



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

## **BIOTRANSFORMAÇÃO DO GLICEROL - SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Miguel Angel Aparicio Rodríguez  
Engenheiro Químico, UEM, 1988  
Mestre Engenharia Química, UEM, 1998

Orientador: Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD  
Coorientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Gisella Maria Zanin

Tese submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química, área de Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR – Brasil  
Agosto de 2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

R696b      Rodríguez, Miguel Angel Aparicio  
            Biotransformação do glicerol - subproduto da  
            produção de biodiesel / Miguel Angel Aparicio  
            Rodríguez. -- Maringá, 2010.  
            139 f. : il. color.

            Orientador: Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes.  
            Co-orientadora: Prof.a Dr.a Gisella Maria Zanin.  
            Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de  
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química, 2010.

            1. Fermentação. 2. Glicerol. 3. *Klebsiella*  
*oxytoca*. 4. 1,3-propanodiol. 5. Biodiesel. I.  
Moraes, Flávio Faria de, orient. II. Universidade  
Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia.  
Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDD 22. ed. 660.6  
masa-000290

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Miguel Angel Aparicio Rodríguez perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 20 de agosto de 2010.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes  
Orientador



Profª Drª Gisella Maria Zanin  
Coorientadora



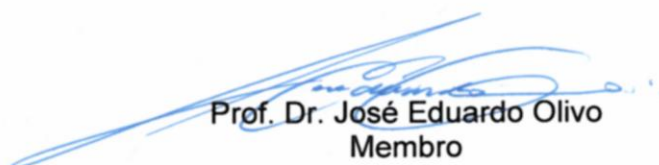
Prof. Jonas Contiero  
Membro



Prof. Dr. Jose Gregorio Cabrera Gomez  
Membro



Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho  
Membro



Prof. Dr. José Eduardo Olivo  
Membro

APARICIO-RODRÍGUEZ, MIGUEL ANGEL

Biotransformação do glicerol – subproduto da produção de biodiesel. [Paraná], 2010.

XIX, 120 p., 29,7 cm. (DEQ/UEM, Dr., Pós-graduação em Engenharia Química, 2010).

Tese – Universidade Estadual de Maringá – PEQ.

1. Fermentação 2. Glicerol 3. *Klebsiella oxytoca* 4. Propanodiol 5. Biodiesel

I. PEQ/UEM. II. Título (série)

## *DEDICATÓRIA*

*Ao Deus criador e pai benelovente que com sua luz e graças sempre me permitiu  
construir uma vida digna e honesta;*

*A meus velhos e amados pais, Verônica e David, que com seu exemplo e trabalho  
me ensinaram tudo o que de valor possuo no coração e na alma;*

*À minha amada esposa Zenilda companheira fiel e sempre solidária nesta  
empreitada;*

*Aos meus lindos e amados filhos: Paulo Augusto, Jader, Samara, Giovana,  
Gabrielle e Jonas, que Deus me permita lhes mostrar o significado verdadeiro do amor.*

## AGRADECIMENTOS

Aos Prof. Flávio Farias de Moraes (PhD) e Dra. Gisella Maria Zanin pela confiança depositada em mim diante de um trabalho com perfil claramente interdisciplinar e extremamente desafiador.

À aluna de IC e grande amiga Aline Gozzi pelo comprometimento e eficiência com que colaborou ao longo destes últimos dois anos neste trabalho de doutorado.

Aos engenheiros Lauro e Luiza cuja ajuda foi imprescindível para superar os diversos obstáculos que surgiram ao longo do tempo.

Aos queridos amigos do DEQ que sempre estiveram lá para animar e estimular nosso trabalho.

Ao Dr. Benício Alves de Abreu Filho pela ajuda no aprendizado das metodologias microbiológicas e bioquímicas utilizadas nesta tese.

A todos os membros do Departamento de Análises Clínicas (DAC/UEM) que colaboraram na fase inicial deste trabalho.

Aos colegas da UTFPR que colaboraram com meu afastamento de sala de aula, permitindo-me dedicar tempo integral ao doutorado.

À Dra Graciette Matioli e a Srta. Cristiane (LEPEMC/DFF/UEM) pelo apoio e solidariedade concretizados pelo empréstimo do CLAE Varian ProStar.

À minha família: Zenilda, Gabrielle, Giovana, Jader, Jonas, Paulo Augusto e Samara pela paciência com que lidaram com todas as dificuldades inerentes a um trabalho deste porte. Vocês são a razão de todo meu esforço e dedicação.

# BIOTRANSFORMAÇÃO DO GLICEROL - SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

**AUTOR: MIGUEL ANGEL APARICIO RODRÍGUEZ**

**ORIENTADOR: PROF. FLÁVIO FARIAS DE MORAES, PhD**

**CO-ORIENTADOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. GISELLA MARIA ZANIN**

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, Bloco E46 – Sala 09; CEP: 87020-900 - Maringá - PR, Brasil, defendida em 20 de agosto de 2010. 119 p.

## RESUMO

A crescente meta de aumento da produção nacional do biodiesel acarretará a geração de uma quantidade cada vez maior de glicerol, subproduto deste processo, com consequente desvalorização do seu preço no mercado nacional e aumento da necessidade de novas rotas de aplicação deste material. Assim, se propôs nesta tese, o estudo do metabolismo microbiano do glicerol e das principais variáveis que o afetam, e adicionalmente, o isolamento de uma bactéria com potencial de transformação desta matéria-prima, em produtos de maior valor comercial. Uma cepa foi isolada a partir de amostras de solo, inoculando-a em meios cuja fonte de carbono era o glicerol padrão PA. A formulação dos meios de isolamento e das condições de fermentação foi bem fundamentada, a partir de uma análise teórica de diversos estudos disponíveis na literatura, sobre a degradação fermentativa de glicerol. A bactéria isolada foi identificada por meio de ensaios bioquímicos como *Klebsiella oxytoca*. Os dados indicaram que o crescimento bacteriano e o consumo de glicerol foram favorecidos em pH 7,4, com ureia como fonte de nitrogênio e baixa concentração inicial de substrato (12,6 g L<sup>-1</sup>). Nestas condições, para um tempo de reação de 48 h, o consumo de glicerol atingiu 99,77 %. Quando altas concentrações de substrato (75,6 g L<sup>-1</sup>) foram utilizadas, o melhor resultado em termos de consumo de glicerol (69,83%) foi obtido para os ensaios com ausência de triptona, uso de tioglicolato como agente redutor de oxigênio e elevada concentração de ureia (4,9 g L<sup>-1</sup>). Os ensaios também mostraram que a adição de triptona (2,0 g L<sup>-1</sup>) somente teve efeito positivo quando a concentração de ureia no meio foi baixa (1,5 g L<sup>-1</sup>). Os principais produtos formados

foram 1,3-propanodiol, formato, 2,3-butanodiol, lactato e acetato, sendo produzidas quantidades muito pequenas de etanol. A maior velocidade de produção de 1,3-propanodiol ocorreu durante a fase logarítmica de crescimento, tanto para glicerol PA ( $5,67 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), quanto para glicerina bruta ( $5,28 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). A análise do perfil de produtos mostrou que ao se retirar os gases formados pela fermentação houve um aumento na produção de etanol. Entretanto, quando o  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  não foram retirados do meio fermentativo, a produção de etanol foi baixa ( $0,15 \text{ g L}^{-1}$ ). A degradação de formato está ligada ao processo de regeneração de NADH. Contudo, o mecanismo de consumo do hidrogênio formado a partir do formato não foi completamente esclarecido. Este mecanismo funciona como uma alternativa de manutenção do equilíbrio de redox do sistema e foi mais ativo na etapa final da fase logarítmica de crescimento ou na fase estacionária. O rendimento de 1,3-propanodiol obtido a partir de  $75,6 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol e da cepa isolada foi igual a 42,90 % e 39,60 %, para glicerol padrão PA e glicerina bruta, respectivamente. Estes resultados são muito próximos daqueles determinados para outras cepas de *K. oxytoca* e *K. pneumoniae* encontradas na literatura, o que valoriza a cepa selecionada. Durante a fermentação do glicerol, o desequilíbrio entre as reações dos ramos oxidativo e redutivo do metabolismo, conduzem ao acúmulo de 3-hidroxiopropanaldeído e a interrupção do crescimento bacteriano. Este fenômeno se deve provavelmente a uma elevada atividade in vivo da enzima glicerol-desidratase, quando comparada às outras enzimas do metabolismo anaeróbico do glicerol, sob as condições experimentais utilizadas. Os dados também indicaram que este desequilíbrio pode ser diminuído pela manutenção de condições microaeróbicas no meio fermentativo. O mecanismo de regeneração de NADH presente na bactéria *Klebsiella oxytoca* parece não estar restrito a uma única direção de fluxo desta conversão (formação das formas reduzida ou oxidada do NAD), porque nas reações catalisadas pelas enzimas glicerol-desidrogenase (ramo oxidativo) e enzima 1,3-propanodiol-desidrogenase (ramo redutivo), o microrganismo consumiu  $\text{H}_2$  parcialmente para regenerar NADH. Esta parece ser uma alternativa metabólica de compensação para estabilizar ou diminuir a concentração de 3-hidroxiopropanaldeído.

**Palavras-chave:** fermentação, glicerol, *Klebsiella oxytoca*, 1,3-propanodiol, biodiesel.



# BIOTRANSFORMATION OF GLYCEROL - BYPRODUCT OF BIODIESEL PRODUCTION

**AUTHOR: MIGUEL ANGEL APARICIO RODRÍGUEZ**

**THESIS SUPERVISOR: PROF. FLÁVIO FARIAS DE MORAES, PhD**

**CO-SUPERVISOR: PROF. Dr. GISELLA MARIA ZANIN**

Doctorate thesis; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, Bloco E46 – Sala 09; CEP: 87020-900 - Maringá - PR, Brazil, submitted on August 20, 2010. 119 pp.

## ABSTRACT

The increasing goal for escalating the national production of biodiesel will result in the generation of an increasing amount of glycerol, a byproduct of this process, with the consequent devaluation of its price in the domestic market and increased need for new routes of application of this material. Thus, we proposed in this thesis, the study of the microbial metabolism of glycerol and the main variables affecting it, and additionally, the isolation of a bacterium which can potentially transform this raw material into products of higher commercial value. A strain was isolated from soil samples, inoculating it with media whose carbon source was glycerol standard PA. The formulation of the isolation media and fermentation conditions was well-founded on a theoretical analysis of several studies on the degradation of glycerol by fermentation, available in the literature. The isolated bacterium was identified by biochemical tests as *Klebsiella oxytoca*. The data indicated that bacterial growth and glycerol consumption were favored at pH 7.4, with urea as nitrogen source and low initial substrate concentration ( $12.6 \text{ g L}^{-1}$ ). Under these conditions, for a reaction time of 48 h, the glycerol consumption reached 99.77%. When high concentrations of substrate ( $75.6 \text{ g L}^{-1}$ ) were used, the best result in terms of consumption of glycerol (69.83%) was obtained for tests with the absence of tryptone, using thioglycollate as an oxygen reducing agent and high urea concentration ( $4.9 \text{ g L}^{-1}$ ). The tests also showed that the addition of tryptone ( $2.0 \text{ g L}^{-1}$ ) had a positive effect only when the urea concentration in the medium was low ( $1.5 \text{ g L}^{-1}$ ). The main products formed were 1,3-propanediol, formate, 2,3-butanediol, lactate and acetate being produced very small

amounts of ethanol. The highest rate of production of 1,3-propanediol occurred during the logarithmic phase of growth for both PA glycerol ( $5.67 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) and for crude glycerin ( $5.28 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). The product profile analysis showed that as the gases formed by fermentation were removed there was an increase in the ethanol production. However, when  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2$  were not taken from the fermentative broth, production of ethanol was low ( $0.15 \text{ g L}^{-1}$ ). The degradation of formate is linked to the process of regeneration of NADH. However, the mechanism of consumption of hydrogen formed from formate has not been completely explained. This mechanism serves as an alternative to maintaining the redox balance of the system and was more active in the final stage of the logarithmic growth phase or stationary phase. The yield of 1,3-propanediol derived from  $75,6 \text{ g L}^{-1}$  of glycerol and the isolated strain was equal to 42.90% and 39.60% for standard PA glycerol and crude glycerin, respectively. These results are very close to those determined for other strains of *K. oxytoca* and *K. pneumoniae* found in the literature, which values the selected strain. During fermentation of glycerol the imbalance between the reactions of the oxidative and reductive branches of metabolism leads to accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde and cessation of bacterial growth. This phenomenon is probably due to a high in vivo activity of the enzyme glycerol-dehydratase, when compared to other enzymes of the anaerobic metabolism of glycerol under our experimental conditions. The data also indicated that this imbalance can be reduced by maintaining microaerobic conditions in the fermentation media. The mechanism of regeneration of NADH present in the bacterium *Klebsiella oxytoca* seems not to be restricted to a single direction of this conversion (formation of reduced or oxidized forms of NAD), because the enzyme reactions catalyzed by the enzyme glycerol dehydrogenase (oxidative branch) and an the enzyme 1,3-propanediol dehydrogenase (reductive branch) indicated that the microorganism consumed  $\text{H}_2$  partially to regenerate NADH. This seems to be an alternative metabolic compensation to stabilize or reduce the concentration of 3-hydroxypropionaldehyde.

**Keywords:** fermentation, glycerol, *Klebsiella oxytoca*, 1,3-propanediol, biodiesel.

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Transesterificação de óleos e gorduras para a produção de biodiesel.....	24
Figura 2 – Esquematização do processo básico de produção de biodiesel.....	25
Figura 3 – Caminhos metabólicos para utilização do glicerol pela bactéria <i>Klebsiella aerogenes</i> 2130.....	28
Figura 4 - Rota metabólica para a degradação anaeróbia do glicerol pela bactéria <i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> na ausência de qualquer aceptor de elétrons.....	30
Figura 5 - Estrutura das rotas metabólicas de degradação fermentativa da glicose e do glicerol pela <i>K. oxytoca</i> .....	68
Figura 6 – Estrutura de pesquisa e seleção adotada para execução das rotinas (b) e (c) relativas à metodologia de Steele e Stowers (1991).....	72
Figura 7 – Esquema de isolamento de microrganismo com potencial para degradação de glicerol sob condições anaeróbias.....	75
Figura 8 – Equipamento de identificação rápida de cepas bacterianas modelo Phoenix 100 (Becton Dickinson Diagnostics).....	76
Figura 9 – Equipamento de identificação rápida de cepas bacterianas modelo MicroScan 4 (Dade Behring).....	76
Figura 10 – Fluxograma de produção convencional de biodiesel pela rota metálica.....	82
Figura 11 – Análise microscópica do esfregaço após a coloração de Gram das bactérias desenvolvidas nos meios de isolamento.....	85
Figura 12 – Curvas de crescimento médias para os ensaios descritos na Tabela 4..	86
Figura 13 – Curvas de crescimento para os melhores e piores desempenhos obtidos nos ensaios descritos na Tabela 4.....	87
Figura 14 – Interação pH e concentração inicial de substrato em relação à densidade ótica (DO).....	88
Figura 15 – Interação pH e fonte de nitrogênio em relação à densidade ótica	89

(DO).....	
Figura 16 – Interação pH e concentração inicial de substrato em relação ao consumo percentual de glicerol (CG).....	89
Figura 17 – Interação concentração inicial de substrato e fonte de nitrogênio em relação ao consumo percentual de glicerol (CG).....	90
Figura 18 – Consumo do substrato e perfil dos produtos formato, acetato, etanol, 1,3-propanodiol e 3-HPA para o ensaio n° 8 (Tabela 4) com pH 7,4, fonte de nitrogênio – uréia (1,5 g/L) e $[GLY]_{ini} = 0,137 \text{ mol/L}$ ....	91
Figura 19 – Perfil dos produtos minoritários: succinato, lactato e 2,3-butanodiol para o ensaio n° 8 (Tabela 4) com pH 7,4, fonte de nitrogênio – ureia (1,5 g/L) e $[GLY]_{ini} = 0,137 \text{ mol/L}$ .....	91
Figura 20 – Curvas de crescimento obtidas para os ensaios descritos na Tabela 6.	93
Figura 21 – Interação triptona e concentração de ureia em relação a DO.....	94
Figura 22 – Interação triptona e concentração de ureia em relação ao CG.....	95
Figura 23 – Evolução da concentração de glicerol residual determinada pelos métodos: ÁCIDO (adaptação das metodologias de GALDEANO et al., 2008 e DU et al., 2006) e CHEN (TALARICO et al., 1988; CHEN et al., 2007), e consumo de glicerol (CG) para o ensaio n° 7 ao longo de 72 h de fermentação.....	98
Figura 24 – Produção de formato (FORM), 1,3-propanodiol (1,3-PROP), lactato (LACT) e 2,3-butanodiol (2,3-BUT) para o ensaio n° 7 ao longo de 72 h de fermentação.....	99
Figura 25 – Produção de succinato (SUCC), acetato (ACET), 3-HPA e etanol (ETA) para o ensaio n° 7 ao longo de 72 h de fermentação.....	99
Figura 26 – Interação das variáveis composição e tamponamento sobre a produção de 1,3-propanodiol para os ensaios com glicerina bruta.....	101
Figura 27 – Concentração de glicerol residual determinado pelos métodos ÁCIDO e CHEN e a produção de 1,3-propanodiol para o ensaio 2KS	102
Figura 28 – Produção dos metabólitos minoritários: succinato, lactato, acetato e etanol para o ensaio 2KS.....	104

Figura 29 – Produção dos metabólitos majoritários: formato, 1,3-propanodiol, 3-HPA e 2,3-butanodiol para o ensaio 2KS.....	104
Figura 30 – Evolução do consumo de substrato, acúmulo de 3-HPA e produção de 1,3-propanodiol pela bactéria <i>E. agglomerans</i> .....	109

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Características metabólicas relativas à degradação de glicerol por lactobacilos (LAB).....	66
Tabela 2 – Elementos variáveis da composição dos meios de isolamento (GLY = glicerol).....	73
Tabela 3 – Elementos variáveis da composição dos meios de cultura para avaliação do pH, concentração inicial de substrato e fonte de nitrogênio.....	78
Tabela 4 – Planejamento experimental para a avaliação do efeito das variáveis: pH, [GLY] <sub>ini</sub> e fonte de nitrogênio.....	79
Tabela 5 – Elementos variáveis da composição dos meios de cultura para a avaliação do efeito da concentração de ureia, e da presença ou ausência de triptona e de tioglicolato.....	80
Tabela 6 – Planejamento experimental para a avaliação do efeito das variáveis: [Triptona], [Ureia] e [Tioglicolato].....	80
Tabela 7 – Parâmetros relativos à composição dos meios de ensaio da glicerina bruta.....	83
Tabela 8 – Composição dos meios de ensaio da grade experimental utilizada na avaliação da glicerina bruta como fonte de carbono.....	83
Tabela 9 – Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> completo com replicata para avaliação do potencial de biodegradação da <i>K. oxytoca</i> .....	84
Tabela 10 – Composição dos padrões utilizados na análise de cromatografia gasosa.....	84
Tabela 11 - Testes para identificação do gênero ao qual pertence a bactéria isolada a partir de amostras de solo.....	86
Tabela 12 – Respostas obtidas para DO e CG em t = 48 h para a grade experimental da Tabela 4.....	88
Tabela 13 – Dados relativos ao consumo de glicerol para a grade experimental descrita na Tabela 6.....	93
Tabela 14 – Evolução dos produtos e do substrato para o ensaio n° 7.....	96

Tabela 15 – Resultados referentes ao CG para os ensaios com glicerina bruta.....	100
Tabela 16 – Produção de 1,3-propanodiol nos ensaios com glicerina bruta.....	101
Tabela 17 - Evolução dos produtos e do substrato para o ensaio 2KS.....	103
Tabela 18 – Composição percentual molar dos gases contidos nos frascos de fermentação para o tempo 48 h.....	106
Tabela 19 – Comparação dos dados de rendimento de 1,3-propanodiol de diversos trabalhos publicados.....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

1,3-PROP	1,3-propanodiol
2,3-BUT	2,3-butanodiol
3-HPA	3-hidroxiopropanaldeído
au	absorbance units, embora absorvância seja uma grandeza adimensional frequentemente é expressa em unidades de absorvância
ACET	acetato
ADP	adenosina difosfato
ATCC	prefixo que identifica que a cepa do microrganismo teve origem no acervo da American Type Culture Collection
ATP	adenosina trifosfato
CBS	prefixo que identifica que a cepa do microrganismo teve origem no acervo do Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holanda)
CG	consumo de glicerol (%)
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CNCM	prefixo que identifica que a cepa teve origem no acervo da Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur
D	taxa de diluição
DHA	dihidroxiacetona
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DO	densidade ótica
DSM	prefixo que identifica que a cepa do microrganismo teve origem no acervo da Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EBB	European Biodiesel Board
EC	Enzyme Commission: prefixo indicativo que antecede a classificação numérica padronizada de uma enzima em função da reação que catalisa
ETA	etanol
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
Fd <sub>oxid</sub>	ferrodoxina oxidada
Fd <sub>red</sub>	ferrodoxina reduzida
FDH-H	enzima formato-dehidrogenase-H
FHL	complexo enzimático formato-hidrogênio-liase
FORM	formato
G3P	glicerol-3-fosfato



G3PDH	enzima glicerol-3-fosfato-desidrogenase
GA3PDH	enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GDH	enzima glicerol-desidrogenase
GDHt	enzima glicerol-desidratase
GK	enzima glicerol-quinase
GLY	glicerol
Hyd	enzima hidrogenase
IAA	iodoacetato
IEA	International Energy Agency
IFO	prefixo que identifica que a cepa do microrganismo teve origem no acervo do Institute for Fermentation of Osaka (este acervo foi transferido para o NBRC)
JCM	prefixo que identifica que a cepa do microrganismo teve origem no acervo da Japan Collection of Microorganisms
$K_i$	Constante de inibição
$K_{m\_aparente}$	Constante de Michaelis-Menten na presença de um inibidor, dada por $K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ onde [I] é a concentração do inibidor
KS	Klebsiella selvagem – cepa isolada neste trabalho
LACT	lactato
$NAD^+$	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NBRC	prefixo que identifica que a cepa do microrganismo teve origem no acervo do National Biological Resource Center (Japão)
NCIB	prefixo que identifica que a cepa do microrganismo teve origem no acervo da National Collection of Industrial Bactéria
NRCC	prefixo que identifica que a cepa do microrganismo teve origem no acervo da National Research Council Canada
NRRL	prefixo que identifica que a cepa do microrganismo teve origem no acervo do Northen Regional Research Laboratory
PDH	enzima piruvato-desidrogenase
PDOR	enzima 1,3 propanodiol-desidrogenase
PEP	fosfoenolpiruvato
PFL	enzima piruvato: formato-liase
PFO	enzima piruvato: ferredoxina-oxidoreductase
PK	enzima piruvato-quinase

ppm	parte por milhão
SUCC	succinato
TAG	triacilglicerídeos
TCA	ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou ciclo de Krebs
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
UFC	unidades formadoras de colônia
USP	Unitet States Pharmacopeia ou insumo de grau farmacêutico
VPI	prefixo que identifica que a cepa do microrganismo teve origem no acervo do Anaerobe Laboratory of Virginia Polytechnic Institute and State University (observação hoje essa coleção não existe mais e parte dela foi integrada à coleção da ATCC)

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>24</b>
3.1. Biodiesel: conceito, princípios químicos de obtenção e produção industrial.....	24
3.2. Glicerol: entraves econômicos e tecnológicos.....	26
3.3. Glicerol: potencial e barreiras para seu uso como substrato de processos biotecnológicos.....	28
3.4. Rotas metabólicas de degradação do glicerol.....	29
3.5. Variáveis e mecanismos envolvidos nas rotas metabólicas de degradação do glicerol sob condições de anaerobiose.....	33
3.5.1. Visão macro do processo metabólico de degradação do glicerol.....	33
3.5.2. Degradação anaeróbia pela bactéria <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	35
3.5.3. Degradação anaeróbia pela bactéria <i>Clostridium butyricum</i> .....	40
3.5.4. Degradação anaeróbia pela bactéria <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	43
3.5.5 Degradação anaeróbia pela bactéria <i>Clostridium pasteurianum</i> .....	47
3.5.6 Degradação anaeróbia pela bactéria <i>Enterobacter agglomerans</i> .....	50
3.5.7 Degradação anaeróbia pela bactéria <i>Citrobacter freundii</i> .....	54
3.5.8 Degradação anaeróbia por <i>Lactobacillus</i> .....	56
3.5.9 Pontos chaves das rotas de degradação do glicerol.....	67
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>72</b>
4.1 Generalidades.....	72
4.2 Isolamento e identificação de uma cepa selvagem com potencial fermentativo na utilização de glicerol como substrato.....	74
4.2.1 Meios de cultura para isolamento.....	74
4.2.2 Metodologias para isolamento e identificação da cepa selvagem.....	74
4.3. Ensaio experimentais e técnicas de amostragem.....	78
4.4 Efeitos do pH, concentração de substrato e fonte de nitrogênio.....	78
4.5 Efeitos da triptona, concentração de ureia e tioglicolato.....	80
4.6 Avaliação da biodegradação da glicerina bruta pela bactéria <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	82
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
5.1 Isolamento e caracterização da cepa selvagem.....	86
5.2 Efeitos do pH, concentração de substrato e fonte de nitrogênio.....	87

5.3 Efeitos da triptona, concentração de ureia e tioglicolato.....	93
5.4 Biodegradação da glicerina bruta.....	101
5.5 Comparação dos resultados obtidos com outros trabalhos científicos.....	113
<b>6. PRINCIPAIS CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>115</b>
<b>7. PROPOSIÇÕES PARA FUTURAS PESQUISAS.....</b>	<b>117</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A maior parte da energia consumida no mundo provém do petróleo, do carvão e do gás natural. Assim, as altas no preço do barril de petróleo e as instabilidades políticas no Oriente Médio nos últimos anos causam grandes preocupações, pois a variação no preço e na disponibilidade deste produto afeta fortemente a economia mundial.

