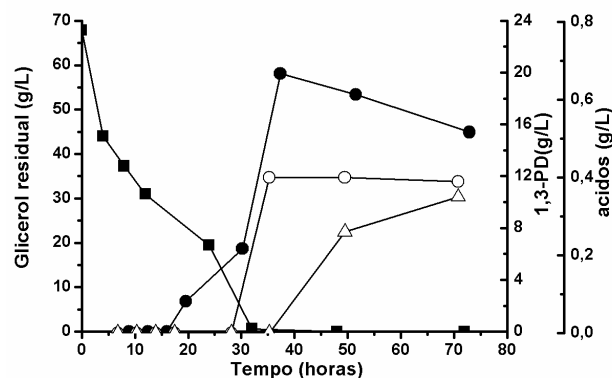
### 3.1- Capacidade do consórcio microbiano em degradar glicerol

Os ensaios realizados em bioreator com consórcio microbiano ambiental tiveram bons resultados com relação à utilização do glicerol. Ambos os cultivos, com glicerol puro e glicerol residual, consumiram a quantidade total de substrato em 48 horas. As figuras 1 e 2, mostram os cultivos realizados com glicerol puro e glicerol residual, respectivamente.

De acordo com a figura 1, pode-se observar o total consumo do glicerol em 32 horas com uma produção máxima de 1,3-PD de 22,84 g/L. A produção com glicerol residual foi um pouco menor, 19,92 g/L, mas um consumo total de glicerol foi observado após 32 horas de cultivo. Houve a produção de ácidos em pequenas quantidades durante a fermentação. Estes ácidos estão relacionados com os bioprodutos de fermentação das bactérias existentes no consórcio microbiano. Isto indica que o consórcio microbiano utilizado neste trabalho continha tanto enterobactérias, associadas à produção de ácidos, como espécies de *Clostridium*, associadas à produção de ácido butírico.



**Figura 1.** Cultivo anaeróbico com glicerol puro. Os símbolos indicam: (-■-) glicerol (-●-) 1,3-PD, (-○-) ácido acético, (-△-) ácido butírico.

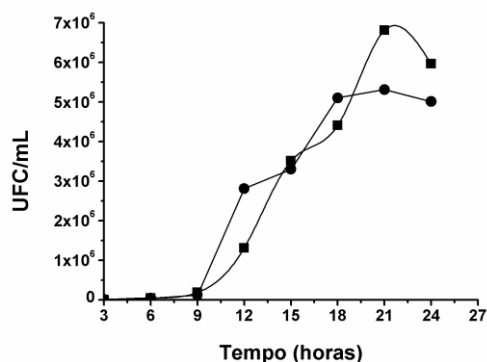


**Figura 2.** Cultivo anaeróbico com glicerol residual. Os símbolos indicam: (-■-) glicerol residual, (-●-) 1,3-PD, (-○-) ácido acético, (-△-) ácido butírico.

Existem vários trabalhos na literatura utilizando o consórcio microbiano, porém a maior parte utiliza-o para a produção de hidrogênio com açúcar como principal fonte de carbono (Mohan, 2008; Cheong and Hansen, 2006). Nestes processos, conhecidos como Dark fermentation, um grande grupo de bactérias estão presentes, entre elas, espécies de *Clostridium*, anaeróbios facultativos (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*), e poucos aeróbios (*Alcaligenes*, *Bacillus*) (Biebl et al., 1992; Das, 2007; Zheng et al., 1993). Nossos resultados, apresentados nas figuras 1 e 2, mostraram que algumas destas espécies estavam presentes no consórcio e foram capazes de converter o glicerol em 1,3-PD. Nesta etapa etanol não foi produzido.