Por outro lado, o uso de combustíveis de origem fóssil no sistema de transporte contribui significativamente com a poluição do ar das grandes cidades e com o aquecimento global.

Conseqüentemente, fontes renováveis de combustíveis como o biodiesel e o etanol podem ter um papel chave na redução do efeito estufa e de outros poluentes potencialmente perigosos relacionados com os combustíveis fósseis. Tudo isto constitui uma motivação muito forte para o desenvolvimento de tecnologias que permitam utilizar fontes renováveis de energia (CHI, 1999; IEA, 2004; FERRARI et al., 2005; SILVEIRA, 2006; DEMIRBAS, 2008).

A produção mundial de biodiesel aumentou drasticamente nos últimos anos, por exemplo: a produção norte-americana pulou de 7,6 milhões de litros em 2000 para 946 milhões de litros em 2006. Sendo que, quando todas as plantas industriais, em construção naquele país, estiverem funcionando, a capacidade nominal total atingirá a marca de 12,4 bilhões de litros de biodiesel por ano (FEATHERSTONE e WOOLVERTON, 2007). A mesma tendência é observada na Comunidade Européia que de acordo com dados da European Biodiesel Board – EBB (2008) atingiu 5,7 milhões de toneladas em 2007.

No Brasil, a Lei 11.097/05 estabeleceu percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel e o monitoramento da inserção do novo combustível no mercado. O governo federal, por meio da Resolução 06/09 do Conselho Nacional de Política Energética, determinou que a partir de janeiro de 2010 o percentual de adição seria de 5% (B5), o que levou a um consumo de aproximadamente 1,8 bilhões de L/ano (ANP, 2010; CNPE, 2009).

Contudo, um ponto chave na produção de biodiesel é o destino de seu principal subproduto: o glicerol. De modo geral, a produção de biodiesel gera 10% de glicerol bruto. A falta de alternativas para novas aplicações do glicerol e o excesso produzido pelas plantas produtoras de biodiesel, levam à queda no preço deste produto no mercado internacional. Desta forma, como a produção de biodiesel tende a aumentar em função da crescente busca de combustíveis renováveis, será gerado um volume cada vez maior de glicerol. Os efeitos mais claros deste fenômeno são: a desvalorização crescente do preço da

glicerina no mercado e o potencial impacto ambiental negativo, ligado a essa superprodução (JOHNSON e TACONI, 2007; BEHR et al., 2008; WILLKE e VORLOP, 2008).

Os fatos acima citados evidenciam a necessidade de se viabilizar novas alternativas para o uso ou a transformação do excedente de glicerina gerado a partir da crescente produção de biodiesel. Neste contexto, propõe-se como contribuição à solução do problema de excedente de glicerina, o estudo dos caminhos metabólicos de degradação do glicerol e a identificação de microrganismos potencialmente capazes de transformar esta substância em outros produtos de maior valor comercial.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto é:

A revisão do conhecimento atual, sobre o metabolismo do glicerol, utilizando como fontes as publicações em periódicos científicos e revistas técnicas, com o intuito de se conceber um procedimento de seleção de microrganismos com potencial para a transformação do glicerol em produtos de maior valor comercial.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Estudar o estado da arte sobre o processo de assimilação microbiana do glicerol;
- Elaborar e executar um procedimento dirigido de seleção de microrganismos, com o objetivo da biotransformação do glicerol;
- Identificar microrganismos capazes de metabolizar o glicerol, produzindo produtos de maior valor comercial, tais como: 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol.
- Analisar e identificar os possíveis fatores que influenciam o processo de degradação do glicerol, especialmente no caso dos microrganismos isolados;
- Isolar um microrganismo e avaliar o efeito das variáveis significativas do processo de catabolismo do glicerol, em tubos de penicilina.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Biodiesel: conceito, princípios químicos de obtenção e produção industrial

O biodiesel é o derivado alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, obtidos a partir da reação de óleos vegetais ou gordura animal com álcoois, e cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (MACEDO e MACEDO, 2004; GERPEN, 2005).

A reação de transesterificação transforma o óleo ou a gordura em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, de acordo com o álcool utilizado na reação e os ésteres obtidos constituem o biodiesel (MACEDO e MACEDO, 2004). Podem ser utilizados outros álcoois como reagente, tais como: propanol, butanol, álcool amílico, contudo o metanol e etanol são os preferidos devido ao baixo custo e à suas propriedades físico-químicas (FUKUDA et al., 2001). O biodiesel produzido pode ser usado puro ou em mistura de diversas proporções com o diesel mineral. O principal subproduto desta reação é o glicerol, pois para cada tonelada de gordura ou óleo utilizada são gerados aproximadamente 100 kg de glicerol (GHESTI, 2006).

Em termos químicos, o processo global de transesterificação de óleos vegetais e gorduras é uma sequência de três reações reversíveis e consecutivas, em que os diglicerídeos e os monoglicerídeos são os intermediários. A reação global está descrita na Figura 1. Nesta reação, são necessários três moles de álcool para um mol de triglicerídeo (SCHUCHARDT et al., 1998). Na prática, é sempre utilizado um excesso de álcool, por exemplo, 6:1 molar (álcool:triglicerídeo), de modo a aumentar o rendimento em ésteres (deslocando a reação para o lado dos produtos) e permitir a separação do glicerol formado (SCHUCHARDT et al., 1998; CHI, 1999; MA e HANNA, 1999).

Outra forma de obter o deslocamento da reação para a direita é pela remoção de um dos produtos. Assim, no caso da transesterificação catalisada por ácidos (pouco utilizada industrialmente), a água formada pode ser removida por evaporação/destilação ou pela adição de um agente desidratante como sulfato de magnésio ou por uma peneira molecular formada por cristais de zeólitas desidratadas (CHI, 1999).

Entretanto, cabe destacar que a transesterificação ácida apresenta diversos fatores negativos: uma alta razão óleo:álcool é necessária para se obter uma conversão satisfatória; a reação ocorre 4000 vezes mais lentamente em relação à catálise básica com a mesma quantidade de catalisador; ocorrem problemas relacionados à corrosão em função do tipo



de catalisador. Em contrapartida, esse tipo de catálise é mais adequado para glicérides com conteúdos altos de ácidos graxos livres e maior quantidade de água, como o óleo de dendê e os óleos residuais (GHESTI, 2006).

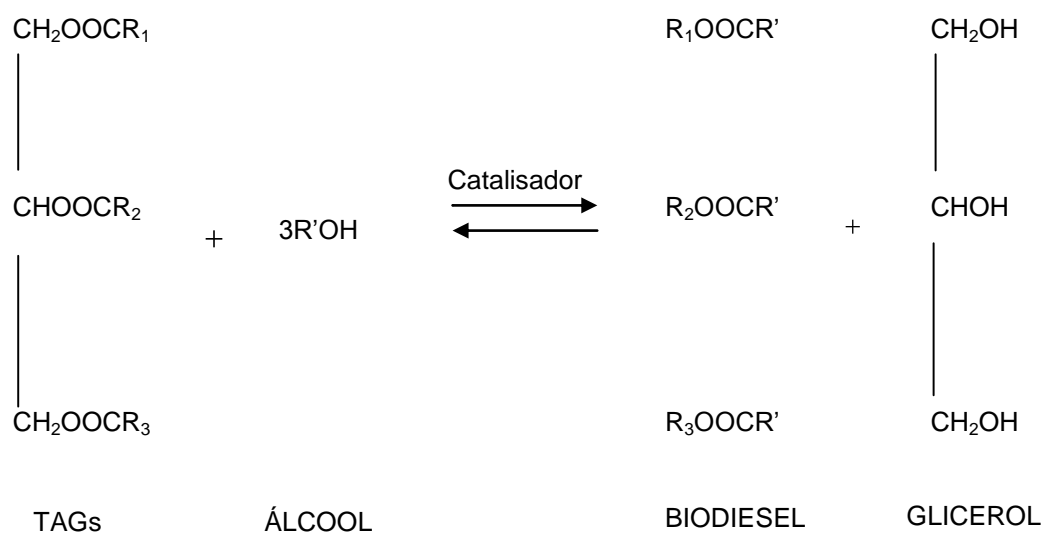


Figura 1 - Transesterificação de óleos e gorduras para a produção de biodiesel.  
TAG = triacilglicerídeo

Diferentes tecnologias são disponíveis e utilizadas atualmente na produção industrial de biodiesel. Contudo, de modo geral, essas tecnologias podem ser divididas em dois grandes grupos: via química e via enzimática. Sendo que a primeira predomina na maioria das plantas industriais existentes (FUKUDA et al., 2001).

O processo químico denominado transesterificação alcalina utiliza catalisadores, tais como: NaOH, KOH, carbonatos, metóxido ou etóxido de sódio. Geralmente o processo acontece em batelada na pressão atmosférica e temperatura entre 60-70° C com excesso de álcool. Ao final do tempo de reação a massa reacional final é constituída de duas fases, separáveis por decantação e/ou por centrifugação, sendo que a fase pesada contém o glicerol e a fase leve o biodiesel.

O álcool em excesso é retirado do biodiesel bruto por evaporação, em seguida o biodiesel é lavado com água, centrifugado e desumidificado. O excesso de álcool contido na fase pesada também é recuperado por evaporação, sendo que o glicerol obtido (80-88% de pureza) é vendido para outras indústrias (SRIVASTAVA e PRASAD, 2000; FUKUDA et al., 2001; KIM et al., 2004). O esquema geral do processo de produção de biodiesel está representado na Figura 2.

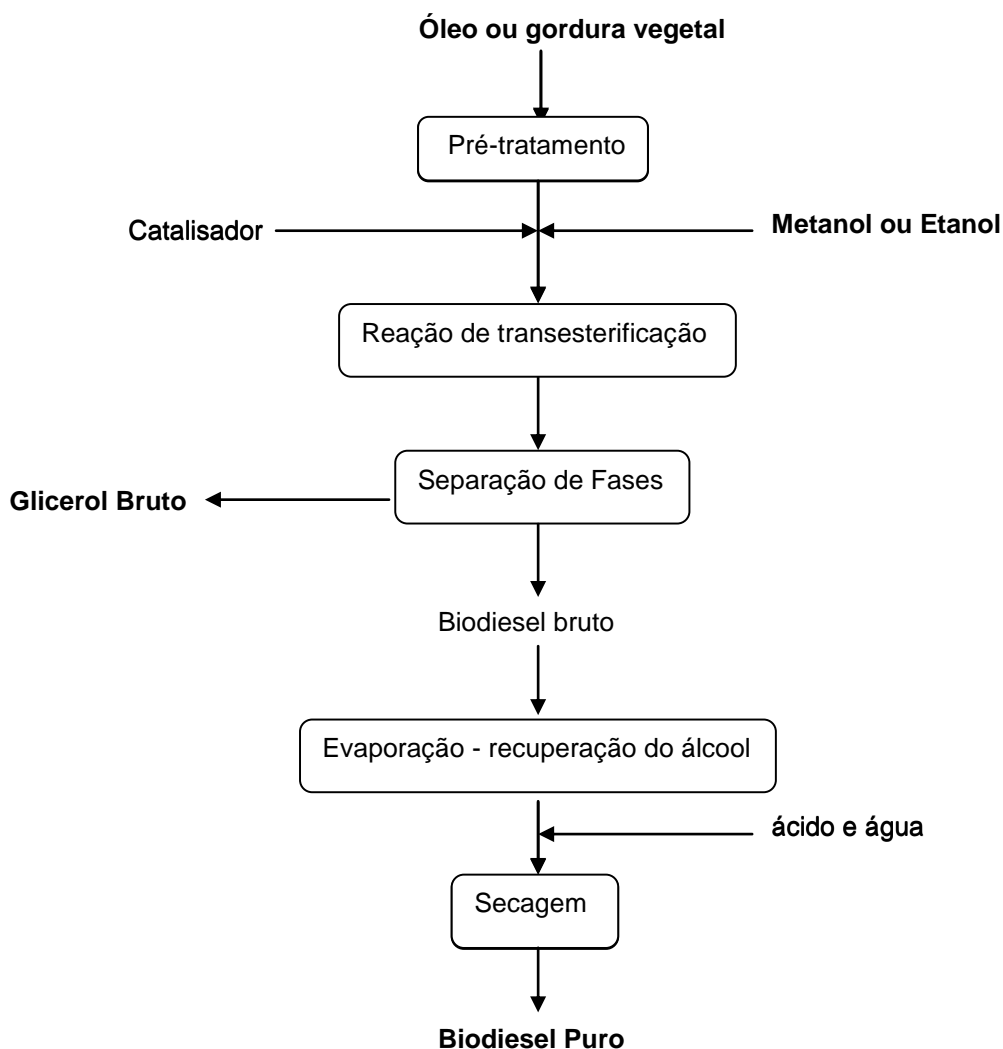


Figura 2 - Esquematização do processo básico de produção de biodiesel

Para os processos baseados na transesterificação alcalina é importante observar que o óleo ou gordura utilizada, bem como o álcool, devem ser praticamente isentos de água, pois ela provoca a formação de ácidos graxos livres que reagem com o catalisador formando sabões e diminuindo a eficiência e rendimento do processo. No caso da matéria graxa também existem limites para o nível de acidez livre tolerado, aproximadamente 0,5% (MA e HANNA, 1999; FUKUDA et al., 2001).

### 3.2. Glicerol: entraves econômicos e tecnológicos

O glicerol bruto obtido na produção de biodiesel contém aproximadamente 50-70% de glicerol, mais água, metanol ou etanol, catalisador, sais, monoglicerídeos e traços de

triglicerídeos, diglicerídeos e ésteres. Estas impurezas são comuns no processo de transesterificação química. Glicerol (com 80-88% de pureza) é obtido por evaporação simples, após a separação dos sabões por um processo de acidificação seguido de centrifugação. O controle da evaporação a baixas temperaturas é crucial, pois se evita a mudança de cor e a polimerização do glicerol. Outro fator chave na qualidade do glicerol obtido no processo de produção de biodiesel é o conteúdo de sais provenientes do catalisador utilizado e/ou de matérias-primas originadas em resíduos gordurosos, tais como: óleo de fritura (SRIVASTAVA e PRASAD, 2000; TYSON et al., 2004; GERPEN, 2005; PYLE, 2008).

Contudo, o glicerol bruto e mesmo o destilado com 80-88% de pureza possuem baixo valor agregado devido às impurezas contidas. Além disso, dependendo da finalidade para que seja utilizado, o glicerol deverá passar ainda por processos, tais como: filtração, destilação fracionada a alto vácuo, branqueamento, desodorização e troca iônica. Assim, o refino do glicerol dentro dos padrões atuais depende de fatores de escala para tornar-se economicamente viável (PACHAURI e HE, 2006; PYLE, 2008).

A maioria dos derivados químicos produzidos a partir de glicerol emprega como matéria-prima glicerol padrão USP com 95% de pureza. Isto significa que métodos simples e de baixo custo para o refino de glicerol devem ser desenvolvidos, para atingir esse grau de pureza a partir da fase pesada resultante da reação de transesterificação, ou novas tecnologias para a produção de derivados do glicerol bruto ou destilado (80-88%) devem ser pesquisadas (TYSON et al., 2004).

Por outro lado, o excesso de glicerol como subproduto do processo de produção de biodiesel tende a aumentar significativamente a oferta do mesmo no mercado levando este para uma condição de resíduo industrial com os custos de disposição associados. De fato, já são conhecidos casos de companhias que pagam para se desfazer do glicerol destilado (80-88% de concentração), sendo que isto tem contribuído para a queda dos preços desse produto. A necessidade de criar novos derivados a partir do glicerol levou o Departamento Americano de Energia a ter como um de seus objetivos a criação de uma nova plataforma química tomando o glicerol como a matéria-prima básica da mesma (YAZDANI e GONZALEZ, 2007; DHARMADI et al., 2006).

Nos últimos anos, o uso de lipases e de microrganismos, que produzam as mesmas, como biocatalisador para a produção de biodiesel desperta o interesse dos pesquisadores. Esta alternativa traria como consequência um subproduto de melhor qualidade, mas não acabaria com a tendência de super oferta da glicerina (SAMUKAWA et al., 2000; ISO et

al., 2001; FUKUDA et al., 2001; CHEN e WU, 2003; XU et al., 2005; NOUREDDINI et al., 2005; PACHAURI e HE, 2006; ROYON et al., 2007).

### 3.3. Glicerol: potencial e barreiras para seu uso como substrato de processos biotecnológicos

O glicerol gerado no processo de produção de biodiesel é um elemento crucial no custo final desse biocombustível. Isto cria um campo de pesquisa extremamente interessante e com grande potencial de desenvolvimento na área de biotecnologia. No entanto, a realização desse potencial requer a identificação de microrganismos capazes de fermentar o glicerol na ausência de aceptores de elétrons (PACHAURI e HE, 2006; DHARMADI et al., 2006; SILVA et al., 2009).

Porém, essa habilidade está aparentemente restrita a poucos microrganismos, sendo que a maioria deles não apresenta as características necessárias para sua aplicação industrial. Um bom exemplo das lacunas ou vazios de conhecimento na área é a *Escherichia coli*, bactéria que foi considerada incapaz de conduzir este processo metabólico por mais de 80 anos. Apesar disso, estudos recentes demonstram que este microrganismo é capaz de metabolizar o glicerol por um caminho puramente fermentativo sob determinadas condições (DHARMADI et al., 2006; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

Diversos estudos sobre a degradação do glicerol, focados principalmente na área de metabolismo e fisiologia microbiana, foram realizados desde os primórdios da ciência denominada microbiologia. Wood e Werkman (1936) estudaram o efeito da adição de CO<sub>2</sub> no processo de degradação do glicerol por bactérias do gênero *Propionibacterium*, concluindo que o CO<sub>2</sub> atua com um acceptor de hidrogênio. Gunsalus (1947) avaliou que algumas cepas de gênero *Streptococcus* são capazes de fermentar o glicerol, desde que exista um receptor de hidrogênio no meio.

Por outro lado, já nas décadas de 50 e 60, o grupo de pesquisa da Escola de Medicina de Harvard, ligado ao Dr. Lin, observou que duas cepas distintas de *Aerobacter aerogenes* (1033 e 1041) utilizavam caminhos metabólicos diferentes para degradar o glicerol: um aeróbio e outro anaeróbio (MAGASANIK et al., 1953; RUSH et al., 1957; LIN et al., 1960). Alguns anos depois, Koch et al. (1964) já citavam explicitamente quais eram as enzimas que compunham cada um dos caminhos metabólicos para a degradação do glicerol e qual a relação destes caminhos com respeito à presença ou ausência de oxigênio no meio. Ruch e Lin (1975) fizeram um estudo cujo objetivo foi avaliar a relação

do sistema de inibição e controle desses dois caminhos metabólicos com a genética para *Klebsiella aerogenes* (1033) (nova denominação da *Aerobacter aerogenes*). Esses estudos todos tinham um cunho mais ligado à busca de mecanismos para inibição de microrganismos patogênicos.

### 3.4. Rotas metabólicas de degradação do glicerol

Assim, ficou claro ao longo de anos de estudo que a assimilação do glicerol envolve pelo menos dois caminhos metabólicos diferentes: um formado pelas enzimas glicerol-quinase (GK) e glicerol-3-fosfato-desidrogenase (G3PDH) que constituem o sistema *glp*, e outro composto pelas enzimas glicerol-desidrogenase (GDH) e dihidroxiacetona-quinase (DHA-quinase) que constituem o sistema *dha*. Existem microrganismos que possuem um ou outro, ou ainda, os dois conjuntos de enzimas (Figura 3). O controle ou a existência das enzimas dessas vias metabólicas está geralmente ligado à necessidade de oxigênio ou não do microrganismo. Assim, sob condições anaeróbias é ativado o caminho *dha*, e sob condições aeróbias é inicializado o caminho *glp*. (PASTERIS e STRASSER de SAAD, 2005; SAINT-AMANS et al., 2001; PERETÓ et al., 2004; KOCH et al., 1964).

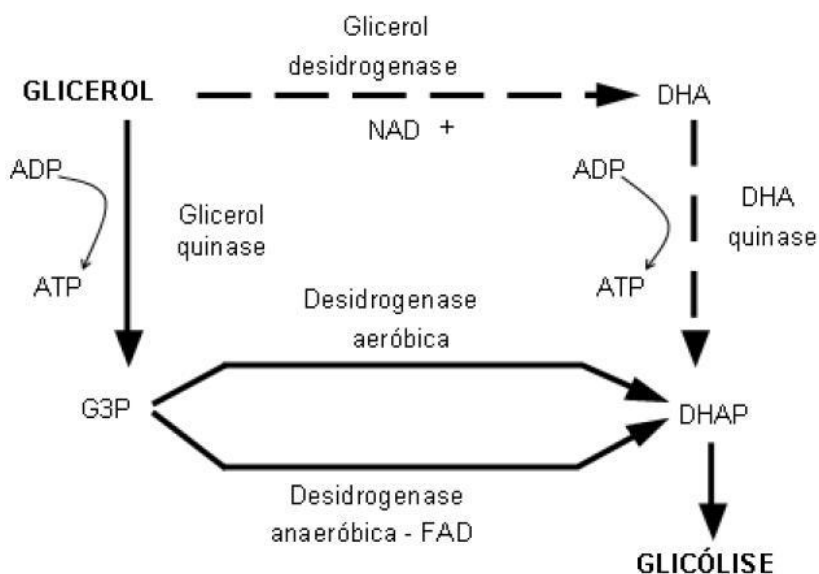


Figura 3 - Caminhos metabólicos para a utilização do glicerol pela bactéria *Klebsiella aerogenes* 2130. As linhas cheias representam a sistema *glp* e as linhas tracejadas o sistema *dha*. Abreviações:

G3P, sn-glicerol-3-fosfato; DHA, dihidroxiacetona; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; NAD, nicotinamida adenina dinucleotídeo; ADP adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato. FONTE: RUCH e LIN, 1975.

Cabe neste ponto destacar, que todas as formas de vida necessitam produzir energia para sua manutenção, bem como para a biossíntese de material celular, sendo essa energia bioquímica gerada a partir das reações metabólicas que criam um fluxo de elétrons de três maneiras: (i) a partir de compostos químicos orgânicos, (ii) de compostos químicos inorgânicos, ou (iii) da energia luminosa. Os microrganismos que obtêm a energia a partir de compostos orgânicos são denominados de quimiorganotróficos (SCHLEGEL e JANNASCH, 1981; MADIGAN et al., 2004).

Os mecanismos utilizados pelos microrganismos quimiorganotróficos para a geração de energia são: a respiração aeróbia, a fermentação e a respiração anaeróbia. No caso da respiração aeróbia o acceptor final de elétrons é o oxigênio, enquanto na fermentação, o processo oxidativo está acoplado com a redução de um composto gerado a partir do substrato inicial. E finalmente, na respiração anaeróbia o acceptor de elétrons pode ser o íon: nitrato, sulfato, carbonato ou  $\text{Fe}^{+3}$  (SCHLEGEL e JANNASCH, 1981; MADIGAN et al., 2004).

Embora muitos microrganismos sejam capazes de metabolizar o glicerol na presença de um acceptor de elétrons inorgânico (em especial do oxigênio), poucos conseguem utilizar o mesmo sob condições de fermentação. A utilização do glicerol, um substrato mais reduzido que a glicose, em processos fermentativos exige que sejam retirados dois átomos a mais de hidrogênio, isto implica que, é essencial a presença de um acceptor de elétrons para manter o balanço de redox do meio. O metabolismo fermentativo do glicerol tem sido estudado em detalhe para várias espécies de bactérias entéricas, tais como: *Citrobacter freundii* (DANIEL e GOTTSCHALK, 1992; BOUVET et al., 1995; YAZDANI e GONZALEZ, 2007) e *Klebsiella pneumoniae* (ZENG et al., 1994; BOUVET et al., 1995; WANG et al., 2003; HONGWEN et al., 2005; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

Quando em condições anaeróbias, foi observado que a maioria dos microrganismos, que degradam glicerol, e que utilizam a via associada à enzima glicerol-desidrogenase, apresenta um caminho metabólico paralelo de caráter redutivo. Na via oxidativa a enzima glicerol-desidrogenase transforma o glicerol em dihidroxiacetona (DHA) com concomitante redução do  $\text{NAD}^+$  para  $\text{NADH}$ . A DHA é então fosforilada pela ação da enzima dihidroxiacetona-quinase, e o produto obtido, dihidroxiacetona fosfato, entra na via glicolítica. A via redutiva paralela é constituída pelas enzimas glicerol-desidratase (EC 4.2.1.30) e 1,3 propanodiol-desidrogenase (EC 1.1.1.202). Estas vias se complementam em termos de geração e balanço de aceptores de elétrons, neste caso

$\text{NAD}^+$ . O esquema geral deste sistema enzimático está representado na Figura 4 (JOHNSON et al., 1985; DANIEL et al., 1995; LUERS et al., 1997; RUZHEINIKOV et al., 2001; SAINT-AMANS et al., 2001; SUN et al., 2003).

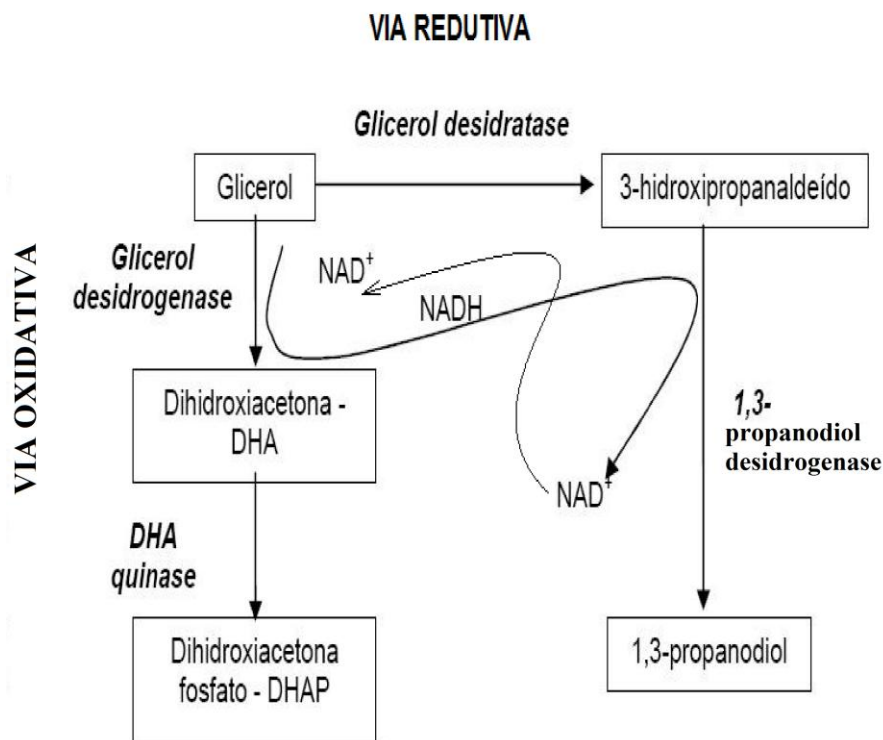


Figura 4 - Rota metabólica para a degradação anaeróbica do glicerol pela bactéria *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* na ausência de qualquer aceptor de elétrons  
 FONTE: Adaptado de BOUVET et al., 1995

Poucos estudos sobre o metabolismo fermentativo do glicerol na ausência de síntese de 1,3 propanodiol têm sido publicados. Sendo que, em alguns casos os autores colocam a respiração anaeróbica, com aceptores de elétrons inorgânicos diferentes do oxigênio, como um sinônimo do processo fermentativo estrito (WOOD e WERKMAN, 1936; KREBS e EGGLESTON, 1941; BARBIRATO et al, 1997a; HIMMI et al., 2000; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

Dharmadi et al. (2006) afirmam que sob as seguintes condições a bactéria *Escherichia coli* é capaz de fermentar o glicerol: pH do meio igual a 6,0; temperatura 37 °C; anaerobiose; eliminação do hidrogênio formado; e uma composição apropriada do meio de cultura (10 g/L glicerol, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona, 1,32 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 9,52 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,523 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,276 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0,010 mM  $\text{FeSO}_4$ , 5 x

$10^{-4}$  mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 4 mM tricina, 1  $\mu$ M selenito, 4 mM micronutrientes [ $3 \times 10^{-6}$  mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(MO<sub>7</sub>)<sub>24</sub>;  $4 \times 10^{-4}$  mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>;  $3 \times 10^{-6}$  mM CoCl<sub>2</sub>;  $10^{-5}$  mM CuSO<sub>4</sub>;  $8 \times 10^{-5}$  mM MnCl<sub>2</sub>;  $10^{-5}$  mM ZnSO<sub>4</sub>]). Os experimentos indicam que, a ação do sistema enzimático formato-hidrogênio-liase desempenha um papel essencial no processo de degradação de glicerol pela *E. coli*, pois este subsistema enzimático funciona como um mecanismo de reciclagem, que reconverte o NADH em NAD<sup>+</sup>, sem a presença de um acceptor de elétrons externo. Estas hipóteses são reforçadas pela análise de diversos trabalhos, sobre o subsistema formato-hidrogênio-liase, feita por Sawers (2005), apesar de não tratar sobre processos de degradação de glicerol.

Outras cepas que fazem a degradação do glicerol sob condições de anaerobiose, sem a produção do 1,3 propanodiol, são a *Propionibacteria acidipropionici* e a *Propionibacteria freudenreichii* ssp. *shermanii* que conseguem produzir ácido propiônico e succínico. Este último produto somente aparece quando é adicionado CO<sub>2</sub> ao meio reacional (WOOD e WERKMAN, 1936; KREBS e EGGLESTON, 1941; BARBIRATO et al., 1997a; HIMMI et al., 2000).

Entretanto, como já mencionado, a maioria dos pesquisadores tem focado seus estudos na produção microbiana de 1,3 propanodiol a partir de glicerol (DANIEL et al., 1995; ZENG et al., 1994; MALAOUI e MARCZAK, 2001; NÉMETH e SEVELLA, 2008). Este interesse se deve principalmente ao uso do 1,3 propanodiol como matéria-prima (monômero) para a produção de um novo poliéster comercial, o chamado Corterra ou poli(propileno tereftalato) (PPT). Este novo polímero, em função de sua baixa sensibilidade à luz e suas propriedades físicas singulares, têm ótimas características para a produção de carpetes e fibras têxteis para uso na indústria de roupas (CAMERON et al., 1998; LUERS et al., 1997; NÉMETH e SEVELLA, 2008).

De fato, vários trabalhos acadêmicos têm demonstrado que existe um potencial enorme a ser explorado nesta área: *Yarrowia papanikolaou* produz ácido cítrico (PAPANIKOLAOU et al., 2002); *Anaerobiospirillum succiniciproducens* produz ácido succínico (LEE et al., 2001); *Lactobacillus reuteri* produz 3-hidroxiopropanal (VOLLENWEIDER e LACROIX, 2004); *Enterobacter aerogenes* produz hidrogênio e etanol (ITO et al., 2005). De modo geral, o principal produto obtido pela degradação do glicerol varia de acordo com a espécie microbiana. Entretanto, quase sempre lactato, acetato, succinato, etanol, dióxido de carbono e hidrogênio também são formados e sua percentagem é afetada pela espécie de microrganismo utilizado e pelas condições de crescimento: pH, concentração de substrato, aeração, agitação, presença de metais,



limitações ou não de outros nutrientes, presença de inibidores, cofatores etc. (DHARMADI et al., 2006; SAINT-AMANS et al., 2001; ZENG et al., 1996; ZENG et al., 1994; GIRBAL et al., 1995; JARVIS et al., 1997).

As caracterizações genéticas, bioquímicas e estruturais das enzimas envolvidas na assimilação do glicerol foram objetos de diversos estudos (PASTERIS, STRASSER de SAAD, 1998; GIRBAL et al., 1995; YAMADA-ONODERA et al., 2002; RUZHEINIKOV et al., 2001; ERNI et al., 2006; DANIEL et al., 1995; SUN et al., 2003; JOHNSON et al., 1985). Contudo, existe uma lacuna significativa sobre como é feita a regeneração dos transportadores de elétrons  $\text{NAD}^+$  nos casos em que o microrganismo degrada glicerol, via fermentativa, porém sem a produção de 1,3 propanodiol (YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

Estas pesquisas são importantes, pois a identificação do tipo de atividade enzimática desejada e a compreensão do metabolismo e da fisiologia dos microrganismos utilizados são essenciais no sucesso da seleção (screening) de cepas com o potencial desejado de transformação do substrato (STEELE e STOWERS, 1991).

### *3.5. Variáveis e mecanismos envolvidos nas rotas metabólicas de degradação do glicerol sob condições de anaerobiose*

#### *3.5.1. Visão macro do processo metabólico de degradação do glicerol*

Como já citado, o grupo de pesquisa do Dr Lin identificou quais são os caminhos metabólicos (Figura 3) e as enzimas envolvidas na degradação do glicerol:

- Glicerol-desidrogenase (EC 1.1.1.6) e DHA-quinase (EC 2.7.1.29) sob condições de anaerobiose;
- Glicerol-quinase (EC 2.7.1.30) e glicerol-3-fosfato-desidrogenase (EC 1.1.99.5) sob condições aeróbias.

Assim, o processo de síntese das enzimas glicerol-quinase e glicerol-desidrogenase é ativado pela presença de glicerol no meio de cultura, sendo que a enzima glicerol-desidrogenase é destruída ou desativada sob condições aeróbias (presença de oxigênio) (LIN et al., 1960; KOCH et al., 1964; RUCH e LIN, 1975).

Entretanto, ainda existem muitas dúvidas que devem ser esclarecidas sobre o processo de degradação fermentativa do glicerol, em especial, como é feita e regulada a recomposição dos equivalentes no balanço redox celular.

Cabe neste ponto destacar a pesquisa de Neijssel et al. (1975), na qual foi utilizada a bactéria *Klebsiella aerogenes* NCIB 418, com resultados singulares, pois eles apresentaram dados que indicam que:

- a) a ativação da síntese da enzima GK e da enzima GDH não é estimulada apenas pela presença de glicerol no meio de cultura, pois quando foi utilizada glicose como fonte de carbono e energia, com disponibilidade limitada, foi identificada atividade das enzimas glicerol-quinase (sob aerobiose) e glicerol-desidrogenase (sob anaerobiose);
- b) as condições de aerobiose não são incompatíveis com a síntese e o uso da enzima glicerol-desidrogenase, pois em culturas aeróbias cuja fonte de carbono é o glicerol, com limitações na disponibilidade de sulfato ou de amônia, foi detectada atividade dessa enzima.

Essas observações levaram os autores a propor que a modulação entre os dois caminhos metabólicos de degradação do glicerol deve estar também ligada à concentração intracelular de metabólitos intermediários, tais como: glicerol-3-fosfato ou DHA fosfato. Assim, a enzima glicerol-quinase que fornece um mecanismo de alta afinidade pelo substrato (o caminho metabólico denominado *glp*) permite que o microrganismo cresça em meios com baixa concentração de glicerol (restrita a condições de aerobiose) e com altas taxas de conversão. Enquanto a enzima glicerol-desidrogenase, devido à sua menor afinidade pelo substrato, explicaria a escolha do caminho *dha* para meios com alta concentração de glicerol, conduzindo a taxas de conversão baixas. Essas alternativas permitiriam evitar uma superprodução dos metabólitos intermediários citados, já que altas concentrações dos mesmos têm efeito nocivo na viabilidade do microrganismo, evitando o seu acúmulo no meio intracelular.

Bouvet et al. (1995) realizaram um extenso estudo a respeito da degradação anaeróbia de glicerol por bactérias entéricas. Nesse trabalho foram avaliados: a presença das enzimas glicerol-desidrogenase (GDH) e 1,3 propanodiol-desidrogenase (PDOR); o consumo de glicerol como substrato do processo fermentativo; e as características da enzima glicerol-desidrogenase, por meio de eletroforese, para cada espécie bacteriana. Um resultado que merece ser destacado neste trabalho é que os autores afirmam que a bactéria *Klebsiella planticola* (cinco cepas diferentes) é incapaz de crescer de modo fermentativo em glicerol, sendo que foi identificada a presença da enzima glicerol-desidrogenase tipo I e determinada a ausência da enzima 1,3 propanodiol-desidrogenase.

Contudo, em um trabalho anterior o mesmo grupo de pesquisa (BOUVET et al., 1994) observou que a adição de piruvato ao meio de cultura induz ao crescimento da mesma *Klebsiella planticola* sob condições de fermentação produzindo: formato, acetato, etanol e lactato sem a produção do 1,3 propanodiol. Também foi observado que a adição de fumarato ou nitrato (atuam como aceptores externos de elétrons) permite a degradação anaeróbia do glicerol pela *Klebsiella planticola*, com as seguintes características: produção de glicerol-desidrogenase e acetato em níveis similares aos observados no meio com a adição de piruvato; e diminuição expressiva nas quantidades produzidas de formato e etanol.

Os resultados descritos são evidências de que o caminho metabólico *dha* pode ter outras formas de reciclar o excesso de NADH produzido pela degradação anaeróbia do glicerol. Além disso, mais tarde foi demonstrado que de fato a *Klebsiella planticola* é capaz de utilizar o glicerol como fonte de carbono e energia sob condições fermentativas (JARVIS et al., 1997).

Outra bactéria estudada por Bouvet et al. (1995) que foi considerada incapaz de crescer em glicerol sob condições de fermentação é a *Enterobacter aerogenes*. Entretanto, há poucos anos atrás um grupo de pesquisa, ligado ao Departamento de Biotecnologia Molecular da Universidade de Hiroshima, observou a produção hidrogênio e etanol, em culturas de *Enterobacter aerogenes* HU 101 em substrato formado pelo resíduo da fase pesada de uma planta de biodiesel (ITO et al., 2005). Assim, como no caso da *Klebsiella planticola*, Bouvet et al. (1995) registraram que nas quatro cepas avaliadas da bactéria *Enterobacter aerogenes* foi identificada a presença da enzima glicerol-desidrogenase tipo I e determinada a ausência da enzima 1,3 propanodiol-desidrogenase. Isto reforça a idéia de que o campo exploratório nesta área ainda é muito grande.

Além disso, Bouvet et al. (1995) afirmam que outras quatro espécies: *Citrobacter koseri*, *Enterobacter intermedium*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella terrigena* também apresentam as mesmas características das espécies *Klebsiella planticola* e *Enterobacter aerogenes*. Isto as torna potencialmente capazes de fermentar o glicerol, sob determinadas circunstâncias.

### 3.5.2. Degradação anaeróbia pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* degrada o glicerol, sob condições anaeróbias, por meio de um sistema enzimático acoplado composto por uma via oxidativa e outra redutiva

(LIN, 1976). A estrutura geral desse sistema enzimático está representada na Figura 4. É importante ter em mente essa estrutura de modo a facilitar a compreensão dos resultados obtidos e as proposições apresentadas nos trabalhos expostos a seguir.

Zeng et al. (1994) avaliaram o potencial de inibição do substrato e dos produtos, na fermentação do glicerol pelas bactérias *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 e *Clostridium butyricum* DSM 5431, sob condições não limitantes de substrato. Em relação à *Klebsiella pneumoniae* já havia sido observado que esta bactéria pode flexibilizar os canais de distribuição dos produtos do processo fermentativo pela da interconversão de  $\text{NADH}_2$  e  $\text{H}_2$  sob diferentes condições. Dois padrões de fermentação foram confirmados a partir dos resultados experimentais: um utiliza o etanol como rota principal para a geração de energia, enquanto o outro faz uso do ácido acético. Os dados indicam que a rota do ácido acético, embora seja menos eficiente em termos do balanço de redox, é a rota dominante, sob condições de forte inibição pelo produto, particularmente em altas taxas de crescimento celular. Assim, o modelo de crescimento microbiano mostra que o etanol inibe o crescimento da *Klebsiella pneumoniae* mais fortemente do que o 1,3 propanodiol e o ácido acético em pH neutro.

Zeng et al. (1996) apresentam uma análise das rotas metabólicas de degradação do glicerol pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026. Quando em estado estacionário e sob condições limitantes de substrato (concentrações de glicerol até 820 mmol/L), observa-se que:

- o valor da razão entre a quantidade produzida de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  fica próximo de um (1,0);
- as taxas de formação dos outros produtos de fermentação permanecem relativamente constantes;
- as taxas de formação de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  diminuem com o aumento da concentração do substrato.

Entretanto, os mesmos autores observaram que em estado estacionário, porém sob condições de excesso de substrato (concentrações de glicerol acima de 820 mmol/L):

- a taxa de formação de  $\text{H}_2$  diminui, enquanto a taxa de formação de  $\text{CO}_2$  aumenta significativamente;
- as taxas de consumo de glicerol, formação de ácido acético e 1,3 propanodiol aumentam;
- a taxa de formação de etanol diminui;

- há formação de outros subprodutos no processo fermentativo – ácido láctico, ácido succínico, 2,3 butanodiol e ácido fórmico. Sendo que suas taxas de formação crescem com o aumento da concentração de substrato.

Ainda, de acordo com Zeng et al. (1996), a descarboxilação do piruvato, na fermentação do glicerol pela *Klebsiella pneumoniae*, envolve outro sistema enzimático além da piruvato:formato-liase (PFL). Sendo que, a PFL é o sistema de degradação do piruvato predominante sob condições limitantes de substrato.

Os resultados apresentados por Menzel et al. (1997) excluem a participação do complexo enzimático piruvato:ferrodoxina-oxidorreductase (PFO) (EC 1.2.7.1) no metabolismo da bactéria *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 crescendo sob condições anaeróbias. Contudo, foi determinada a presença do complexo enzimático piruvato-desidrogenase (PDH), tanto sob condições limitantes de substrato, quanto em condições de excesso do mesmo. Isto confirma a tese apresentada anteriormente pelos mesmos pesquisadores (ZENG et al., 1996).

Foi observado que, sob condições limitantes de disponibilidade de substrato, a atividade da enzima piruvato:formato-liase aumenta com o acréscimo da concentração de glicerol, enquanto a atividade da mesma diminui quando há excesso de substrato. A razão  $PDH_{vitro}:PDH_{vivo}$  é próxima de oito, sob condições de excesso de glicerol, contudo, este desvio se deve não somente ao controle intracelular em nível metabólico, mas ao fato de que o cálculo da atividade da enzima utilizada (*in vivo*) não levou em consideração o uso de parte da acetilCoA formado no ciclo TCA e na biossíntese de lipídeos (MENZEL et al., 1997).

Na análise subsequente serão empregados os termos a seguir apresentados com as aceções indicadas (MADIGAN et al., 2004; NELSON e COX, 2002):

- mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro que conduz a informação genética contida no DNA;
- Transcrição – processo de síntese de RNA, utilizando uma fita de DNA como molde;
- Tradução – processo de síntese de proteínas que utiliza a informação contida no mRNA como molde;
- Operon – Descreve uma unidade transcricional, que contém mais de um gene;
- Regulação – processos de controle da expressão gênica;

- Regulon – grande rede de operons interligados que codifica enzimas relativas a uma parte do metabolismo celular e possui regulação coordenada pelos mesmos metabólitos ou proteínas.

O controle das enzimas em uma célula tem dois mecanismos básicos: um deles atua sobre a atividade de uma enzima pré-existente e o outro controla a produção (quantidade) de uma determinada enzima. No primeiro caso, a regulação da atividade enzimática ocorre após a enzima ter sido sintetizada (pós-tradução). Enquanto, na última situação pode ocorrer em nível transcricional ou em nível traducional (MADIGAN et al., 2004).

O *dha* regulon codifica os genes relativos ao metabolismo anaeróbico do glicerol nas espécies *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Clostridium*. Com exceção de algumas particularidades se pode afirmar que a enzima glicerol-desidrogenase (GDH) está codificada pelo gene *dhaD* (*gldA* no caso do *C. perfringens*) e a dihidroxiacetona-quinase (DHA-quinase) pelo gene *dhaK*. Enquanto, as enzimas do braço redutivo são codificadas: glicerol-desidratase (GDHt) pelos genes *dhaB*, *dhaC* e *dhaE*, e 1,3-propanodiol-oxidoreductase (PDOR) pelo gene *dhaT*. A maioria das espécies apresenta uma proteína ativadora da enzima GDHt identificada pelo gene *orfX* e *orfZ* (*dhaG* e *dhaF* no caso da *Citrobacter freundii*), uma proteína reguladora *dhaR*, um facilitador de transporte do glicerol para o interior da célula *glpF*, além de outras proteínas *orfW* e *orfY* cuja função não foi identificada (MACIS et al., 1998; SUN et al., 2003).