### 3.2- Isolamento e identificação das bactérias do consórcio microbiano

Na etapa de isolamento, 32 tipos diferentes de colônias foram isoladas e depois repicadas novamente em meio LB para manter a cultura pura. Em todas as amostras foram realizadas colorações de Gram e dos 32 isolados selecionados apenas o de número 18 foi classificado como bacilo-gram positivo. Todos os outros isolados apresentaram como bacilos-gram negativos. A figura 3 apresenta a cinética do cultivo em unidades formadoras de colônias por mL de amostra (UFC/mL). O plaqueamento foi realizado durante 24 horas onde foi observado um crescimento exponencial do consórcio até 20 horas, com um crescimento máximo de  $7 \cdot 10^6$  UFC/mL observado em ágar nutriente. O ágar McKonkey apresentou um crescimento sensivelmente menor ( $5 \cdot 10^6$  UFC/mL). O ágar McKonkey é um meio de plaqueamento diferencial para a seleção e isolamento de *Enterobacteriaceae* e bacilos gram-negativos. Os sais biliares e o cristal violeta no Agar McKonkey inibem o crescimento de bactérias gram-positivas e de algumas bactérias gram-negativas exigentes (WINN et al., 2008). Este meio foi utilizado para a seleção de enterobactérias, já que a maior parte das bactérias descritas na literatura como produtoras de 1,3-PD são enterobactérias, como por exemplo, espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella*. O ágar nutriente é um meio simples usado para cultivo preliminar de amostras e isolamento de organismos para culturas puras.

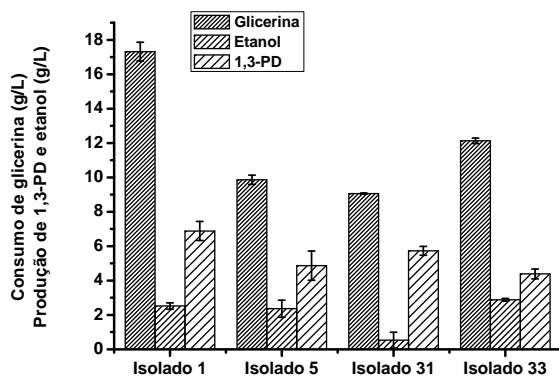


**Figura 3:** Cinética de cultivo em bioreator com consórcio microbiano ambiental. Os símbolos representam: (●) ágar MacKonkey, (■) ágar nutriente.

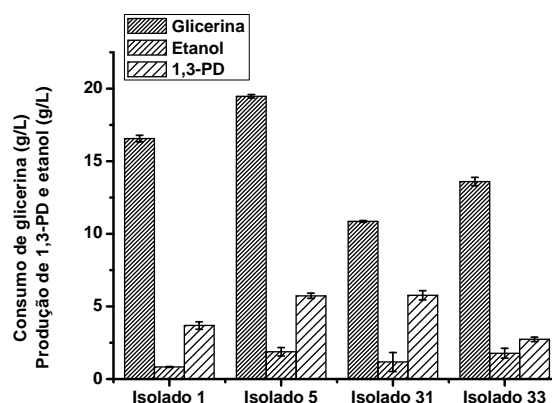
A identificação por 16S rDNA mostrou que os isolados 1 e 5 tiveram 96% de semelhança com *Klebsiella pneumoniae*, o isolado 31 teve 83% de semelhança com *Klebsiella pneumoniae* e o isolado 33 teve 93% de semelhança com *Pantoea Agglomerans*.

### 3.3- Fermentações em shaker

Com a finalidade de testar as bactérias isoladas (item 3.2), experimentos em shaker com cada uma das bactérias isoladas foram realizados em aerobiose e anaerobiose. Das 32 bactérias isoladas apenas quatro apresentaram a habilidade de degradar o glicerol e produzir 1,3-PD e etanol. As figuras 4 e 5 mostram os resultados dos cultivos em shaker com as bactérias que apresentaram maior produção de 1,3-PD e etanol bem como o glicerol consumido após 24 h em anaerobiose e aerobiose, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A maior produtora de 1,3-PD e etanol em anaerobiose foi o isolado 1 com 6,88 g/L seguida pelo isolados 5 que produziu 5,73 g/L. Em aerobiose, os isolados 5 e 31 apresentaram a maior produção de 1,3-PD, de 5,76 g/L e 5,73 g/L, respectivamente. Em relação à degradação do glicerol, os isolados 1 (anaerobiose) e 5 (aerobiose) apresentaram o maior consumo após 24 horas.