Segundo Ahrens et al. (1998), a concentração de glicerol no meio de cultura afeta inversamente as atividades *in vitro* (síntese) e positivamente as atividades *in vivo* (utilização) das seguintes enzimas: glicerol-desidrogenase, glicerol-desidratase e 1,3 propanodiol-oxidoreductase.

Além disso, para Ahrens et al. (1998), o fluxo da via oxidativa na degradação do glicerol pela *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 é governado principalmente pela regulação da atividade *in vivo* da enzima GDH em nível metabólico (pós-tradução), isto significa que o fluxo material nesta via é controlado por um processo de inibição baseado na ação de algum dos metabólitos gerados: NADH e DHA. Neste ponto é importante destacar que a dihidroxiacetona (DHA) é um indutor do regulon *dha* e ao mesmo tempo tem um efeito inibitório por retroalimentação sobre a enzima glicerol-desidrogenase (GDH), isto significa que a DHA afeta a degradação do glicerol tanto em nível genético quanto metabólico.

Por outro lado, de acordo com Ahrens et al. (1998), o fluxo na via redutiva é controlado pela síntese das enzimas dessa via metabólica, em especial a glicerol-

desidratase (GDHt). Isto evitaria o acúmulo do intermediário 3-hidroxiopropanaldeído (3-HPA), o qual foi registrado como tóxico para o crescimento de outro microrganismo produtor de 1,3 propanodiol, a bactéria *Enterobacter agglomerans* (BARBIRATO et al., 1995). Desta forma, a enzima glicerol desidratase representa o passo limitante na produção de 1,3 propanodiol sob condições de alta concentração de substrato (glicerol) (AHRENS et al., 1998).

Na maioria dos microrganismos a enzima glicerol-desidratase é dependente da coenzima B12, sendo ativada por ATP e  $Mg^{+2}$ , e inibida pelo  $O_2$ , excesso de glicerol e de 1,3-propanodiol (FORSBERG, 1987; HEYNDRICKX et al., 1991; SEYFRIED et al., 1996; MACIS et al., 1998; HOMANN et al., 1990; BIEBL et al., 1999; DANIEL et al., 1999; SEIFERT et al., 2001).

Menzel et al. (1998) estudaram o fluxo de carbono e a ação das enzimas na zona central da rota de degradação do glicerol, ou seja, o metabolismo do piruvato, para culturas de *Klebsiella pneumoniae*. O estudo foi centrado na avaliação das atividades das enzimas piruvato-quinase (PK) (EC 2.7.1.40), piruvato:formato-liase (PFL) (EC 2.3.1.54), piruvato-desidrogenase (PDH) (EC 1.2.4.1, EC 1.8.1.4 e EC 2.3.1.12) e na variação da concentração de  $NAD^+$  e  $NADH$  em função da concentração de alimentação e a taxa de consumo de glicerol. Algumas observações e resultados deste trabalho devem ser destacados:

- A atividade da enzima PK, para altas taxas de crescimento e concentração de substrato, deve ser limitada pela disponibilidade de seu substrato fosfoenolpiruvato (PEP) e a coenzima ADP, ou, pela inibição de fatores intracelulares, tais como: o produto piruvato e o ATP;
- sob condições de limitação de disponibilidade de substrato, o fluxo de carbono de piruvato para acetilCoA é catalisado principalmente pela enzima PFL, pois a atividade *in vivo* desta enzima, nas condições citadas, é muito superior à atividade *in vivo* da PDH;
- sob condições de excesso de substrato, as razões das atividades *in vitro:in vivo* das enzimas PFL e PDH são elevadas, maior do que 7 para a PDH e acima de 20 para a PFL. Isto parece ser devido à baixa concentração de piruvato no meio decorrente da baixa atividade específica da PK e de uma limitação de fluxo entre os intermediários PEP e piruvato;
- a concentração de  $NADH_2$  e  $NAD^+$  e razão  $NADH_2/NAD^+$  decrescem com o aumento da concentração de substrato. A diminuição na concentração de  $NAD^+$  não

parece ser a principal causa para o baixo aproveitamento da enzima PDH (atividade *in vivo*);

- as atividades *in vitro* e *in vivo* das enzimas PK, PFL e PDH são fortemente afetadas pela concentração do substrato e pela sua taxa de consumo.

### 3.5.3. Degradação anaeróbia pela bactéria *Clostridium butyricum*

Forsberg (1987) registrou que as cepas de *Clostridium butyricum* IFO 3315, IFO 3858 e CBS 31 eram capazes de fermentar glicerol, sendo os principais produtos o 1,3-propanodiol e o butirato. De acordo com este autor diversas cepas de *Clostridium butyricum* e *Clostridium beijerinckii* foram capazes de utilizar glicerol como única fonte de carbono e energia, neste caso não foi utilizado extrato de levedura na composição do meio, apresentando um rendimento acima de 61% na transformação de glicerol em 1,3-propanodiol.

Zeng et al. (1994) observaram que a fermentação do glicerol pela bactéria *Clostridium butyricum* DSM 5431 (reclassificada como *Clostridium diolis* DSM 15410) a razão butirato:acetato aumenta com o decréscimo do pH do meio. Os dados indicam que o ácido butírico é um inibidor mais forte que o ácido acético em pH neutro. Contudo, em pHs baixos, o ácido acético se torna um inibidor mais forte do que o ácido butírico, por isso a rota metabólica predominante nestes casos leva à formação de butirato.

Saint-Amans et al. (2001) avaliaram os possíveis mecanismos de regulação do fluxo de carbono e elétrons para o crescimento da bactéria *Clostridium butyricum* VPI 3266, sob anaerobiose, em glicose e mistura de glicerol e glicose para pH 6,5. Estes pesquisadores observaram que a produção de hidrogênio e de ácidos diminui quando se comparam a fermentação de glicose pura e a fermentação que utiliza como substrato a mistura de glicerol e glicose. A atividade da enzima piruvato:ferrodoxina-oxidoreductase (PFO) permaneceu aproximadamente estável, enquanto a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase teve sua atividade multiplicada por um fator próximo de cinco na mistura glicerol e glicose. Além disso, a maior parte da ferrodoxina reduzida ( $Fd_{red}$ ) produzida pela transformação do piruvato em acetilCoA, via sistema enzimático piruvato:ferrodoxina-oxidoreductase (PFO), foi utilizada para gerar mais NADH.

Ainda, de acordo com os mesmos autores, um valor baixo na razão de acetilCoA:CoA induziria a enzima bidirecional NADH:ferrodoxina-reductase (esta enzima apresentou uma atividade 10 vezes maior do que a enzima ferrodoxina:NAD<sup>+</sup> reductase) a



atuar preferencialmente na conversão de  $\text{NAD}^+$  em NADH. A produção extra de NADH reforçaria a produção de 1,3 propanodiol pela bactéria *Clostridium butyricum*. Sendo que, a baixa razão acetilCoA:CoA também justificaria a diminuição no volume de ácidos produzidos pela fermentação da mistura glicerol e glicose. A inversão na direção da reação catalisada pela enzima NADH:ferrodoxina-redutase (renomeada pelos autores como NADH:ferrodoxina-oxidoreductase) é confirmada pela diminuição drástica na produção de hidrogênio e o aumento da razão  $\text{CO}_2:\text{H}_2$  para um valor próximo de 15 na mistura glicose e glicerol.

Abbad-Andaloussi et al. (1998) estudaram a fermentação em batelada (pH 7,0) de diferentes substratos: glicose, glicerol e mistura destes pela ação da bactéria *Clostridium butyricum* DSM 5431. Os resultados indicaram que se o substrato é formado pela mistura de glicerol e glicose, apenas a última é utilizada no período inicial de fermentação (5 h). Transcorrido esse intervalo inicia-se a degradação do glicerol diminuindo significativamente o consumo da glicose presente no meio e logo em seguida, a bactéria consome ambos os substratos simultaneamente.

Esses autores registraram que a fermentação de glicerol, pela ação da *Clostridium butyricum*, conduz a uma mistura de acetato, butirato e propanodiol, enquanto a fermentação da glicose produz acetato e butirato, sendo que, se o substrato é formado pela mistura de ambos, a produção de 1,3 propanodiol aumenta significativamente.

Ainda, segundo Abbad-Andaloussi et al. (1998), foi observado que a atividade da enzima acetato-quinase, indiferente do meio de cultura, sempre foi maior que a atividade da enzima butirato-quinase, isto está de acordo com os resultados obtidos por Zeng et al. (1994). A atividade das enzimas glicerol-desidrogenase e 1,3-propanodiol-desidrogenase é baixa no início do processo fermentativo e aumenta ao longo do tempo. Além disso, as taxas de consumo de glicose e de glicerol que inicialmente são  $28\text{-}35 \text{ mmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  e  $8 \text{ mmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  respectivamente, na fase de desaceleração de crescimento assumem valores invertidos com a taxa de consumo de glicose passando para  $2\text{-}3 \text{ mmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  e a do glicerol para  $23\text{-}27 \text{ mmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ . Isto indica que a glicose age como um inibidor na indução dessas enzimas, principalmente na fase inicial da fermentação.

Abbad-Andaloussi et al. (1998) afirmam que se o substrato é formado pela mistura de glicose e glicerol, o catabolismo da glicose seria o responsável pelo fornecimento de energia e de NADH, enquanto a degradação do glicerol seria utilizada para produzir exclusivamente 1,3 propanodiol com a concomitante oxidação e reciclagem do NADH. Esta afirmação foi baseada na observação de que a enzima glicerol-desidrogenase (GDH)

apresentaria um valor de  $K_{m\_aparente}$  maior do que da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GA3PDH) em relação a seus respectivos substratos e cofatores, ou seja, a GDH teria menor afinidade pelo seu substrato e pelo cofator  $NAD^+$ . Tornando este passo metabólico muito mais lento e praticamente fechando esse fluxo material da rota oxidativa da degradação do glicerol. Além disso, a enzima GDH seria mais inibida por altas razões  $NADH:NAD^+$  do que a GA3PDH. Deste modo, como a mistura de glicose e glicerol diminui a razão  $NADH:NAD^+$ , a mesma contribuiria para um maior rendimento de 1,3 propanodiol.

Neste ponto cabe destacar que, de acordo com os dados apresentados por esses autores, a enzima GA3PDH tem uma afinidade da ordem de quatro vezes maior pelo cofator  $NAD^+$  do que a GDH, isto poderia também significar que a baixa disponibilidade deste cofator poderia estrangular este ponto da rota metabólica e não necessariamente a passagem catalisada pela enzima GDH.

Papanikolaou et al. (2004) estudaram a fermentação, batelada e contínua (pH = 7,0), do resíduo obtido constituído pela fase pesada do processo de produção de biodiesel, utilizando a bactéria *Clostridium butyricum* F2b. A composição do resíduo utilizado foi a seguinte: 65% glicerol, 4-5% sais de sódio e potássio, 1% metanol, 1% metais pesado, materiais orgânicos 0,5% e água 28%.

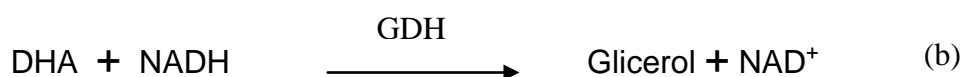
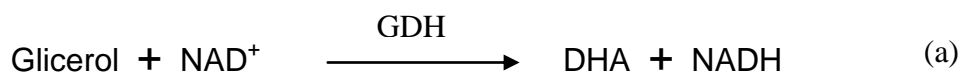
Estes autores relembram que os quatros genes que codificam as enzimas envolvidas (GDH, DHA-quinase, GDHt e PDOR) são codificados em um único regulon. Assim, a produção de subprodutos seria inevitável, para cepas capazes de produzir 1,3 propanodiol, pois o caminho oxidativo seria o responsável pela produção de energia (ATP), enquanto o caminho redutivo é utilizado para regeneração de  $NAD^+$ . Além disso, o NADH pode ser parcialmente regenerado, via produção de ácido butírico, para cepas de *Clostridium*, ou via produção de etanol, para enterobactérias.

Segundo Papanikolaou et al. (2004), a diminuição na produção de biomassa, a estabilidade na produção de 1,3 propanodiol e o aumento da produção de ácidos (acético e butírico), para altas concentrações de glicerol, estariam ligados à saturação do caminho redutivo. Neste caso, a produção de acetato ou butirato contribuiriam para reciclar o NADH. Como a utilização dessas vias metabólicas implica na descarboxilação do piruvato, estas reações devem ser acompanhadas de um aumento na produção de  $CO_2$  e conseqüentemente diminuição da produção de biomassa, fatos comprovados pelos dados experimentais colhidos. A hipótese de saturação do caminho redutivo encontra sustentação na observação de que, para a faixa de concentração testada, a razão na concentração das

enzimas GDH e GDHt se manteve constante. Assim, o aumento da concentração de glicerol no meio levaria o acréscimo no valor da razão  $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ .

Por outro lado, diferente dos resultados obtidos por Zeng et al. (1994) e Reimann et al. (1998), os dados de Papanikolaou et al. (2004) indicam um aumento da produção de ácido butírico em pH igual a 7,0. Isto é um indicativo de que a cepa *Clostridium butyricum* F2b tem potencial para ser utilizada na produção de ácido butírico a partir de um resíduo agroindustrial de baixo custo.

Malaoui e Marczak (2001) determinaram as propriedades das enzimas GDH e PDOR extraídas de células bacterianas, cepas *Clostridium butyricum* E5 e E5-MD, cultivadas em glicerol e pH igual a 6,8. Em relação ao pH ótimo para a reação de oxidação do glicerol catalisada pela enzima GDH e o cofator  $\text{NAD}^+$  e sua reação inversa, a primeira reação tem pH ótimo 7,17 para a cepa E5 e para a reação reversa pH ótimo 8,60. Outro ponto interessante é o valor obtido para o  $K_{m\_aparente}$  observado para a enzima GDH em relação ao substrato e o cofator da reação direta (a) e da reação reversa (b):



No caso da reação (a), o valor do  $K_{m\_aparente}$  da enzima em relação ao substrato e seu cofator são respectivamente  $91,7 \text{ mmol/L}^{-1}$  e  $4,07 \text{ mmol/L}^{-1}$ , enquanto para a reação (b) foram  $1,18 \text{ mmol/L}^{-1}$  e  $0,08 \text{ mmol/L}^{-1}$ . Estes resultados parecem indicar que a reação reversa deve ser favorecida, especialmente se houver o acúmulo de alguns dos metabolitos sequenciais do caminho oxidativo, por exemplo: DHA, gliceraldeído-3-fosfato ou DHAP.

#### 3.5.4. Degradação anaeróbia pela bactéria *Clostridium acetobutylicum*

O *Clostridium acetobutylicum* não é capaz de crescer, sob condições de fermentação, utilizando como única fonte de carbono o glicerol, pois não consegue regenerar o excesso de NADH produzido pelo catabolismo desse substrato (GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2006). Além disso, a fermentação da glicose por esta bactéria (ATCC 824) conduz à produção de ácidos, sendo que, para este tipo de fermentação, não foi

detectada atividade da enzima butiraldeído-desidrogenase (1.2.1.57) e das enzimas CoA-transferase (EC 2.8.3), etanol-desidrogenase (EC 1.1.1.1) e butanol-desidrogenase (EC 1.1.1.1) (VASCONCELOS et al., 1994).

Apesar de parecer contraditório, Forsberg (1987) registrou que as cepas de *Clostridium acetobutylicum* IFO 3853, IFO 3854, NRRL B527 e ATCC 824 eram capazes de fermentar glicerol, mas cabe observar que neste ponto do trabalho o meio de cultura continha na sua formulação, além de glicerol (1%), extrato de levedura (0,2%). Assim, de fato o glicerol não era a única fonte de carbono e energia. O autor ainda destaca que a fermentação do glicerol é um processo cobalto-dependente devido ao fato da enzima GDHt ter como cofator a vitamina B<sub>12</sub>.

Ainda de acordo com Vasconcelos et al. (1994), o crescimento da bactéria *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824), em pH neutro, em misturas de glicerol e glicose, leva à formação de butanol e etanol acompanhado da diminuição da produção de ácidos e hidrogênio. Entretanto, devido ao excesso de NADH produzido na fermentação do substrato misto, visto que o glicerol libera o dobro de equivalentes reduzidos, para a mesma quantidade de carbono metabolizado na forma de glicose, a expectativa seria um aumento na produção de hidrogênio.

Segundo os autores, uma possível justificativa, para o decréscimo na produção de hidrogênio, seria o uso de parte da ferredoxina reduzida (Fd<sub>red</sub>), produzida pela transformação do piruvato em acetilCoA, via piruvato:ferredoxina-oxidoreductase (PFO), para geração de mais NADH. Neste ponto os dados colhidos pelos pesquisadores indicam que:

- a atividade da enzima hidrogenase (EC 1.12.7.1) aumenta quando é utilizada a mistura de glicose e glicerol como substrato (a atividade passa de 5,95 μmol/min/mg para 8,16 μmol /min/mg), enquanto a atividade da NADH:ferredoxina-reductase diminui e da ferredoxina:NAD<sup>+</sup> reductase aumenta;
- a concentração de NAD<sup>+</sup> permanece constante e a concentração de NADH aumenta aproximadamente cinco vezes.

Os resultados levaram os autores a afirmar que de fato a NADH:ferredoxina-reductase é uma enzima diferente da ferredoxina:NAD<sup>+</sup> reductase. Sendo que, a primeira seria responsável pela redução da ferredoxina oxidada (Fd<sub>oxi</sub>), reciclagem de NAD<sup>+</sup> e pela produção de hidrogênio, nas culturas que utilizaram glicose como única fonte de carbono.

Enquanto a ferredoxina:NAD<sup>+</sup> redutase responderia pela redução de NAD<sup>+</sup>, nas culturas onde foi utilizada a mistura de glicose e glicerol como substrato.

Tudo isto, de acordo com Vasconcelos et al (1994), justificaria a necessidade da bactéria *Clostridium acetobutylicum* de reciclar o NAD<sup>+</sup>, por meio de outras vias metabólicas, que conduziriam à produção de etanol e butanol.

Girbal e Soucaille (1994) realizaram experimentos de fermentação com a bactéria *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824), em pH 6,5, com misturas de glicose/glicerol e glicose/piruvato/glicerol (em duas proporções distintas: 0,33 e 0,67 da massa de carbono representada pela glicose).

Tais experimentos envolveram a substituição parcial da glicose por piruvato, um intermediário metabólico que se encontra no fluxo posterior à enzima GA3PDH. Foi observado que essa adição provoca a diminuição na concentração de ATP e aumento de ADP. Os dados parecem sugerir que o piruvato adicionado no início do processo permite um fluxo maior pela GA3PDH antes da mesma ser inibida pelo aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup>. Além disso, valores baixos de ATP contribuem para a formação de butirato, pois a atividade das enzimas ligadas a esta rota aumenta linearmente com o decréscimo da concentração de ATP, sendo que no caso da butirato-quinase (EC 2.7.2.7) o ADP atua como cofator.

Os resultados obtidos indicam que a enzima GA3PDH sofre inibição com o aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup>. Por outro lado, esse aumento estimula a produção de etanol e butanol, além de aumentar a atividade da enzima ferredoxina:NAD<sup>+</sup> redutase. Isto é consequência do fato das enzimas envolvidas na rota de formação do etanol e do butanol serem NADH dependentes. Ainda, segundo os autores, a enzima GDH é pouco afetada pelo aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup> (GIRBAL e SOUCAILLE, 1994).

Em três situações distintas, o cultivo contínuo do *Clostridium acetobutylicum*, em glicose e em uma mistura de glicose e glicerol conduz à produção de solventes (GIRBAL et al., 1995):

- quando o pH foi baixo ou foi adicionado ácido butírico no meio de cultura, foram produzidos etanol, butanol e acetona. Isto foi associado a uma concentração constante ou baixa de NADH, enquanto ocorre uma elevação na concentração de ATP;
- quando, sob condições de pH neutro, houve um decréscimo na atividade da enzima hidrogenase (EC 1.12.7.1), como resultado da adição de CO ou metil-viologen, limitação de ferro no meio de cultura ou ainda quando o

substrato foi formado por uma mistura de glicose e glicerol. Neste caso não foi produzida acetona, e as concentrações de NADH e ATP aumentaram;

- quando utilizadas misturas de glicerol, glicose e um substrato mais oxidado, por exemplo: piruvato. Nestes experimentos observaram-se altas concentrações de NADH e baixas concentrações de ATP.

De acordo com Girbal et al. (1995), as altas taxas de NADH/NAD<sup>+</sup> devem funcionar como um sinal para o aumento da expressão dos genes relacionados com a síntese das enzimas ferredoxina:NAD<sup>+</sup> redutase, butiraldeído e álcool desidrogenases, e simultaneamente para a diminuição da expressão do gene ligado à NADH:ferredoxina-redutase.

González-Pajuelo et al. (2006) desenvolveram uma nova cepa de *Clostridium acetobutylicum* DG1, geneticamente modificada, pela introdução dos genes responsáveis pela produção de 1,3 propanodiol, provenientes da bactéria *Clostridium butyricum* VPI 3266. Além disso, foi comparado o desempenho fisiológico da nova cepa com o da cepa mãe, na fermentação de glicerol (pH igual a 6,5), avaliando o tipo e a atividade das enzimas envolvidas, bem como as concentrações de NADH e NAD<sup>+</sup>.

De modo geral, segundo González-Pajuelo et al. (2006), as duas cepas apresentaram desempenhos similares: o principal produto da fermentação foi o 1,3 propanodiol, a produção de H<sub>2</sub> foi pequena e foram registradas altas taxas de NADH/NAD<sup>+</sup>. Entretanto, a relação entre a pequena quantidade de hidrogênio produzido e a alta razão NADH/NAD<sup>+</sup> teve uma origem distinta para as duas cepas:

- no caso da *Clostridium butyricum* VPI 3266 foi registrada baixa atividade da enzima hidrogenase (0,045 U/mg<sub>proteína</sub>), isto levaria ao acúmulo de Fd<sub>red</sub> e induziria a expressão e a inversão de fluxo da enzima bidirecional NADH:ferredoxina-oxidoreductase, que de fato apresenta uma atividade dez vezes superior à atividade da enzima ferredoxina:NAD<sup>+</sup> redutase;
- para a cepa *Clostridium acetobutylicum* DG1, geneticamente modificada, o nível de atividade da enzima hidrogenase permanece alto (0,43 U/mg<sub>proteína</sub>) e a atividade da enzima ferredoxina:NAD<sup>+</sup> redutase se mostra 7,4 vezes superior a NADH:ferredoxina-oxidoreductase e portanto deve ser esta a enzima responsável pelo aumento da produção de NADH.

Contudo, de acordo com os autores, a principal diferença determinada entre as duas cepas testadas, *Clostridium butyricum* VPI 3266 e *Clostridium acetobutylicum* DG1, reside no fato de que a primeira delas utiliza como braço oxidativo as reações ligadas às enzimas GDH e DHA-quinase, enquanto a segunda utiliza as reações relacionadas com as enzimas GK e G3PDH (caminho *glp*). Este último fato foi confirmado pela análise da atividade enzimática e o confronto com os dados de genoma disponíveis na literatura, para a bactéria *Clostridium acetobutylicum*, que indicam a presença dos genes ligados ao caminho *glp* e a inexistência dos genes relacionados ao caminho *dha*. É interessante lembrar que o caminho *glp* já foi descrito para as bactérias *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* apenas sob condições aeróbias.

Além disso, segundo González-Pajuelo et al. (2006), o fluxo metabólico das duas cepas testadas, é limitado pela enzima GA3PDH, cujo controle está ligado à taxa NADH/NAD<sup>+</sup>. Por outro lado, o metabolismo central conduziu preferencialmente à transformação do piruvato em acetilCoA em detrimento do lactato, isto no caso da cepa *Clostridium acetobutylicum* DG1, pois para a bactéria *Clostridium butyricum* VPI 3266 não foi detectado atividade da enzima lactato-desidrogenase. A conversão de piruvato em acetilCoA foi atribuída à enzima piruvato:ferrodoxina-oxidoredutase (PFO), pois a atividade da outra enzima envolvida neste ponto, a piruvato:formato-liase (PFL), foi 25 vezes menor do que a da PFO.

### 3.5.5 Degradação anaeróbia pela bactéria *Clostridium pasteurianum*

Nakas et al (1983) testaram a capacidade de cinco cepas do genus *Dunaliella* de acumular glicerol. Além disso, os pesquisadores avaliaram o potencial dessas algas serem utilizadas como biomassa em processos fermentativos. Nos ensaios de fermentação foi utilizada uma cepa de *C. pasteurianum* e o substrato foi formado pela biomassa das algas suplementada com 4% de glicerol, sendo que os principais produtos obtidos foram o n-butanol e o 1,3 propanodiol, além de quantidades menores de etanol e acetato. Os dados indicam que o aumento da concentração de NaCl até 1,0 M estimula a produção de solvente, acima desse valor a quantidade de solventes produzida diminui e torna-se praticamente zero em concentrações superiores a 3 M de NaCl.

Heyndrickx et al (1991) utilizaram a cepa de *Clostridium pasteurianum* LMG 3285 em experimentos de fermentação de glicerol em sistemas batelada e contínuo. Na fermentação batelada sem controle de pH (valor inicial 6,8) os principais produtos foram o

hidrogênio e o 1,3-propanodiol, também foram produzidos butirato, acetato e n-butanol, sendo que mais de 90% do glicerol disponível foi degradado. Os autores identificaram a presença de uma enzima específica à produção de 1,3-propanodiol, sendo que esta tem caráter citoplasmático e perde 35% de sua atividade após um dia de exposição ao ar. Enquanto, a atividade das enzimas desidrogenases ligadas à produção do etanol e do n-butanol tem apenas 20% de sua origem no citoplasma e sua degradação atinge 70% após 24 h de exposição ao ar.

Os ensaios de fermentação contínua sob condições de pH controlado (6,0) e glicerol limitado (100 mmoles/L) demonstraram que a bactéria *C. pasteurianum* converte apenas 6% do glicerol em 1,3-propanodiol e a produção de n-butanol é a principal via de regeneração de NAD<sup>+</sup>. Além disso, a ferredoxina reduzida (Fd<sub>red</sub>) é reoxidada pela ação do sistema enzimático ferredoxina-hidrogenase com a consequente produção de H<sub>2</sub>. Os dados indicaram que uma pequena parte do hidrogênio formado tem origem na regeneração de NAD<sup>+</sup>. Por outro lado, a adição de acetato induziu o aumento da produção de n-butanol, o crescimento no percentual de recuperação de carbono e a diminuição do rendimento de ATP (HEYNDRICKX et al., 1991).

Dabrock et al. (1992) estudaram a degradação fermentativa do glicerol em sistema batelada para a cepa *C. pasteurianum* DSM 525, com concentração de glicerol variando entre 20 g/L e 200 g/L, pH inicial igual a 7,0 e condições não limitadas de qualquer outro nutriente. Ensaios de fermentação contínua foram realizados para a concentração de substrato de 40 g/L, com algumas alterações na composição do meio e sob condições limitantes de fosfato ou ferro.

Os mesmos autores observaram que *C. pasteurianum* DSM 525 é capaz de manter elevadas taxas de crescimento microbiano e de consumo de glicerol, no processo batelada, para concentrações de substrato de até 17% (m/v). Os principais produtos da fermentação foram: etanol, 1,3-propanodiol e n-butanol. Para concentrações de glicerol superiores a 8% a produção de 1,3 propanodiol é favorecida em detrimento do etanol. A bactéria foi capaz de degradar um máximo de 300 mmol/L de glicerol sob as condições experimentais utilizadas.

No caso das fermentações em sistema contínuo foi observado que a limitação de Fe<sup>+2</sup> (concentração equivalente a 3 μM) favoreceu a produção de 1,3-propanodiol (0,43 mol) e lactato (0,20 mol), enquanto, há um decréscimo na produção de etanol (0,10 mol) e n-butanol (0,10 mol), sendo os valores referenciados a um mol de substrato. Por outro lado, a condição de excesso de Fe<sup>+2</sup> (concentração igual a 23 μM) favoreceu a produção dos solventes: etanol (1,1 mol/mol de glicerol), 1,3-propanodiol (aproximadamente 0,62



mol/mol de glicerol) e butanol (aproximadamente 0,45 mol/mol de glicerol). Isto parece indicar que as desidrogenases ligadas à formação do n-butanol e do etanol sejam ferro dependentes. No caso da limitação de fosfato foi determinada a produção de 0,30 mol de etanol, 0,18 de n-butanol e 0,18 de 1,3-propanodiol por mol de substrato (DABROCK et al, 1992).

Biebl (2001) realizou diversos experimentos relativos à fermentação do glicerol, em sistemas batelada e contínuo, pela bactéria *C. pasteurianum* DSM 525. Na maioria dos ensaios realizados o principal produto obtido foi o n-butanol, a exceção foram algumas fermentações contínuas, sob pH controlado e excesso de substrato, para as quais o 1,3-propanodiol e o lactato se tornaram os principais produtos. Isto reforça os dados de Heyndrickx et al (1991) e Dabrock et al (1992) que já indicavam que a bactéria *Clostridium pasteurianum* produz preferencialmente n-butanol (caminho energético preferencial). Entretanto, a produção de 1,3-propanodiol se faz necessária, para obter o balanço de oxidorredução, pois o substrato é mais reduzido que a massa celular formada e é preciso um aceptor final de elétrons. Sendo que, de acordo com os balanços de massa e energia apresentados pelo autor, seria necessário produzir pelo menos 9% de 1,3-propanodiol para obter o equilíbrio redox, se o objetivo fosse produzir um perfil de fermentação contendo apenas n-butanol e 1,3-propanodiol. Utilizando essa aproximação simplificada do balanço de massa e energia do processo fermentativo, a otimização na produção de 1,3 propanodiol (64,5%) aconteceria se fosse produzido apenas acetato como segundo produto da fermentação do glicerol.

Ainda segundo Biebl (2001), o processo de fermentação em batelada foi caracterizado por:

- a taxa de crescimento microbiano e o perfil dos produtos de fermentação não foram afetados significativamente por alterações de pH. Esta característica já fora observada por Dabrock et al. (1992) no estudo da fermentação de glicose pelo *C. pasteurianum*;
- a produção do 1,3-propanodiol e do butirato acontece nos primeiros estágios do processo fermentativo, enquanto, a formação do n-butanol começa algumas horas mais tarde;
- para elevadas concentrações de glicerol, devido à inibição pelo produto, somente até 60 g/L de substrato foram consumidas, resultando em baixa conversão e em glicerol residual no meio de cultura.

Em relação aos ensaios em sistema contínuo, Biebl (2001) registrou que o acréscimo no valor da concentração de alimentação, entre 100 mM e 350 mM de glicerol, leva a aumentos lineares da massa bacteriana formada e da taxa de consumo do glicerol. Enquanto, para fluxos de alimentação com concentração variando entre 350 mM e 800 mM de glicerol, a taxa de produção de biomassa se tornou levemente decrescente e a taxa de consumo de glicerol ficou estável. Finalmente, para concentrações de glicerol superiores a 800 mM as taxas de formação de biomassa e consumo de glicerol caíram rapidamente.

### 3.5.6 Degradação anaeróbia pela bactéria *Enterobacter agglomerans*

Barbirato et al. (1995) isolaram e identificaram, a partir da lama de um biodigestor de águas residuárias, uma bactéria facultativa Gram-negativa capaz de degradar glicerol em anaerobiose: *Enterobacter agglomerans*. Foram testadas concentrações de glicerol variando entre 20 g/L e 100 g/L, o pH foi regulado em 7,0 e a temperatura controlada em 30 °C. As determinações analíticas identificaram o 1,3-propanodiol e o acetato como os principais produtos de fermentação. Também foram produzidos: etanol, formato, lactato, succinato e traços de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (indicativo de baixa atividade da enzima FHL). Os balanços de massa mostraram que a produção de 1,3-propanodiol funciona como mecanismo para a regeneração de NAD<sup>+</sup>, enquanto, a produção de acetato contribui com a maior parte da geração de ATP. Somente para concentrações de substrato inferiores a 40 g/L foi possível obter 100% de recuperação de carbono, ou seja, sua total degradação.

De acordo com Barbirato et al. (1995), altas concentrações de glicerol mudaram significativamente o perfil dos produtos da fermentação:

- aumento no rendimento de 1,3-propanodiol, diminuição no rendimento de lactato e inexistência ou acúmulo mínimo de etanol;
- decréscimo no rendimento de formato;
- diminuição da razão entre a quantidade de biomassa formada e a quantidade de ATPs gerados, ou seja, o rendimento de ATP é inversamente proporcional à taxa de formação do 1,3-propanodiol. Esse decréscimo no rendimento de ATP é característico de fermentações sob condições de excesso da fonte de energia e que levam ao “overflow metabolism” (STREEKSTRA et al., 1987).

Ainda, segundo Barbirato et al. (1995), a degradação incompleta do substrato, para concentrações iniciais superiores a 40 g/L, foi acompanhada pelo descompasso no balanço

de oxidorredução e o aparecimento de um componente desconhecido na análise de CLAE. Estes dados indicam o acúmulo de um metabólito intermediário como sendo o responsável pela inibição do crescimento microbiano da bactéria *Enterobacter agglomerans*, sob condições de alta concentração de glicerol. Dados complementares demonstraram que o substrato, o 1,3-propanodiol e o acetato não atuaram como inibidores sob as condições experimentais utilizadas.

Barbirato et al. (1996a) determinaram que o lactato, succinato, formato e etanol não são os responsáveis pelas interrupções do crescimento microbiano e da fermentação do glicerol pela *E. agglomerans* (CNCM 1210). Além disso, o metabólito desconhecido que se acumulou (até 30 mM), quando foram utilizadas altas concentrações de substrato (glicerol), foi identificado como sendo 3-hidroxiopropanaldeído (3-HPA). Ensaios adicionais demonstraram o poder bacteriostático e o acúmulo deste componente em processos fermentativos envolvendo não somente a *E. agglomerans*, mas também as bactérias *K. pneumoniae* ATCC 25955 e *C. freundii* ATCC 8090, com a diferença de que o acúmulo teve caráter transitivo e valores limites de 24 mM e 17 mM, respectivamente.

Barbirato et al. (1996b) avaliaram o efeito do pH no processo de fermentação batelada do glicerol, com concentração inicial de substrato igual a 700 mM, pela *E. agglomerans* CNCM 1210, e observaram que:

- quanto menor o pH menor a taxa de recuperação de carbono;
- o acúmulo de 3-HPA se inicia mais cedo quanto menor for o pH;
- a enzima GDH é fortemente inibida pelo 3-HPA;
- a taxa  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  igual a 1,76 está correlacionada com o início do acúmulo do 3-HPA, para culturas crescendo em pH 7,0, enquanto na concentração máxima do 3-HPA (30 mM) a taxa  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  atinge o valor de 2,6;
- quando o pH aumenta a atividade das enzimas glicerol-desidrogenase e 1,3-propanodiol-desidrogenase aumenta, enquanto a atividade da DHA-quinase fica praticamente inalterada e a atividade da enzima glicerol-desidratase diminui drasticamente;
- para pH menores do que 7,5 a razão entre a atividade da enzima GDHt e a enzima PDOR é maior que a unidade e o acúmulo do 3-HPA acontece até a interrupção da fermentação, entretanto para o pH igual a 8,0 este valor é 0,6 e o acúmulo de 3-HPA é transitório e o processo fermentativo continua até o esgotamento do substrato. Para concentrações de substrato inferiores a 480 mM

o comportamento da atividade enzimática é similar ao descrito, contudo não se observou acúmulo de 3-HPA;

- os resultados demonstraram que o  $\text{NAD}^+$  comporta-se como um inibidor competitivo com  $K_i$  igual a 0,29 mM. Isto pode indicar que a razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  é a provável responsável pela parcial inibição da enzima PDOR.

Barbirato et al. (1997b) realizaram ensaios de culturas contínuas de *E. agglomerans* CNCM 1210, sob condições de pH regulado em 7,0 e concentração inicial de substrato igual a 20 g/L, para taxas de diluição variando entre 0,05 e 0,31. Para cada caso foram determinados: os perfis de distribuição dos produtos de fermentação, o nível de atividade enzimática da rota oxidativa, redutiva e glicolítica, a quantidade dos nucleotídeos e a concentração de dihidroxiacetona (DHA), dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e frutose-1,6-difosfato (FDP). Os pesquisadores determinaram que a degradação do piruvato deva acontecer através de três enzimas: lactato-desidrogenase (LDH), piruvato-formato-liase (PFL) e piruvato-desidrogenase (PDH). Eles pressupõem que a pequena formação de gás seja um indicativo que o  $\text{CO}_2$  formado pela PDH seja utilizado em algum passo metabólico de incorporação de carbono ou ainda na formação de carbonato pela absorção do meio de cultura. Baixos níveis de atividade da enzima PFL foram observados para altas concentrações de glicerol, isto parece estar associado ao aumento da concentração de triose fosfatos, em especial DHAP, que por sua vez foram consequência da baixa atividade da enzima GAPDH.

Assim, de acordo com Barbirato et al. (1997b) altas taxas de degradação de glicerol resultariam na limitação ou estrangulamento da via glicolítica pela enzima GAPDH e na distribuição preferencial do substrato pela rota redutiva. Neste caso a produção preferencial de 1,3 propanodiol funcionaria como um marca passo da rota oxidativa aumentando a regeneração e disponibilidade de  $\text{NAD}^+$  na tentativa de minimizar o passo limitante (inibição da enzima GAPDH). Isto explicaria por que altas taxas de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  foram observadas apesar de o organismo crescer em um meio reduzido. Além disso, aconteceria o acúmulo de 3-HPA caracterizando o “overflow metabolism”. Contudo, essa distribuição preferencial do substrato não conseguiria evitar o acúmulo de triose fosfatos e o subsequente aumento de atividade das enzimas PDH e LDH.

Barbirato e Bories (1997) avaliaram o efeito do pH nas enzimas glicolíticas, no processo de fermentação do glicerol (contínua e batelada), com concentração inicial de

substrato igual 20 mM. Para as culturas em batelada a variação nos valores da atividade enzimática em função do aumento do pH entre 6,5 e 8,0 foi:

- insignificante para as enzimas piruvato-quinase, aldeído-desidrogenase e álcool-desidrogenase;
- aumenta para as enzimas GAPDH e LDH;
- diminui para as enzimas PDH, fosfato-transacetilase, acetato-quinase e PFL. No caso desta última enzima a diminuição da atividade enzimática é da ordem de oito vezes.

Para as culturas contínuas o fluxo de carbono se mostrou fortemente dependente da taxa de diluição, sendo que o glicerol foi direcionado preferencialmente para a produção de DHAP quando as taxas de diluição foram baixas e para a produção de 1,3-propanodiol quando as taxas de diluição foram altas.

Barbirato et al. (1998) avaliaram o processo de fermentação do glicerol em um reator batelada, com controle da temperatura em 30 °C e em pH 7,0. Foram acompanhadas as variações das concentrações de 3-HPA,  $\text{NAD}^+$ , NADH, DHAP, GAP e FBP, além da variação das taxas específicas de consumo de glicerol e formação de 1,3-propanodiol ao longo do processo fermentativo, e o nível de atividade da enzima GAPDH.

Observa-se nos dados de Barbirato et al. (1998), que o processo fermentativo pode ser dividido em duas fases. Na primeira delas há aumento na concentração de  $\text{NAD}^+$  de 8,2 a 10,4  $\mu\text{mol g}^{-1}$ , enquanto a concentração de NADH primeiro decresce pouco de 6 a 5,6 e depois retorna a 6  $\mu\text{mol g}^{-1}$  e a atividade enzimática da GAPDH inicialmente permanece constante e após cresce pouco entre aproximadamente 2 e 2,3  $\text{U mg}^{-1}$ . Por outro lado, na primeira fase, a concentração de GAP permanece baixa, oscilando abaixo de 5  $\mu\text{mol g}^{-1}$ , as concentrações de DHAP e FBP crescem continuamente (entre 16 e 34, e 8 e 11  $\mu\text{mol g}^{-1}$ , respectivamente) e as taxas específicas de consumo do glicerol e formação do 1,3-propanodiol foram sempre crescentes até 83 e 46  $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ , respectivamente. A segunda fase da fermentação foi marcada pelo início do rápido acúmulo do 3-HPA, até 62  $\text{g L}^{-1}$  e posterior redução a 50  $\text{g L}^{-1}$ , decréscimo nas concentrações de  $\text{NAD}^+$  e NADH, até ~4 e 1,8  $\mu\text{mol g}^{-1}$ , respectivamente, decréscimo da atividade da enzima GAPDH até 1  $\text{U mg}^{-1}$ , acompanhado de aumento contínuo na razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e um comportamento decrescente nas taxas específicas de consumo do glicerol e formação do 1,3-propanodiol, até sua redução a zero em 25 h.

Deste modo, a fronteira entre as duas fases do processo fermentativo foi caracterizada por um ponto de máximo para as taxas de consumo de glicerol e formação de

1,3 propanodiol, uma taxa de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  superior a 1,7 e o início do acúmulo do metabólito 3-HPA. Assim, sob condições de alta concentração de glicerol ocorre um desacoplamento entre as atividades de sínteses e consumo de  $\text{NADH}$ , em função da inibição da enzima GAPDH, conduzindo a um aumento da razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e na sequência a inibição parcial da enzima PDOR, isto resulta no acúmulo de 3-HPA (BARBIRATO et al., 1998).

### 3.5.7 Degradação anaeróbia pela bactéria *Citrobacter freundii*

Werkman e Gillen (1932) propuseram a criação de um novo gênero, o *Citrobacter*, para família Bacteriaceae (hoje denominada Enterobacteriaceae), tendo, entre outras características bioquímicas, alta capacidade de fermentação de glicerol e sua transformação em trimetileno-glicol (1,3-propanodiol).

Mickelson e Werkman (1940) analisaram dados experimentais próprios e os resultados obtidos por Braak (1928), a respeito da fermentação de glicerol por diversas cepas de *Citrobacter freundii*. Nessa análise foi observado que a adição de fumarato ao meio de cultura provocava o aumento na produção de succinato e diminuição na produção de hidrogênio, sem afetar as quantidades dos demais componentes do perfil de fermentação. Também foi detectada a presença de acroleína, principalmente quando foi adicionado bissulfito de sódio ao meio, isto levou os autores a cogitar a possibilidade de que a acroleína se trata de um intermediário na degradação do glicerol até 1,3-propanodiol. Esta hipótese foi descartada pelos pesquisadores em função da toxicidade da acroleína quando adicionada ao meio de cultura e devido ao fato da adição do bissulfito (fixador de acroleína) ser acompanhada de um aumento do rendimento de 1,3-propanodiol.

Entretanto, as suspeitas de Mickelson e Werkman (1940) foi o primeiro indício de que o intermediário do braço redutivo da degradação do glicerol é o 3-hidroxiopropanaldeído (3-HPA). Isto por que a acroleína não é sintetizada diretamente pela bactéria, mas uma pequena parte do 3-HPA se transforma nesse componente por uma reação química de desidratação (SLININGER et al., 1983; FUGELSANG e EDWARDS, 2007).

Toraya et al (1980) avaliaram a distribuição das enzimas diol desidratase e glicerol desidratase em um conjunto de bactérias pertencentes aos gêneros *Enterobacteriaceae* e *Propionibacteriaceae*. Foi determinado que a *Citrobacter freundii* AKU 0009 possui uma enzima específica para a degradação fermentativa do glicerol via redução (GDHt). Os

autores ainda destacam que, sendo o glicerol mais reduzido que suas correspondentes trioses, a habilidade de converter uma parte do glicerol em um acceptor de elétrons é essencial à degradação anaeróbia desse substrato. Em outras palavras, os organismos que produzem GDHt ou diol desidratase (em menor grau) serão capazes de fermentar o glicerol na ausência de um receptor exógeno de elétrons. Isto confirma as hipóteses de Abeles et al. (1960).

Boenigk et al. (1993) utilizaram a bactéria *Citrobacter freundii* DSM 30040, para fermentação de glicerol, em sistema contínuo simples de um estágio. Inicialmente, foi verificado que, sob condições de excesso de substrato e limitações de fosfato (0,75 mM) ou nitrogênio (2,9 mM de amônia), o rendimento de 1,3-propanodiol e a atividade das enzimas ligadas a sua produção foram muito baixas. Por outro lado, os experimentos sob condições de limitação de substrato (300 mM de glicerol) indicam que o rendimento máximo de 1,3-propanodiol (0,54 mol/mol de substrato) é atingido para uma taxa de diluição igual  $0,3 \text{ h}^{-1}$ . Também foi observado que a razão propanodiol/etanol triplica com o aumento da taxa de diluição de 0,08 para  $0,3 \text{ h}^{-1}$ . Além disso, a atividade das enzimas GDH e PDOR foi sempre muito superior à atividade da enzima GDHt, sendo que a atividade da enzima PDOR aparentemente não sofre influência significativa em função da variação da taxa de diluição, enquanto a atividade da enzima GDH tende a diminuir com o aumento da mesma, e a atividade da enzima GDHt aumenta de 0,05 para  $1,3 \text{ U}/(\text{mg de proteína})$ .

Boenigk et al. (1993) também propuseram um sistema de fermentação contínua em dois estágios: no primeiro estágio as condições fixadas (substrato limitante,  $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ ,  $31 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH neutro) estimulam a formação de biomassa ativa ( $\text{DO} = 3,7$ ) e no segundo estágio às condições ( $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ ,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 6,6) levam a uma máxima produção de 1,3-propanodiol (545 mM). Assim, o rendimento de 1,3-propanodiol atinge  $0,62 \text{ mol}/(\text{mol de substrato})$ , valor superior àquele obtido na fermentação contínua em um estágio ( $0,54 \text{ mol/mol de substrato}$ ) ou na fermentação batelada ( $0,60 \text{ mol/mol de substrato}$ ).