**Figura 4:** Fermentação em shaker dos isolados em anaerobiose.



**Figura 5:** Fermentação em shaker dos isolados em aerobiose.

Homman *et al.* (1990) isolaram bactérias do lodo e selecionaram seis isolados caracterizados como *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*. As bactérias selecionadas produziram em shaker de 9,34 a 13,14 g/L de 1,3-PD utilizando 20 g/L de glicerol a pH 7,0 em anaerobiose. Os autores verificaram a produção de bioprodutos como etanol, ácido lático e ácido acético. Hao *et al.* (2008) isolaram e caracterizaram 6 cepas de *Citrobacter freundii* e 2 cepas de *Klebsiella pneumoniae* do solo. A cepa isolada TUAC01 produziu em aerobiose 11 g/L de 1,3-PD e 2,5 g/L de etanol em ensaios em shaker. Moon *et al.* (2010) estudaram o efeito do glicerol bruto submetido a diferentes tratamentos para a produção de 1,3-PD por diferentes microrganismos (DSM 2477, DSM 2478, DSM 15410, DSM 2026, DSM 7499). Os autores verificaram que as maiores produções de 1,3-PD ocorreram com a cepa DSM 2026, o qual é uma *Klebsiella pneumoniae* que obteve 12,5 g/L.

Embora a utilização de glicerol residual na fermentação ofereça uma notável vantagem em relação ao uso do glicerol comercial, a maior parte dos estudos para produção microbiana de 1,3-PD tem sido realizada com glicerol comercial. Na verdade, existem poucas pesquisas publicadas na literatura que investigaram o potencial uso do glicerol residual para produção de 1,3-PD, etanol e também hidrogênio (ROSSI *et al.*, 2011, ITO *et al.*, 2005; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008; REHMAN *et al.*, 2008). De acordo com os resultados em shaker, o isolado 1 nomeado como *Klebsiella pneumoniae* BLh-1, foi utilizado nos ensaios em fermentadores.

### 3.4- Fermentações em bioreatores

Experimentos com o isolado *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 foram realizados em aerobiose e anaerobiose a fim de confirmar a produção de 1,3-PD e etanol. As figuras 6 e 7 mostram os resultados para *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 em anaerobiose e aerobiose, respectivamente. Nos ensaios anaeróbios, a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) foi 0,38 h<sup>-1</sup> e as taxas de conversão de substrato em célula e substrato em produto foram 0,03 g células/g glicerol e 0,34g 1,3-PD/g glicerol, respectivamente. A produção de 1,3-PD máxima foi 9,40 g/L em 28 horas com 0,167 g/L.h de produtividade.

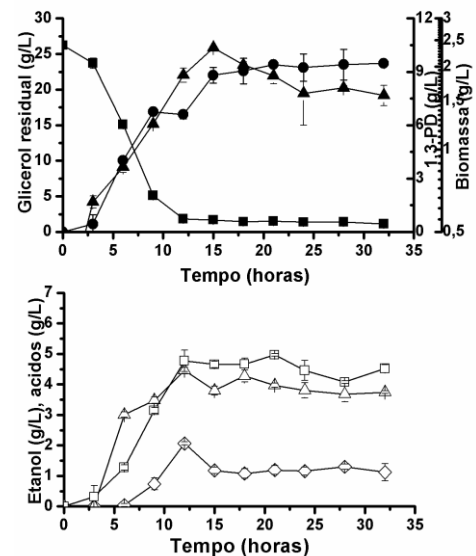
Glicerol residual permaneceu em concentração abaixo de 1 g/L após 12 horas de cultivo.

Os experimentos em aerobiose mostraram uma produção de 1,3-PD menor quando comparado ao ensaio anaeróbico, porém a glicerol residual foi completamente consumido após 15 horas de fermentação. Na presença de oxigênio, mais substrato foi utilizado para as necessidades da célula, com isso, mais biomassa foi produzida com menor rendimento de 1,3-PD. A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) foi  $0,37 \text{ h}^{-1}$  e as taxas de conversão de substrato em célula e substrato em produto foram  $0,17 \text{ g células/g glicerol}$  e  $0,30 \text{ g 1,3-PD/g glicerol}$ , respectivamente. A produção máxima de 1,3-PD foi de  $6,12 \text{ g/L}$  em 12 horas de cultivo e uma produtividade de  $0,25 \text{ g/L.h}$ .