Pflugmacher e Gottschalk (1994) imobilizaram células de *Citrobacter freundii* DSM 30040 sobre partículas de poliuretano modificado (PUR 90/16) e realizaram ensaios de fermentação contínua em um reator de leito fixo com reciclo. Os dados indicam que para altas taxas de diluição ( $D = 0,6 \text{ h}^{-1}$ ) a temperatura ótima está localizada entre  $30\text{-}36 \text{ }^\circ\text{C}$  e o pH ótimo entre 6,6 e 7,1. Em alguns experimentos, fixados  $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ ,  $T = 36 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH = 6,9, foi variada a concentração de glicerol na alimentação (entre 400 e 800 mM), sendo que a máxima concentração de substrato que pode ser consumido foi 540 mM com uma produtividade de  $5,6 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ . Isto significa que altas concentrações de glicerol não

conduzem a melhoras significativas na produtividade de 1,3-propanodiol. Em outra sequência de ensaios foi avaliado o efeito da taxa de diluição (entre 0,3 e 0,6), para uma concentração de glicerol igual a 400 mM, nestes experimentos obtiveram 8,2 g/(L·h) 1,3-propanodiol para  $D = 0,5$  e foi observado que a produtividade das células imobilizadas foi diretamente proporcional à taxa de diluição na faixa entre 0,3 e 0,6.

Daniel et al. (1995) determinaram os parâmetros cinéticos das enzimas ligadas ao braço oxidativo da fermentação do glicerol, de acordo com o modelo cinético de Michaelis-Menten, sendo que para a enzima GDH o  $K_{m\_aparente}$  em relação ao substrato (glicerol) e seu cofator ( $NAD^+$ ) são respectivamente 1270  $\mu M$  e 57  $\mu M$ , enquanto que para a enzima DHA-quinase o  $K_{m\_aparente}$  em relação ao substrato (DHA) e seu cofator (ATP) são respectivamente 30  $\mu M$  e 70  $\mu M$ .

De acordo com Toraya (2000), a união do cofator (vitamina  $B_{12}$ ) com a enzima glicerol desidratase ativa a ligação Co—C, levando a quebra homolítica da ligação Co—C e produzindo o radical livre 5'-desoxiadenosil. A ativação do substrato acontece quando o radical adenosil retira um átomo de hidrogênio do glicerol produzindo um novo radical que após o rearranjo necessário leva à eliminação de água e à formação do 3-HPA (acceptor de elétrons).

A enzima GDHt, em testes *in vitro*, perde a sua atividade catalítica em função da liberação do cofator, liberando 5'-desoxiadenosina e uma cobalamina modificada desconhecida, sendo que esta última permanece ligada a GDHt. *In situ*, a reativação aconteceria pela troca da cobalamina modificada pelo cofator livre não modificado, isto coordenado pela ação de um complexo formado pelas proteínas *dhaF* e *dhaG* na presença de  $Mg^{+2}$ , ATP e do cofator (vitamina  $B_{12}$ ). Foi observado que o gene da proteína *dhaF* está transcrito junto aos códigos dos três genes da enzima GDHt. Enquanto, o gene da proteína *dhaG* está localizado junto ao gene que codifica a enzima PDOR, em outras palavras, a regulação do braço redutivo da fermentação do glicerol é fortemente acoplada com o objetivo de procurar evitar o acúmulo de 3-HPA e seus efeitos negativos no crescimento da bactéria (SEIFERT et al., 2001).

### 3.5.8 Degradação anaeróbia por *Lactobacillus*

Mills et al. (1954) realizaram estudos sobre a formação de acroleína em mostos de destilarias e cervejarias. Estes pesquisadores isolaram um microrganismo não identificado, provavelmente uma bactéria láctica, que não cresceu significativamente quando a fonte de



carbono foi exclusivamente glicerol. Contudo, os dados deste trabalho indicaram que o glicerol foi mais eficientemente utilizado na presença de pequenas quantidades de glicose.

Serjak et al. (1954) isolaram e identificaram 265 microrganismos presentes no mosto de fermentação de diversos cereais. Toda a microbiota bacteriana presente nas amostras foi identificada como membros do gênero *Lactobacillus* tendo de acordo com a espécie maior ou menor capacidade de degradar glicerol.

Estudos sobre a degradação de glicerol pelo *Lactobacillus* cepa 280-A indicaram que a degradação deste substrato produz quantidades equimolares de ácido  $\beta$ -hidroxipropiônico e 1,3-propanodiol (trimetileno glicol). A cofermentação de glicerol e glicose conduz à produção de acetato, lactato, dióxido de carbono e 1,3-propanodiol. No caso da cofermentação de glicerol e glicose foi determinado, por rastreamento por  $C^{14}$ , que a degradação da glicose é responsável pela geração de energia, enquanto o glicerol, por meio do seu intermediário metabólico 3-hidroxipropanaldeído (3-HPA) atua como receptor de elétrons (SOBOLOV e SMILEY, 1960).

Cantoni e Molnar (1967) testaram cepas padrões de *Lactobacillus bulgaricus*, *L. casei* var. *casei* e *L. brevis* e cepas isoladas de embutidos na degradação fermentativa de glicerol, sendo que somente o *L. brevis* foi incapaz de degradar o glicerol como única fonte de carbono e energia. Os produtos obtidos foram lactato, acetaldeído e acetato, e quantidades menores de succinato, propionato, butirato, acetona, ácido isovaleraldeído, propanaldeído e acroleína. Baseados nesses dados os autores propuseram dois caminhos metabólicos, paralelos e simultâneos, para a degradação de glicerol pelos lactobacilos estudados: um secundário no qual o glicerol sofre desidratação se transformando em hidroxipropanaldeído e outro no qual ocorre a oxidação do glicerol para piruvato.

Slininger et al. (1983) extraíram a enzima glicerol-desidratase a partir de cepas do *Lactobacillus* sp. NRRL B-1720 e testaram a capacidade desta produzir 3-HPA *in vitro*. Para concentrações de glicerol variando entre 10 e 50 g/L foram consumidos no máximo 9 g/L de substrato e obtidos 7,1 g/L de 3-HPA. A enzima foi rapidamente desativada, entre 60 e 90 min, e os resultados obtidos para consumo de glicerol e produção de 3-HPA foram praticamente independentes da concentração inicial de substrato.

Schutz e Radler (1984) observaram que cepas *L. brevis* e *L. buchneri* crescem significativamente quando a fonte de carbono e energia é constituída por uma mistura de glicose e glicerol. Enquanto, a glicose foi fermentada a acetato, lactato e dióxido de carbono, o glicerol foi transformado em 1,3-propanodiol. Foram identificadas como responsáveis pelo processo de degradação do glicerol as enzimas glicerol-desidratase e 1,3-

propanodiol-desidrogenase. Em meios contendo glicerol como única fonte de carbono não houve crescimento do *L. brevis* e *L. buchneri*, isto parece indicar a inexistência ou repressão das enzimas do braço oxidativo (GDH ou GK).

Talarico et al. (1988) propuseram que o caminho metabólico de degradação do glicerol, pelo *Lactobacillus reuteri*, envolve duas etapas: na primeira a enzima glicerol-desidratase converte o glicerol para 3-hidroxiopropanaldeído (3-HPA), enquanto na segunda etapa ocorre a dismutação do 3-HPA produzindo 1,3- propanodiol e ácido  $\beta$ -hidroxipropiônico em quantidades equimolares. Os pesquisadores observaram que a presença crescente de glicose no meio de fermentação levava a um aumento do rendimento de 1,3- propanodiol, enquanto a produção de ácido  $\beta$ -hidroxipropiônico diminuiu. Isto foi atribuído à atuação do 3-HPA como receptor de elétrons no processo de cofermentação. Nos ensaios experimentais a técnica utilizada incluía uma fase inicial de produção da biomassa, seguida do processo de cofermentação propriamente dito.

A degradação fermentativa do glicerol produz uma substância denominada reuterina, potente antimicrobiano de amplo espectro, identificado como uma mistura em equilíbrio das formas monomérica, monomérica hidratada e o dímero cíclico do 3-HPA (AXELSSON et al., 1989; TALARICO e DOBROGOSZ, 1989). Estudos posteriores indicam que a atividade antibiótica da reuterina está relacionada com a forma monomérica hidratada (VOLLENWEIDER et al., 2003).

Talarico e Dobrogosz (1990) e Talarico et al. (1990) purificaram e caracterizaram as enzimas glicerol-desidratase e 1,3-propanodiol:NAD<sup>+</sup> oxidorreductase como responsáveis pelas etapas metabólicas da degradação fermentativa do glicerol pelo *Lactobacillus reuteri*. Além disso, Talarico et al. (1990) observaram que o *Lactobacillus reuteri* 1063 não foi capaz de crescer em meios que utilizam o glicerol como única fonte de carbono e energia. Assim, a fermentação do glicerol serve como um mecanismo de regeneração de NAD<sup>+</sup> nos processos de cofermentação permitindo o melhor aproveitamento do acetil-fosfato para a produção de ATP via produção de acetato. Estes resultados foram similares àqueles obtidos por Shutz e Radler (1984) em relação a *L. brevis* e *L. buchneri*.

Veiga-Cunha e Foster (1992a) também confirmam os achados de Shutz e Radler (1984), para *L. brevis* B22 e *L. buchneri* B190. Contudo, observam que o processo de degradação do glicerol em cofermentação com glicose foi caracterizado por duas fases de crescimento. Sendo que, na segunda fase o lactato produzido inicialmente a partir da glicose foi convertido em acetato, via piruvato. Assim, foi produzida uma maior

quantidade de ATP para suportar o crescimento dos lactobacilos e uma quantidade extra de NADH para a transformação enzimática de 3-HPA em 1,3-propanodiol evitando os efeitos tóxicos do acúmulo de 3-HPA.

*Pediococcus pentosaceus* N<sub>5</sub>p foi capaz de crescer utilizando glicerol como única fonte de carbono e energia, sob condições microaeróbias, produzindo lactato, acetato e diacetil. O principal caminho metabólico utilizado, para a degradação de glicerol, nesta bactéria inclui as enzimas glicerol-quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase. Contudo, também foi identificada a presença das enzimas relativas ao caminho metabólico iniciado pela enzima glicerol-desidrogenase. Este constitui o primeiro registro da atuação conjunta destes dois caminhos metabólicos para a degradação de glicerol por bactérias lácticas sob condições microaeróbias (SALADO e STRASSER de SAAD, 1995; PASTERIS e STRASSER de SAAD, 1997).

El-Ziney et al. (1998) observaram que o acúmulo de 3-HPA, para processo batelada com proporção molar inicial de 2,5:1 (glicerol:glicose), utilizando o *L. reuterin* 12002, acontece quando o microrganismo atinge a fase estacionária de crescimento (12 h). Por outro lado, para processos contínuos com taxa de diluição 0,17 h<sup>-1</sup> e proporção molar 7,5:1 (glicerol:glicose) no tanque de alimentação, observa-se o acúmulo de 3-HPA na fase logarítmica de crescimento. Contudo, neste caso a produção de lactato e 1,3-propanodiol diminuem, enquanto as concentrações de etanol e reuterina (3-HPA) aumentam.

Estudos sobre a degradação de glicerol, pelo *Lactobacillus collinoides* IOEB 9527, isolado de amostras de sidra deteriorada (CLAISSE e LONVAUD-FUNEL, 2000), indicam um comportamento similar ao descrito por Veiga-Cunha e Foster (1992a). Ainda, de acordo com Claisse e Lonvaud-Funel (2000), sob condições de anaerobiose, somente é possível fermentar o glicerol na presença de outros açúcares. Os produtos obtidos na cofermentação de glicerol e glicose ou de glicerol e frutose foram lactato, acetato, etanol e 1,3 propanodiol. Após 48 h de fermentação, o meio que continha glicose, e 96 h para o meio que continha frutose, foi observado o decréscimo na quantidade de lactato formada com o simultâneo aumento das concentrações de acetato, etanol e 1,3-propanodiol.

Sauvageot et al. (2000) isolaram o *Lactobacillus collinoides* LMG 18850 de amostras de sidra e cultivaram o mesmo em meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) suplementado com 54 mM de glicerol e quantidades variáveis de glicose. Os autores observaram que o *Lactobacillus collinoides* foi incapaz de crescer no meio cuja única fonte de carbono fosse o glicerol, fato que também fora observado por Claisse e Lonvaud-Funel (2000). Os resultados dos ensaios de cofermentação indicaram que a degradação da glicose

e do glicerol acontece simultaneamente e o produto da fermentação foi somente 1,3-propanodiol. Com o esgotamento da glicose a geração do fator NADH cessa, a reação catalisada pela enzima 1,3-propanodiol-desidrogenase paralisa e acontece o acúmulo de 3-HPA (SAUVAGEOT et al., 2000).

Lüthi-Peng et al. (2002a) estudaram a produção de 3-HPA pelo *L. reuteri* ATCC 53608 em água, leite e MRS modificado complementados com diferentes concentrações de glicerol. Os autores concluem que as enzimas do caminho metabólico ligado à glicerol-desidratase são enzimas constitutivas deste microrganismo, contudo a adição de até 60 mM de glicerol estimula sua síntese. Também foi observado que o aumento da salinidade, a adição de glicose e a disponibilidade de amino ácidos livres diminuem o acúmulo de 3-HPA, estimulando o metabolismo do glicerol.

Lüthi-Peng et al. (2002b) avaliaram os efeitos da cofermentação de glicose e lactato na bioconversão de glicerol pelo *L. reuteri* ATCC 53608. Razões glicose/glicerol maiores que 0,33 favoreceram a produção de 1,3-propanodiol e diminuíram o acúmulo de 3-HPA. A adição de lactato forneceu um mecanismo de regeneração de NADH que contribuiu na transformação de 3-HPA em 1,3-propanodiol, fato que corroborou os resultados enunciados por Claisse e Lonvaud-Funel (2000). Dois fatores determinaram a velocidade desta reação: a atividade das enzimas glicerol-desidratase e 1,3-propanodiol-desidrogenase e a razão dos nucleotídeos  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Os dados indicaram que nos meios que empregaram apenas glicerol como fonte de carbono, o aumento da concentração deste substrato levou ao crescimento da razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e ao acúmulo de 3-HPA. Por outro lado, para os meios de cofermentação glicose/glicerol o aumento da concentração de glicose para uma determinada concentração de glicerol conduziu à diminuição da razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e aumentou a produção de 1,3-propanodiol (LÜTHI-PENG et al., 2002b).

Sauvageot et al. (2002a e 2002b) purificaram e caracterizaram os componentes da enzima diol-desidratase do *Lactobacillus collinoides* LMG 18850, esta enzima é capaz de transformar glicerol ( $K_m$  igual 9,4 mM) em 3-HPA, pois se trata de uma isoenzima da GDHt (TORAYA et al., 1976; TORAYA e FUKUI, 1977; TORAYA et al., 1978; TORAYA et al., 1980). De acordo com os dados obtidos por Sauvageot et al. (2002) a enzima diol-desidratase é formada por um heterotrímero codificado pelo *pdu* operon.

Nakanishi et al. (2002) registraram que o *L. coryniformis* 394 fermentou glicerol produzindo 3-HPA, sendo que a adição de  $\text{CaCO}_3$  ao meio levou ao aumento da produção do 3-HPA. Os pesquisadores ainda testaram e comprovaram o poder antimicótico e antibacteriano deste produto sobre várias bactérias e fungos. Magnusson (2003) descobriu

que o *Lactobacillus coryniformis* Si3 apresentou um *pdu* operon com conteúdo genético similar ao operon do *L. collinoides*.

Vizoso Pinto et al. (2004) isolaram a bactéria *Pediococcus pentosaceus* CAg a partir de amostras de cerveja. Foi utilizado um meio de cultura microaeróbio do tipo complexo (MRS modificado), sendo empregadas como fontes de carbono: glicerol, glicose e uma mistura destas na proporção molar 7,7:1 (glicerol:glicose). Os resultados indicaram que a degradação do glicerol envolveu a associação de dois caminhos metabólicos: glicerol-desidratase e glicerol-quinase.

Ainda, segundo Vizoso Pinto et al. (2004), quando foi utilizado o glicerol como única fonte de carbono as enzimas do caminho metabólico formado pela glicerol-desidratase e a 1,3-propanodiol-desidrogenase se mostraram mais ativas no início do que no final do processo fermentativo. Enquanto, as enzimas do caminho formado pela glicerol-quinase e a glicerol-3-fosfato-desidrogenase apresentaram atividades inversas ao conjunto anterior. Outra observação importante deste trabalho indicou que as enzimas glicerol-desidratase e 1,3-propanodiol-desidrogenase são enzimas constitutivas, resultado este que coincide com as proposições de Lüthi-Peng et al. (2002a).

Os dados também indicaram que parte do lactato formado inicialmente é posteriormente degradado para a obtenção de mais ATP, via piruvato-acetato. Por outro lado, no caso da cofermentação glicerol:glicose, o consumo da glicose aconteceu nas primeiras horas da fase de crescimento, não houve degradação do lactato, a degradação do glicerol atuou como processo de recepção de elétrons e a enzima glicerol-quinase somente se tornou ativa no final do processo fermentativo com a finalidade de fornecer uma alternativa para a geração de ATP e regeneração do  $\text{NAD}^+$  em função do esgotamento da glicose (VIZOSO PINTO et al, 2004).

A otimização da produção de 3-HPA, pelo *L. reuteri* ATCC 53608, por meio de um sistema de dois estágios, similar ao utilizado por Talarico et al. (1988), foi proposta por Doleyres et al. (2005). Neste sistema, para uma concentração inicial de 400 mM de glicerol na etapa de cofermentação, tempo de incubação de 45 min e temperatura de 30 °C, a produção de 3-HPA foi igual a 235 mM. Em outra fase experimental o estágio relativo à produção de 3-HPA foi modificado para a reutilização da biomassa em vários ciclos, nestes ensaios a concentração de glicerol utilizada foi de 200 mM por batelada, com tempo de incubação igual a 1 h e temperatura 15 °C. Deste modo, foram obtidos 147 mM e 128 mM de 3-HPA para o primeiro e segundo ciclo, respectivamente.

Os resultados obtidos por Doleyres et al. (2005) indicaram que a temperatura não afeta significativamente a produção de 3-HPA para a faixa entre 15 e 37 °C. Entretanto, o aumento da concentração inicial de glicerol até 400 mM e de biomassa até  $1,6 \times 10^{10}$  UFC contribuem com o acúmulo de 3-HPA.

Tobajas et al. (2009) investigaram a cofermentação de glicose e glicerol pelo *L. reuteri* PRO 137 em sistema batelada. A concentração de glicose foi fixada em 111 mM e a concentração de glicerol variou entre 100 e 400 mM. Os resultados mostraram que o crescimento bacteriano foi derivado da degradação da glicose, enquanto o glicerol atuou como receptor alternativo de hidrogênio. A variação da concentração do glicerol entre 100 mM e 400 mM levou à diminuição na produção de etanol e lactato em 33,1% e 39,1% respectivamente, enquanto a produção de acetato aumentou 63,82%. Os ensaios também indicaram que, em concentrações menores do que 350 mM de glicerol, a concentração residual deste substrato foi próxima de zero para um tempo de fermentação inferior a 10 h, enquanto para concentrações iguais ou maiores de 350 mM, o glicerol residual ficou acima de 40%. A quantidade máxima de reuterina foi atingida na fase logarítmica de crescimento (6h) e diminuiu à medida que a fermentação progride.

Garai-Ibabe et al. (2008) isolaram diversos lactobacilos de amostras de sidra deterioradas. Todas as cepas foram testadas em relação à capacidade de degradar glicerol em meio Carr modificado (contendo 0,5% de glicose e 0,5% de frutose), conforme descrito por Claisse e Lonvaud-Funel (2000). As cepas *L. collinoides* 7, 15 e 20 foram capazes de degradar 100 % de glicerol produzindo 1,3-propanodiol e ácido 3-hidroxipropiônico, enquanto a cepa *L. collinoides* 17 acumulou a maior quantidade de 3-HPA e degradou 87,3 % de glicerol. Esta última cepa foi utilizada nos ensaios subsequentes para avaliar o efeito do pH e da adição de frutose (concentrações variáveis entre 0 - 55,5 mM) no metabolismo do glicerol (concentração fixa em 55,5mM):

- a) a adição de frutose em qualquer proporção estimulou a degradação completa do glicerol e melhorou o crescimento do microrganismo na faixa de 5,55 – 22,2 mM;
- b) o consumo de glicerol e frutose ocorreu simultaneamente, contudo a fermentação do glicerol foi mais acentuada entre 18 e 27 h;
- c) para pHs muito baixos (3,6 e 3,3) diminuiu a produção de ácido 3-hidroxipropiônico e aumentou o acúmulo de 3-HPA;

- d) a bactéria somente cresceu na presença da frutose, sendo incapaz de utilizar glicerol como única fonte de carbono, ou seja, inexistiram as enzimas relativas ao caminho metabólico oxidativo;
- e) para baixas concentrações de frutose (5,55 mM) foram produzidas quantidades equimolares de 1,3-propanodiol e ácido 3-hidroxi-propiônico, enquanto, para concentrações maiores de frutose o 1,3 propanodiol se tornou o principal produto;
- f) o consumo de parte do lactato formado na fase inicial da fermentação, para concentrações inferiores a 33,3 mM de frutose, permitiu gerar ATP para a sustentação do crescimento bacteriano e regeneração do NADH necessário para evitar o acúmulo crítico de 3-HPA.

No trabalho de Garai-Ibabe et al. (2008) diferente do que foi observado por Sauvageot et al. (2000) o acúmulo de 3-HPA aconteceu quando ainda havia frutose presente no meio fermentativo. Os dados indicaram que a degradação da frutose para manitol atuou como principal mecanismo de reoxidação do NADH aumentando a razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Isto corroborou a relação da razão dos nucleotídeos com o acúmulo de 3-HPA enunciada por Lüthi-Peng et al. (2002b).

Morita et al. (2008) determinaram o sequenciamento e executaram uma análise comparativa do genoma do *L. reuteri* JCM 1112<sup>T</sup> e do *L. fermentum* IFO 3956 com os genomas de outros lactobacilos. Inicialmente, identificaram a ausência do gene *pfk* que codifica a enzima fosfofruto-quinase para ambos os microrganismos e do gene *fba* que codifica a enzima frutose-bifosfato-aldolase no *L. fermentum*, isto parece mostrar que o metabolismo da glicose acontece pela via pentose fosfato. De fato, diversas espécies de lactobacilos heterofermentativos obrigatórios degradam hexoses por meio deste caminho metabólico (KÖNIG e FRÖHLICH, 2009; MAKAROVA et al., 2006).

De acordo, com Morita et al. (2008) outro gene ausente no genoma do *L. reuteri* JCM 1112<sup>T</sup> refere-se à enzima DHA-quinase. A análise dos resultados indicou a presença dos genes relativos às enzimas glicerol-quinase, glicerol-desidratase e 1,3-propanodiol-desidrogenase. Uma singularidade especial, no caso do *L. reuteri*, decorre da presença dos genes relacionados com a biossíntese da cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>), pois estes genes não foram identificados em outras espécies de lactobacilos. Contudo, Martín et al. (2005) identificaram a produção de cobalamina e reuterina em ensaios de fermentação de glicerol pelo *L. coryniformis* fato que indicou a provável presença destes genes na espécie citada.

Análises complementares com técnicas de clonagem, marcadores  $C^{13}$ , ensaios de fermentação e análise de ressonância magnética nuclear bidimensional (2D-NMR) confirmaram a atividade das enzimas glicerol-desidratase e 1,3-propanodiol-desidrogenase no caso do *Lactobacillus reuteri* JCM 1112<sup>T</sup>. Os ensaios de fermentação indicaram que este lactobacilo não produziu lactato ou acetato contendo  $C^{13}$  e também não cresceu em meio contendo glicerol como única fonte de carbono. Isto pode ser explicado pela ausência dos genes relativos à enzima DHA-quinase no genoma deste microrganismo (MORITA et al., 2008).