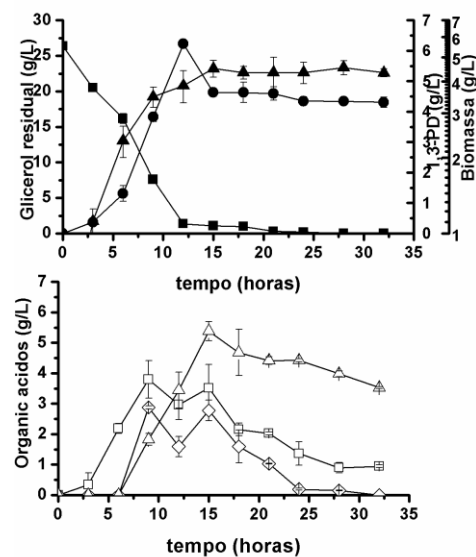
Os principais produtos formados em anaerobiose foram etanol e ácido acético (Figura 6), com produções de  $4,96 \text{ g/L}$  e  $4,45 \text{ g/L}$ , respectivamente. Ácido láctico foi produzido em menor concentração ( $2 \text{ g/L}$ ) e permaneceu constante até o fim do cultivo. Na presença de oxigênio, a formação de etanol foi menor enquanto que ácido acético aumentou até 15 horas, alcançando  $5,4 \text{ g/L}$  (Figura 7). Após este período, todos os produtos foram diminuindo nos cultivos aeróbios. É provável que os ácidos produzidos no início tenham sido reutilizados até ao final da fermentação (Figura 7). Em aerobiose a maior produção de etanol foi de  $3,8 \text{ g/L}$ .

Fermentações batelada são um método simples e frequentemente usado para uma investigação primária do processo de fermentação. Os resultados presentes neste trabalho mostraram que a *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 foi capaz de degradar o glicerol residual com a produção de 1,3-PD de um modo similar aos reportados por outros autores onde glicerol puro foi utilizado (Hao et al., 2008, Mu et al., 2006).

Etanol foi o principal bioproduto da fermentação do glicerol comparado a produção de ácidos (Figuras 6). Este resultado mostra a habilidade das espécies de *Klebsiella* em formar importantes bioproductos como o etanol e, em menores proporções, ácido láctico e acético. Jarvis et al. (1997) demonstraram que formato e etanol são os principais produtos da fermentação da glicerol por *Klebsiella planticola* isolada do rumen. Estudos com espécies de *Klebsiella pneumoniae* mostraram que quando a concentração de glicerol é limitante, a formação de massa celular é otimizada e etanol é produzido. Quando há um excesso de glicerol no meio, 1,3-PD é produzido e a produção de etanol diminui significativamente. Uma das razões para esta diferença fisiológica pode estar relacionada ao fluxo de carbono da oxidação do glicerol que é desviado para a glicólise, o qual conduz a formação de produtos derivados do piruvato tais como etanol, o qual competem diretamente com a biossíntese do 1,3-PD por NADH (Biebl et al., 1999).



**Figura 6:** Fermentação anaeróbica com *Klebsiella pneumoniae* BLh-1: Os símbolos representam: (-■-) glicerol residual, (-●-) 1,3-PD, (-▲-) biomassa (g/L), (-□-) etanol (g/L), (-Δ-) ácido acético (g/L), (-◇-) ácido láctico (g/L) Resultados são média de experimentos em duplicata.



**Figura 7:** Fermentação aeróbica com *Klebsiella pneumoniae* BLh-1: Os símbolos representam: (-■-) glicerol residual, (-●-) 1,3-PD, (-▲-) biomassa (g/L), (-□-) etanol (g/L), (-Δ-) ácido acético (g/L), (-◇-) ácido láctico (g/L) Resultados são média de experimentos em duplicata.