Um estudo sobre o desempenho do *Lactobacillus hilgardii* X<sub>1</sub>B na degradação de glicerol demonstrou que este microrganismo é incapaz de degradar este substrato sem a presença de outros açúcares. Nos ensaios experimentais de cofermentação, sob condições de anaerobiose (96 h) e microaerobiose (48 h), a concentração de glicerol foi fixada em 43,2 mM, enquanto foram utilizados como cosubstratos glicose ou frutose (5,5 mM). Isto representa uma razão molar glicose:glicerol aproximadamente de 1:8. Em todos os casos o glicerol residual esteve acima de 75% (PASTERIS e STRASSER de SAAD, 2009).

Os dados indicaram que as enzimas relativas aos caminhos metabólicos da GK e GDHt estiveram ativas tanto sob condições anaeróbias quanto microaeróbias, não sendo identificada a presença das enzimas relativas ao caminho GDH. A disponibilidade de oxigênio, sob condições de microaerobiose, induziram a uma melhor expressão das enzimas PDOR, GK e G3PDH, enquanto a expressão da enzima GDHt se mostrou independente da concentração de oxigênio no meio (PASTERIS e STRASSER de SAAD, 2009).

Ainda, de acordo com Pasteris e Strasser de Saad (2009), os produtos da cofermentação de glicerol e glicose (ou frutose) foram D e L-lactato, acetato, etanol, dióxido de carbono, 3-HPA e 1,3-propanodiol. Entretanto, o último componente foi produzido somente sob condições de microaerobiose. Neste caso também houve o aumento na produção de lactato e acetato sem alteração significativa na produção de etanol.

Bauer et al. (2010) avaliaram a influência do pH, concentração de biomassa e de glicerol na produção de 3-HPA pelo *L. reuteri* DSMZ 20016. A viabilidade celular não foi afetada significativamente ( $p < 0,025$ ) para concentrações de 3-HPA menores do que 35 mM para tempos de exposição inferiores a 2 h. Para uma concentração de substrato fixada em 300 mM o pH ótimo foi 6,0. Por outro lado, os resultados mostraram que a concentração máxima de 3-HPA cresceu com o aumento da concentração inicial de



biomassa até  $OD_{600} = 50$  (aproximadamente  $5 \times 10^9$  UFC/mL). O mesmo tipo de relação se verificou quando a concentração inicial de substrato variou entre 100 e 300 mM.

Ainda, de acordo com os resultados de Bauer et al. (2010), para uma concentração inicial de biomassa  $OD_{600} = 70$  (ca.  $7 \times 10^9$  UFC/mL) foi observado um pico de produção de 3-HPA após 50 min de fermentação, seguido de uma abrupta e significativa queda na concentração deste componente no meio extracelular. Isto poderia indicar que o 3-HPA funciona como elemento regulatório de seu próprio metabolismo por um mecanismo denominado *Quorum Sensing* que permite que muitas bactérias coordenem as transcrições de múltiplos genes em função da densidade e variedade populacional do microambiente (ZAMUDIO-JARAMILLO et al., 2009; TANNOCK, et al., 2005). Para Bauer et al. (2010), o desaparecimento do 3-HPA poderia estar relacionado à sua redução enzimática para 1,3-propanodiol ou sua oxidação para ácido 3-hidroxi-propiônico. Contudo, não foram recolhidos dados sobre os prováveis produtos 1,3-propanodiol e ácido 3-hidroxi-propiônico, nem sobre a atividade das enzimas ligadas a essas transformações que permitam interligar o 3-HPA com o sistema de “*Quorum Sensing*” desta bactéria.

Pasteris e Strasser de Saad (2005) estudaram a degradação aeróbia de glicerol pela lactobactéria *Pediococcus pentosaceus* N<sub>5</sub>p, isolada de amostras de vinho. Para as condições experimentais utilizadas, houve estímulo das enzimas NAD-independentes lactato-desidrogenases, fato que contribuiu para a geração de mais piruvato pela degradação de parte do lactato formado inicialmente. Assim, sob condições aeróbias o piruvato “extra” foi transformado em acetilCoA e este por sua vez em acetato, visto que as enzimas responsáveis pela produção de etanol foram desestimuladas pela predominância das enzimas NADH-oxidases. Fenômeno similar fora registrado por Murphy e Condon (1984) e Murphy et al. (1985) no processo de degradação aeróbia de glicose pelo *Lactobacillus plantarum*.

Claisse e Louvand-Funel (2000), no estudo sobre a cofermentação de glicerol e glicose pelos *L. brevis* e *L. buchneri*, avaliaram o acoplamento do metabolismo do lactato com o glicerol. Neste trabalho foi constatado que a conversão de lactato para acetato envolveu apenas uma reação de recuperação de NADH e que as enzimas NAD-independentes lactato-desidrogenases se tornam ativas no meio apenas com o início do consumo de lactato, isto explicaria a recuperação de apenas um mol de NADH por mol de lactato consumido.

Estes fatos são importantes na tentativa de entender como e por que o lactato formado durante a primeira fase de crescimento é consumido posteriormente nos processos

de cofermentação de glicerol e glicose como foi registrado por Veiga da Cunha e Foster (1992a), Claisse e Louvand-Funel (2000) e Vizoso Pinto et al. (2004).

Entretanto, antes é importante observar que o aumento da expressão dos genes relativos à enzima PDOR acontece sob condições microaeróbias (PASTERIS e STRASSER DE SAAD, 2009) e a degradação do glicerol funciona como o mecanismo preferencial na recepção de elétrons nos processos de cofermentação de glicerol e glicose (TALARICO et al., 1988; TALARICO e DOBROGOSZ, 1989; TALARICO et al., 1990). Sob essas condições a expressão das enzimas ligadas à produção de etanol são parcialmente inibidas.

Por outro lado, o início da degradação de lactato acontece após o esgotamento da glicose, sob condições microaeróbias, e quando o meio atinge pH próximo a 5,5 (VIEGA da CUNHA e FOSTER, 1992a; CLAISSE e LOUVAND-FUNEL, 2000; VIZOSO PINTO et al., 2004).

Somando isto ao fato de que o acúmulo de 3-HPA pode tornar-se um elemento de inibição ao crescimento e à própria sobrevivência das bactérias presume-se que a combinação dos fatores citados, como: condições de microaerobiose, esgotamento do açúcar, pH e estado reduzido do glicerol (receptor preferencial de elétrons) contribuem ao estímulo de degradação do lactato como mecanismo compensatório para o equilíbrio da razão de nucleotídeos  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , exigida pelo microambiente existente após o esgotamento da glicose nos processos de cofermentação.

Aparentemente, os caminhos degradativos do glicerol nos *Lactobacilos* são variáveis (ver Tabela 1). De acordo com a espécie, o metabolismo do glicerol depende da presença ou ausência de genes que codificam determinadas enzimas e das condições para sua expressão (PASTERIS e STRASSER de SAAD, 2009). Como se pode observar, a grande maioria dos *Lactobacillus* citados na Tabela 1 pertence ao grupo heterofermentativo obrigatório e se caracteriza pela incapacidade de utilizar o glicerol como fonte única de carbono e energia.

Outro fato importante se refere ao acúmulo de 3-HPA que acontece em função das condições experimentais e não da inexistência da enzima 1,3-propanodiol-dehidrogenase (PDOR) no genoma dos *Lactobacillus*. Por exemplo, Bauer et al. (2010) detectaram o acúmulo de pequenas quantidades de 3-HPA durante ensaios de degradação de glicerol pelos *L. brevis* e *L. pentosus*, sendo este o primeiro registro sobre a produção extracelular de 3-HPA por estas espécies. O trabalho de Claisse e Louvand-Funel (2000) indicou que o *L. collinoides* não permitiu o acúmulo de reuterina no meio de cultura, enquanto,

Sauvageot et al. (2000) demonstraram, sob condições experimentais específicas, que o *L. collinoides* é capaz de acumular 3-HPA.

Tabela 1 - Características metabólicas relativas à degradação de glicerol por lactobacilos (LAB). (1) Os LAB pertencem ao grupo II são homofermentativos e os do grupo III heterofermentativos obrigatórios segundo classificação de Vandamme et al. (1996). (2) Os LAB indicados com sinal (–) somente conseguem degradar o glicerol em processos de cofermentação com algum açúcar, por exemplo, glicose ou frutose. (3) As informações relativas à capacidade de fermentação de glicerol, presença de enzimas e acúmulo de 3-HPA foram retiradas das referências listadas na última coluna da tabela. (4) O sinal (++) indica que a presença dos genes relativos à enzima foram confirmados na base de dados UniProtKB (2010).

<i>Lactobacillaceae</i>	Padrão Fermentativo <sup>(1)</sup>	Fermentação de glicerol <sup>(2)</sup>	GDHt ou Diol desidratase <sup>(3)</sup>	1,3-propanodiol desidrogenase <sup>(3)</sup>	Acúmulo de 3-HPA	Referências
<i>L. brevis</i>	III	-	++	++	-	14, 24, 139
<i>L. buchneri</i>	III	-	+	++	-	132, 171, 172
<i>L. reuteri</i>	III	-	++	++	+	102, 153, 154, 156
<i>L. collinoides</i>	III	-	++	+	+	30, 52, 133, 134, 135
<i>L. hilgardii</i>	III	-	++	++	+	118
<i>L. coryniformis</i>	II	-	+	nd	+	91, 102, 105
<i>P. pentosaceus</i>	II	+	+	++	-	117, 131, 173

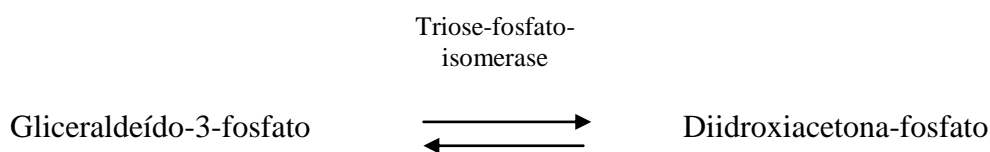
### 3.5.9 Pontos chaves das rotas de degradação do glicerol

A glicólise, também chamada via de Embden–Meyerhof-Parnas, é a via central do catabolismo da glicose e envolve uma sequência de 10 reações enzimáticas, onde cada molécula de glicose é convertida em duas moléculas de piruvato. Neste processo a energia livre liberada pela degradação da glicose é conservada na forma de ATP e NADH (NELSON e COX, 2002).

Em relação à fermentação da glicose, como única fonte de carbono, alguns pontos devem ser destacados (NELSON e COX, 2002):

- as enzimas regulatórias do processo são a hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato quinase. As reações catalisadas por essas enzimas são altamente espontâneas e podem ser “ligadas” ou “desligadas” por ativadores/efetores alostéricos;
- o acetilCoA, que acumula quando existe ATP em quantidade suficiente, inibe a enzima piruvato quinase;
- o acúmulo de frutose-1,6-difosfato ativa a enzima piruvato-quinase, promovendo um mecanismo de controle (ativador alostérico).

Ainda, é importante lembrar que a enzima *triose-fosfato-isomerase*, envolvida na quinta e última reação da fase preparatória da glicólise, catalisa uma interconversão, por isomerização, do gliceraldeído-3-fosfato e da diidroxiacetona-fosfato (DHAP) de forma reversível:



Contudo, esta reação dirige a conversão da diidroxiacetona-fosfato para o gliceraldeído-3-fosfato, sendo este último consumido pela reação subsequente da glicólise. É neste ponto que ocorre a conexão com o braço oxidativo da degradação anaeróbia do glicerol. Um exemplo dessa conexão entre as rotas de degradação anaeróbia de glicose e glicerol, pela bactéria *Klebsiella oxytoca*, está representada na Figura 5.

Em relação à degradação anaeróbia do glicerol, pela bactéria *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824), cabe ressaltar que Girbal e Soucaille (1994) demonstraram que a enzima GA3PDH sofre forte inibição com o aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup>. Esse estrangulamento no fluxo metabólico também foi observado na fermentação de glicerol pelas bactérias *Clostridium butyricum* VPI 3266 e *Clostridium acetobutylicum* DG1 (González-Pajuelo et al., 2006).

Fenômeno similar foi registrado por Garrigues et al., (1997) durante o estudo do mecanismo de controle e desvio entre as fermentações homoláctica e heteroláctica, para a bactéria *Lactococcus lactis*, sob condições de excesso de substrato (glicose). Neste caso, os pesquisadores constataram que altas velocidades de consumo do substrato levaram ao

aumento da razão  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  e isto provocou a inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase conduzindo à fermentação homoláctica.

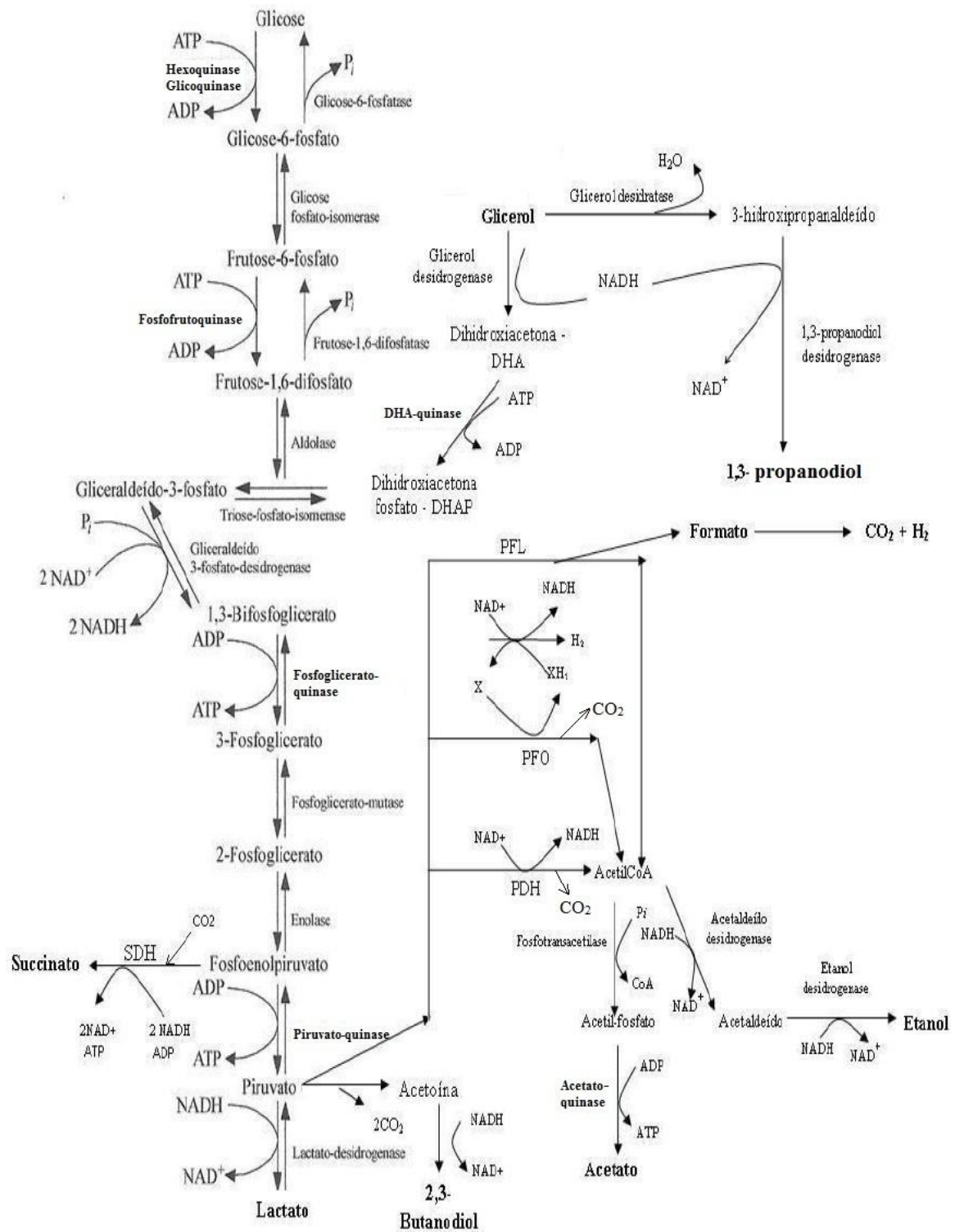


Figura 5 - Estrutura das rotas metabólicas de degradação fermentativa da glicose e do glicerol pela *K. oxytoca*. Adaptado de Galdeano et al. (2008) e Zhang et al. (2009).

O grupo do Dr. Cocaign-Bousquet confirmou o papel desta enzima, no fluxo metabólico, ao realizar ensaios com baixas concentrações de substrato, condições sob as quais predominaria a fermentação heteroláctica, na presença de iodoacetato (IAA). Visto que, o IAA atua como um forte inibidor da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, a expectativa era que o aumento de sua concentração no meio fermentativo, levaria ao aumento da concentração de lactato. De fato, os dados indicam claramente que a atividade *in vivo* da GA3PDH é limitada por altas taxas de NADH/NAD<sup>+</sup>, o que provocaria o acúmulo de triose fosfatos no nível superior do fluxo metabólico (EVEN et al., 1999).

Por outro lado, o acúmulo de gliceraldeído-3-fosfato, dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e frutose-1,6-difosfato resulta na inibição da atividade da enzima PFL e ativação da lactato-desidrogenase (EVEN et al., 1999).

As informações listadas explicariam as observações, sobre o metabolismo de degradação do glicerol, pela bactéria de *Klebsiella pneumoniae*, feitas por diversos pesquisadores:

- a) a atividade da enzima piruvato:formato-liase diminui quando há excesso de substrato (MENZEL et al., 1997). Isto seria consequência do acúmulo de triose fosfatos, neste caso gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (DHAP);
- b) a atividade da enzima PK diminui, para altas taxas de crescimento e concentração de substrato (MENZEL et al., 1998). Com o estrangulamento do fluxo pela inibição da enzima GA3PDH haveria uma disponibilidade limitada de fosfoenolpiruvato (PEP) que é o substrato da enzima PK, isto justificaria a diminuição de sua atividade;
- c) as diferenças entre atividades *in vitro* e *in vivo* das enzimas PFL e PDH são elevadas, maior do que 7 para a PDH e acima 20 para a PFL (MENZEL et al., 1998). Isto se deve a baixa concentração de piruvato presente no meio de cultura, como consequência da baixa atividade específica da PK e da limitação de fluxo entre os intermediários PEP e piruvato, conforme descrito no item (b).

O estrangulamento da passagem GA3PDH se contrapõe à hipótese de Abbad-Andaloussi et al. (1998), segundo a qual, para fermentações de misturas de glicose e glicerol, pela bactéria *Clostridium butyricum*, a enzima GDH, em função de sua menor afinidade pelo seu substrato e pelo cofator NAD<sup>+</sup>, controlaria o fluxo de material nesta rota

de degradação do glicerol. Como o acúmulo de triose, inclusive DHAP, acontece sob a inibição da enzima GA3PDH, e a reação de conversão de DHA para DHAP é reversível, o fluxo do braço oxidativo poderá ser freado ou bloqueado provocando um acúmulo de DHA. Isto levaria à posterior inibição da enzima GDH causando a impressão errônea de que é ela a responsável pelo controle do fluxo metabólico.

Na fermentação de glicerol pela bactéria *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210, foi registrado um aumento significativo do fluxo metabólico na direção do 1,3 propanodiol, quando o catabolismo do braço oxidativo se tornou limitado em função da inibição da enzima GA3PDH. Isto levou ao desacoplamento dos processos de síntese e consumo dos equivalentes reduzidos, provocando um aumento abrupto na razão  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  e o consequente acúmulo de 3-hidroxiopropanaldeído, cessando o crescimento microbiano e a produção de 1,3 propanodiol (BARBIRATO et al., 1998).

Em síntese, pode-se concluir que os pontos chaves da degradação fermentativa do glicerol são os seguintes:

- i) os mecanismos ligados à regeneração dos equivalentes reduzidos;
- ii) a composição do meio de cultura;
- iii) a inibição ou ativação da GA3PDH;
- iv) o sistema enzimático central (degradação do piruvato).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Generalidades

A técnica de seleção de cepas tem como referência a estratégia apresentada por Steele e Stowers (1991). Esta metodologia é composta pelos seguintes estágios:

- a) definição do tipo de atividade enzimática desejada;
- b) identificação de microrganismos conhecidos que apresentem a atividade desejada;
- c) desenvolvimento dos parâmetros de enriquecimento e dos ensaios de seleção;
- d) identificação e seleção das fontes de microrganismos;
- e) desenvolvimento da técnica de “screening” (seleção).

Para determinar o tipo de atividade enzimática desejada foi realizada a análise dos trabalhos desenvolvidos na área de degradação microbiana de glicerol, como publicado nos periódicos científicos e técnicos especializados.

Identificado o conjunto de enzimas envolvidas no processo de degradação de glicerol foi feito um cruzamento de dados e informações sobre as mesmas. Para isto foram utilizados os dados contidos nos artigos científicos e nos bancos de genoma/enzimas disponibilizados on-line, tais como: BRENDA, Universal Protein Resource (UniProt), Expert Protein Analysis System (Espasy), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), entre outros.

O processo para a obtenção dos parâmetros de enriquecimento foi realizado por meio de uma análise teórica, com base nas referências bibliográficas, dos dados existentes sobre a fisiologia dos microrganismos e as características bioquímicas das enzimas, envolvidas no processo de assimilação de glicerol, obtidas nos bancos de dados citados.

Para a pesquisa em fontes bibliográficas diversas foram utilizados os sistemas de busca e gerenciamento: Elsevier Books ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)), Scirus ([www.scirus.com](http://www.scirus.com)), além de algumas das ferramentas de pesquisa disponíveis no portal de periódicos da CAPES. Cada banco de dados utiliza diversas ferramentas de gerenciamento de dados e padrões de busca, contudo, de modo geral, foi estruturada e utilizada uma rotina de busca padrão (Figura 6) adaptada aos instrumentos de pesquisa de cada banco de dados.

Bactérias do gênero *Klebsiella*, o mais estudado nos processos de degradação de glicerol, são amplamente distribuídas na natureza e tem como habitat natural: águas superficiais, solo, esgotos, vegetação, entre outros. (KRIEG, 1984). Assim, amostras de



terra foram escolhidas como fonte para o isolamento de bactérias com potencial de fermentação de glicerol.

A técnica de seleção ou “screening” baseada nas informações estruturadas nos itens (a), (b), (c) e (d) será descrita em seguida na seção 4.2 deste capítulo.