#### 4-Conclusões

Embora a utilização do glicerol na fermentação ofereça uma notável vantagem em relação ao glicerol puro, a maior parte dos estudos para a produção de 1,3-PD tem sido realizada usando glicerol puro, com somente poucos trabalhos reportados usando glicerol residual da síntese de biodiesel para produção de 1,3-PD e etanol. Os resultados obtidos no presente trabalho com glicerol residual tiveram resultados comparáveis aos trabalhos da literatura com glicerol puro. Experimentos com condições otimizadas já mostraram um grande aumento na produção

de ambos os produtos. Estes resultados fazem parte da tese de doutorado que será defendida até março de 2012.

##### 5- Referências

1. BARBIRATO, F.; SOUCAILLE, P.; BORIES, A. Physiologic mechanisms involved in accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.12, p.4405-4409, 1996.
2. 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, n.5, p.592-597, 1992.
3. BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 52, n 3, p. 289-297, 1999.
4. CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Advances in environmental research*, vol.07, p.695-699, 2003.
5. CHENG, K.K.; LIU, D.H.; SUN, Y.; LIU, W.B. 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. *Biotechnology Letters*, v.26, n.11, p.911-915, 2004.
6. CHEONG D.Y., HANSEN C.L Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* ; 72:635-643, 2006.
7. HAO, J.; LIN, R.; ZHENG, Z.; LIU, H.; LIU, D. Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3 propanediol under aerobic conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.24, p.1731-1740, 2008.
8. HOMANN, T.; TAG, C.; BIEBL, H.; DECKWER, W.D.; SCHINK, B. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p.121-126, 1990.
9. ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, p.260-265, 2005.
10. JARVIS GN, MOORE ERB, THIELE JH Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *J Appl Microbiol* 1997; 83(2):166-174.
11. KOTAY, S.M.M., DAS, D. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* iit-bt s1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresource technology*, 2007;98:1183-1190.
12. MOHAN, S.V. Fermentative hydrogen production with simultaneous wastewater treatment: influence of pretreatment and system operating conditions. *Journal Science Industrial Research*; 67:950-961, 2008.
13. MOON, C.; AHN, J.-H.; KIM, S.W.; SANG, B.; UM, Y.Y. Effect of biodiesel-derived raw glycerol on 1,3-Propanediol production by different microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161, p.502-510, 2010.
14. MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D.-J.; WANG, W.; XIU, Z.L. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnology Letters*, v.28, p.1755-1759, 2006.
15. PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, n.1, p.60-71, 2008.
16. REHMAN, A.; MATSUMURA, M.; NOMURA, N.; SATO, S. Growth and 1,3-Propanediol production on pre-treated sunflower oil bio-diesel raw glycerol using a strict anaerobe *Clostridium butyricum*. *C Resource Bacteriology*, v. 1, n.1, p.7-16, 2008.
17. ROSSI, D.M, COSTA, J.B, SOUZA, E.A, PERALBA, M.C, AYUB, M.A.Z. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. *I J Hydrogen Energy* 36:4814-4819, 2011.
18. SAXENA, R.K.; ANAND, P.; SARAN, S.; ISAR, J. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, 27(6), p.895-913, 2009.
19. VIEIRA, A.M.S.; BERGAMASCO, R.; GIMENES, M.L.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D. Enumeration and isolation of facultative anaerobic bacteria in an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating wastewater from a gelatine industry. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v.25, n.2, p.257-260, 2003.
20. WINN, W.J.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Koneman, Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. Sexta edição, Editora Guanabara koogan, Rio de Janeiro, p.1595, 2008.
21. YAZDANI, S.S, GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for biofuels industry. *Current opinion biotechnology*; 18:213-219, 2007.
22. YAZDI, M.K.S.; KHALILI, M.B. Isolation and identification of bacteria present in the activated sludge unit, in the treatment of industrial waste water. *Iranian Journal of Public Health*, v.30, n.3-4, p.91-94, 2001.
23. ZENG, A.P, BIEBL, H, SCHLIEKER, H, DECKWER W.D Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme microbiology technology* ; 15(9):770-779, 1993.