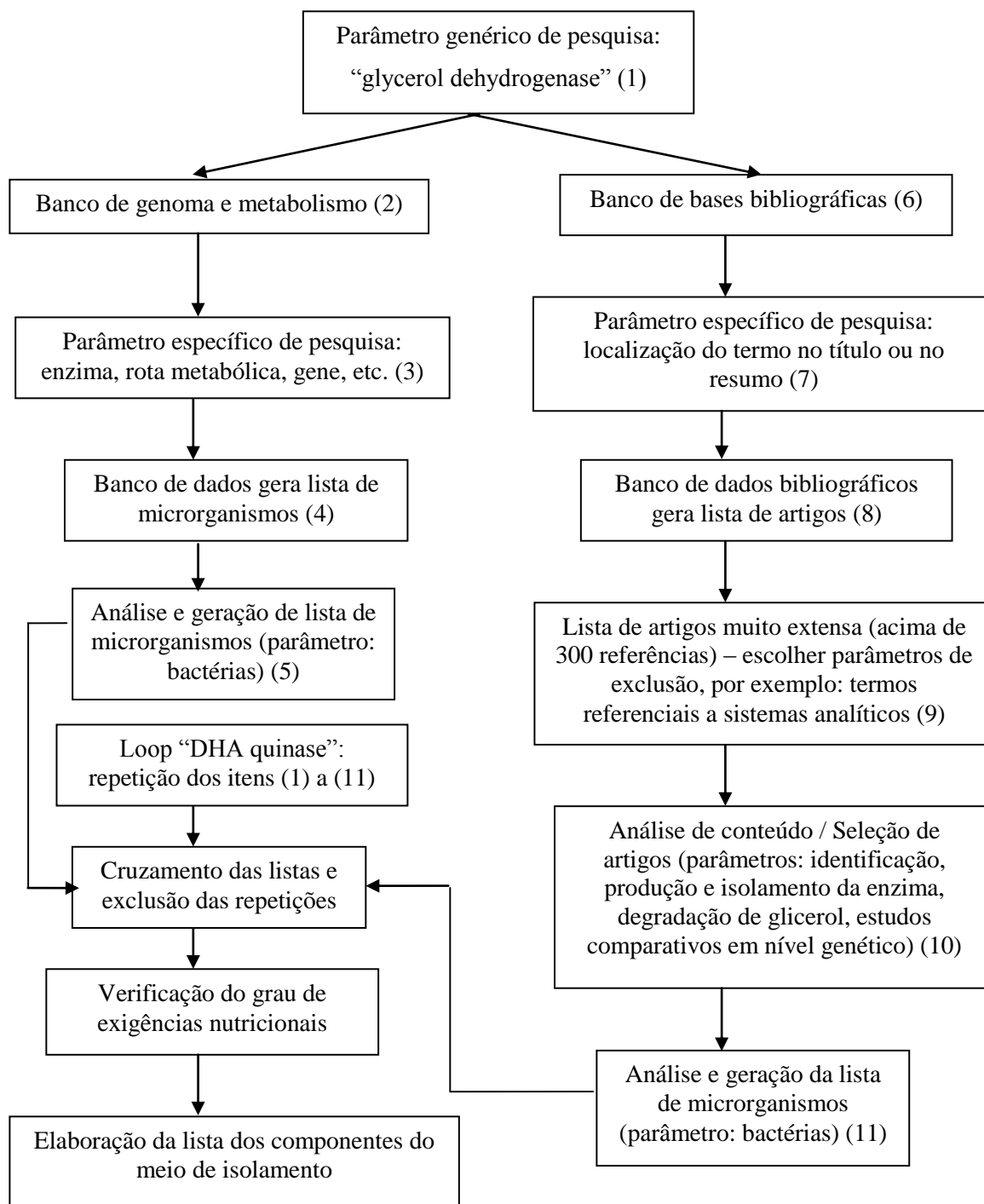


Figura 6 – Estrutura de pesquisa e seleção adotada para execução das rotinas (b) e (c) relativas à metodologia de Steele e Stowers (1991)

## 4.2 Isolamento e identificação de uma cepa selvagem com potencial fermentativo na utilização de glicerol como substrato

### 4.2.1 Meios de cultura para isolamento

A composição dos meios de cultura utilizados no isolamento da bactéria selvagem em g/L: 0,650  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,200  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4,650  $\text{KCl}$ , 0,200  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0,600 L-cisteína, 19,000 trizma-HCl (120 mM), além disso foram adicionados 4 mL de solução mineral. A composição da solução mineral em g/L: 2,085  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10,000 ácido cítrico monohidratado, 0,735  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,422  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,363  $\text{ZnCl}_2$ , 0,242  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,044  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e 1,190  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

Outros dados sobre a composição dos meios de cultura de isolamento são apresentados na Tabela 2. Pela combinação dos diversos tipos e dos níveis das variáveis foram elaborados 16 meios de isolamento diferentes. O pH dos meios foi ajustado para 7,4 empregado soluções 0,5 M de NaOH e HCl. Os meios foram esterilizados a 121 °C por 12 min e depois de frios adicionou-se, sob condições assépticas, 4 mL de solução de vitaminas previamente esterilizada por filtração (0,22  $\mu\text{m}$ ). A composição da solução de vitaminas em (mg/L): 100 piridoxal-HCl, 50 riboflavina, 100 tiamina-HCl, e 20 biotina. O tempo de esterilização foi definido como 12 min para evitar a caramelização do glicerol ou a decomposição do meio.

Tabela 2 – Elementos variáveis da composição dos meios de isolamento (GLY = glicerol)

Componentes Variáveis				
Nível	Fonte de Nitrogênio (g/L)	[Tryptona] (g/L)	[GLY] (g/L)	[NaCl] (g/L)
(+)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,00) + $\text{NH}_4\text{Cl}$ (1,90)	4,00	75,60	6,00
(-)	Ureia (1,50)	2,00	12,60	1,00

### 4.2.2 Metodologias para isolamento e identificação da cepa selvagem

Amostras de solo ( $\approx 50$  g), coletadas no entorno do bloco D-90 (DEQ/UEM) à temperatura ambiente e pH natural do solo, foram misturadas, homogeneizadas e adicionadas a 500 mL de água estéril. Após um período de decantação de 1 h, se procedeu

à filtração em papel qualitativo. O filtrado foi utilizado como inóculo das 16 combinações de meio de isolamento. O volume utilizado, para cada meio, foi aproximadamente de 150 mL acomodados em erlenmeyers de 500 mL tampados com tampões de algodão e cápsulas de papel kraft, enquanto o volume de inóculo foi de 30 mL. O tempo de cultivo foi de 24 h na temperatura de 37 °C.

Foram retiradas alíquotas dos meios que apresentaram maior crescimento microbiano (turbidez) e semeadas em placas de Agar Nutriente utilizando a técnica de estrias e de micro gotas, porém sem diluição. As placas foram cultivadas por 24 h a 37 °C, após este período foram retiradas amostras destas placas, procurando colher colônias caracteristicamente uniformes e predominantes.

As amostras foram diluídas em solução salina até concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (escala McFarland nº 0,5) e utilizadas como inóculo novamente, para as diversas combinações de meio utilizadas na fase inicial de isolamento. Contudo, nesta etapa o volume de cada meio foi 30 mL, enquanto o volume de inóculo foi 1,5 mL. Além disso, foi utilizada uma camada de óleo mineral como barreira ao oxigênio e o meio de cultura foi engarrafado e lacrado em frascos de penicilina (50 mL) com septo de borracha e anel de alumínio.

O procedimento de semeadura em placas seguido do cultivo sob condições anaeróbias foi repetido até o isolamento e obtenção de uma cultura pura. O esquema de isolamento está representado na Figura 7. As colônias formadas em cada bateria de reisolamento foram avaliadas em termos das características morfológicas e coloração de Gram.

Após completar o isolamento, foram realizados cinco testes bioquímicos de identificação: prova do triplo açúcar-ferro (TSI), caldo nitrato, prova de ureia (Christensen), prova de oxidase e mobilidade. Estes testes permitiram a identificação do gênero ao qual a bactéria isolada pertence.

A partir de amostras isoladas, caracterizadas e testadas como colônias puras foram preparados estoques da bactéria em placas de Agar Nutriente e Eppendorfs com Caldo Nutriente mais 20% de glicerol, sendo estes últimos estocados em freezer (-20 °C).

A identificação da espécie bacteriana foi realizada por meio de testes bioquímicos e ensaios de degradação de diversos substratos executados e avaliados automaticamente nos equipamentos BD Phoenix 100 (Figura 8) e MicroScan 4 (Figura 9). Ambos são equipamentos destinados à identificação rápida de bactérias clinicamente significantes.

Também foram realizados ensaios para determinar o perfil do antibiograma da espécie isolada.

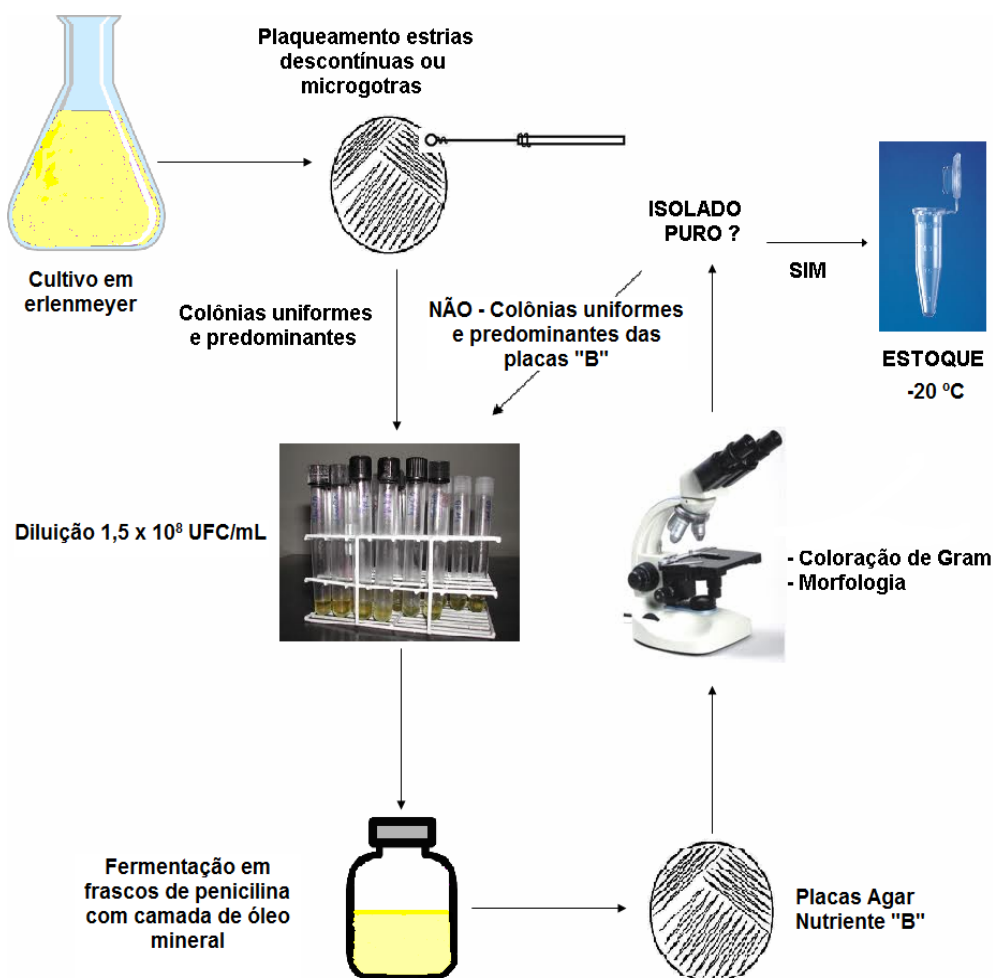


Figura 7 – Esquema de isolamento de microrganismo com potencial para degradação de glicerol sob condições anaeróbias. As condições de cultivo de todos os ensaios foram: 37 °C e 24 h. O volume de cultura (meio + inóculo) utilizado nos erlenmeyers foi 180 mL, enquanto nos frascos de penicilina foi 31,5 mL.

O painel utilizado no Phoenix 100 é composto por cavidades contendo substratos bioquímicos desidratados. Os testes baseiam-se na utilização e degradação de substratos específicos pelas bactérias, detectadas por diversos sistemas indicadores: colorimétricos, cromogênicos e fluométricos. Por exemplo, quando um isolado consegue utilizar um determinado carboidrato, a produção de ácido é detectada por uma alteração no indicador de vermelho fenol, enquanto a hidrólise enzimática de substratos fluorogênicos libera um derivado fluorescente da cumarina.

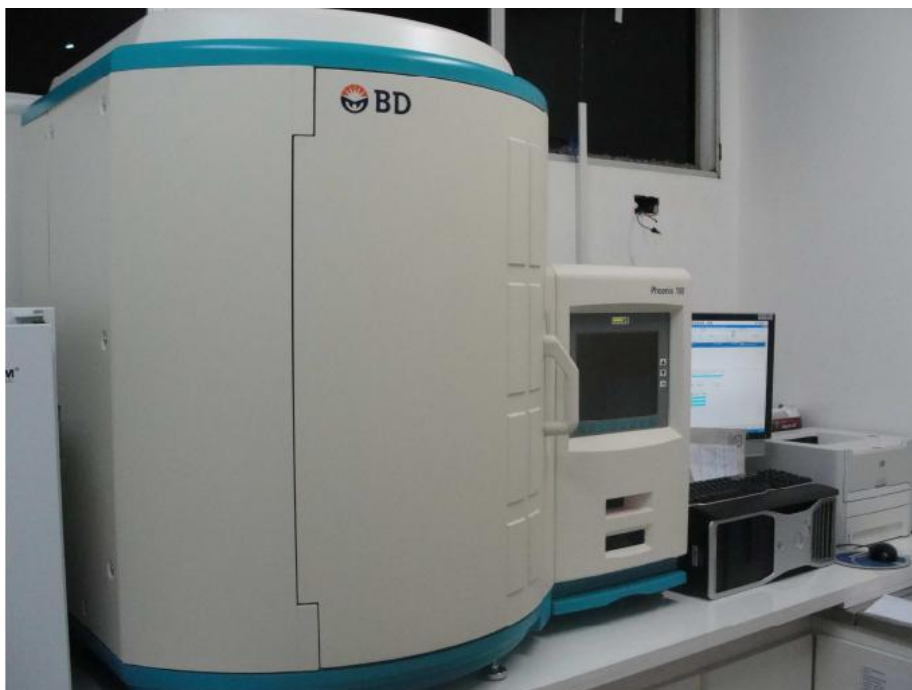


Figura 8 – Equipamento de identificação rápida de cepas bacterianas modelo Phoenix 100 (Becton Dickinson Diagnostics). Hospital Universitário UEM. Foto: Miguel A. A. Rodríguez



Figura 9 – Equipamento de identificação rápida de cepas bacterianas modelo MicroScan 4 (Dade Behring). Hospital Santa Casa de Maringá. Foto: Miguel A. A. Rodríguez

O painel utilizado no MicroScan 4 tem composição similar àquele descrito para o Phoenix 100, porém inclui ensaios de susceptibilidade a antibióticos. Estes sistemas de identificação apresentam um alto grau de confiabilidade e precisão na resposta (SELLENRIEK et al., 2005; O'HARA, 2006; CARROLL et al., 2006; MENOZZI et al., 2006; SNYDER et al., 2008).

#### *4.3. Ensaios experimentais e técnicas de amostragem*

As técnicas aqui detalhadas referem-se aos ensaios experimentais descritos nas seções subsequentes. Qualquer alteração específica ao ensaio foi descrito na seção correspondente.

Os ensaios de fermentação, em duplicata, foram preparados pela adição de 30 mL de meio em frascos de penicilina (cap. 50 mL). Logo a seguir os frascos foram esterilizados e parcialmente esfriados, e adicionados 3 mL de óleo mineral estéril. Os frascos então foram lacrados com septo de borracha e anel de alumínio. O volume de inóculo aplicado em cada frasco foi de 1,5 mL com concentração bacteriana de aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

As amostragens durante o processo de fermentação foram realizadas com seringas e agulhas estéreis. Foram retiradas alíquotas de 1,5 mL dos frascos de fermentação nos tempos (h): 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96. Estes tempos de amostragem foram algumas vezes alterados para atender observações identificadas em ensaios preliminares. Logo após a leitura da densidade ótica (DO), grandeza adimensional que em alguns casos é expressa em unidades de absorvância (au), as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos, a 12000 rpm e 4 °C (JOUAN - Modelo GR 2022), a seguir foram filtradas (porosidade 0,22 µm) e estocadas no congelador para posterior determinação dos metabólitos formados.

#### *4.4 Efeitos do pH, concentração de substrato e fonte de nitrogênio*

A composição básica do meio de cultura utilizado nesta etapa foi a seguinte (g/L): 0,650  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,200  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4,300  $\text{KCl}$ , 0,200  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 4,000  $\text{NaCl}$ , 0,600 tioglicolato de sódio. Além disso, foram adicionados 4 mL de solução mineral e 4 mL de solução de vitaminas. A composição da solução mineral e de vitaminas está descrita no item 4.2.1 Informações complementares sobre a composição dos meios de cultura e as condições de ensaio são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Elementos variáveis da composição dos meios de cultura para avaliação do pH, concentração inicial de substrato e fonte de nitrogênio

Condição	Variáveis		
	pH	[GLY]	Fonte de nitrogênio
(+)	7,4	75,00 g/L	NH <sub>4</sub> Cl (2,68 g/L)
(-)	6,0	12,60 g/L	Ureia (1,50 g/L)
Espécie testada	Bactéria isolada do solo		
Temperatura	37 °C		
Tampões	MOPS + NaOH para pH 7,4 / Bis-Tris + HCl para pH 6,0 com concentração dos tampões 45 mM		
Agente redutor	Tioglicolato (0,6 g/L)		
Volume do meio de cultura	30 mL		
Volume do inóculo	1,5 mL		

O efeito das variáveis: pH, concentração de substrato e fonte de nitrogênio no crescimento bacteriano e no consumo de glicerol foi avaliado a partir dos resultados obtidos para um planejamento experimental do tipo fatorial 2<sup>3</sup> completo com replicata.

Os experimentos foram executados em duas etapas ou blocos conforme apresentado na Tabela 4. Na geração deste planejamento experimental e na análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Design Expert (versão 6.0.5). As variáveis respostas avaliadas foram densidade ótica (DO) e percentual de consumo de substrato (CG).

O crescimento bacteriano foi acompanhado pela alteração da densidade ótica (DO) do meio, sendo a mesma determinada pela absorvância ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu - Modelo UVMMini 1240).

Os perfis de fermentação foram estudados pela análise em CLAE com um sistema de injeção (Gilson modelo 234) e bombeamento (Gilson modelo 321) com detector RI (Scientific Instruments - Modelo Iota 2), coluna Hi Plex H 300 X 7,8 mm (Varian), fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, temperatura de 75 °C e vazão de 0,45 mL/min. Em algumas análises foram utilizadas vazões de 0,52 mL/min e 0,75 mL/min.

Tabela 4 – Planejamento experimental para avaliação do efeito das variáveis: pH, [GLY]<sub>ini</sub> e fonte de nitrogênio. Onde: pH = 7,4 (+) e pH = 6,0 (□); [GLY] = 75,00 g/L (+) e [GLY] = 12,60 g/L (□); C1 – NH<sub>4</sub>Cl e C2 – ureia

Nº Ensaio	Nº Corrida	BLOCO	pH	[GLY]	Fonte N
1	8	1	1,00	1,00	C2
1	14	2	1,00	1,00	C2
2	2	1	1,00	-1,00	C1
2	9	2	1,00	-1,00	C1
3	5	1	-1,00	-1,00	C2
3	11	2	-1,00	-1,00	C2
4	3	1	-1,00	1,00	C1
4	12	2	-1,00	1,00	C1
5	4	1	1,00	1,00	C1
5	15	2	1,00	1,00	C1
6	7	1	-1,00	1,00	C2
6	16	2	-1,00	1,00	C2
7	1	1	-1,00	-1,00	C1
7	13	2	-1,00	-1,00	C1
8	6	1	1,00	-1,00	C2
8	10	2	1,00	-1,00	C2

#### 4.5 Efeitos da triptona, concentração de ureia e tioglicolato

A composição básica do meio de cultura foi a mesma descrita no item 4.4, contudo nesta fase foram testados os efeitos da concentração de ureia, da presença ou ausência de triptona e tioglicolato. Informações complementares sobre a composição dos meios de cultura e as condições de ensaio são apresentadas na Tabela 5.

Nesta bateria de ensaios, diferentemente das seções 4.4 e 4.6, os frascos de fermentação tiveram um respiro, através de uma agulha estéril, para aliviar a pressão gerada pelos gases produzidos no processo fermentativo (CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>).

O efeito das variáveis: concentração de ureia, presença ou ausência de triptona e tioglicolato no crescimento bacteriano e no consumo de glicerol foi avaliado a partir dos resultados obtidos para um planejamento experimental do tipo fatorial 2<sup>3</sup> completo com replicata. Os experimentos foram executados em duas etapas ou blocos conforme apresentado na Tabela 6. Na geração deste planejamento experimental e na análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Design Expert (versão 6.0.5). As



variáveis respostas avaliadas foram densidade ótica (DO) e percentual de consumo de substrato (CG).

Tabela 5 - Elementos variáveis da composição dos meios de cultura para avaliação da concentração de ureia, da presença ou ausência de triptona e de tioglicolato

Condição	Variáveis		
	[Tryptona] (g/L)	[Ureia] (g/L)	[Tioglicolato] (g/L)
(+)	2,0	4,9	0,6
(-)	0,0	1,5	0,0
Espécie testada	Bactéria isolada do solo		
Temperatura	37 °C		
Tampões	MOPS + NaOH para pH 7,4 com concentração do tampão em 45 mM		
[GLY] (g/L)	75,60		
Volume do meio de cultura	30 mL		
Volume do inóculo	1,5 mL		

Tabela 6 - Planejamento experimental para avaliação do efeito das variáveis: [Tryptona], [Ureia] e [Tioglicolato]. Onde: [Tryptona] = 2,0 g/L (A<sub>2</sub>) e [Tryptona] = 0,0 (A<sub>1</sub>); [Ureia] = 4,9 g/L (+) e [Ureia] = 1,5 g/L (□); [Tioglicolato] = 0,6 g/L (C<sub>2</sub>) e [Tioglicolato] = 0,0 g/L (C<sub>1</sub>)

Nº Ensaio	Nº Corrida	Bloco	[Tryptona]	[Ureia]	[Tioglicolato]
1	2	Bloco 1	A1	-1	C1
1	14	Bloco 2	A1	-1	C1
2	6	Bloco 1	A2	-1	C1
2	13	Bloco 2	A2	-1	C1
3	8	Bloco 1	A1	1	C1
3	11	Bloco 2	A1	1	C1
4	5	Bloco 1	A2	1	C1
4	12	Bloco 2	A2	1	C1
5	7	Bloco 1	A1	-1	C2
5	9	Bloco 2	A1	-1	C2
6	1	Bloco 1	A2	-1	C2
6	10	Bloco 2	A2	-1	C2
7	3	Bloco 1	A1	1	C2
7	15	Bloco 2	A1	1	C2
8	4	Bloco 1	A2	1	C2
8	16	Bloco 2	A2	1	C2

O crescimento bacteriano foi acompanhado pela alteração da densidade ótica (DO) do meio, sendo a mesma determinada pela absorvância ( $\lambda = 600$  nm) em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu - Modelo UVMMini 1240). Os perfis de fermentação foram estudados por meio análise em CLAE, sendo utilizados dois equipamentos distintos Varian ProStar e Varian 920-LC com coluna HPX 87H (BioRad) com dimensões de 300 x 7,8 mm.

Na Tabela 6 os termos A1 e C1 representam a ausência, enquanto A2 e C2 representam a adição de triptona e tioglicolato nas concentrações indicadas na Tabela 5.

Nas análises de CLAE foram utilizadas duas metodologias: ÁCIDA (adaptação das metodologias de GALDEANO et al., 2008 e DU et al., 2006) e CHEN (TALARICO et al., 1988; CHEN et al., 2007). Na primeira delas a fase móvel foi  $H_2SO_4$  5 mM com temperatura da coluna em 65 °C, enquanto na segunda metodologia a fase móvel foi composta por uma mistura acidificada (0,5 mM de  $H_2SO_4$ ) de acetonitrila e água na proporção 35:65 (v/v) com a temperatura da coluna fixada em 25 °C. Em ambos os casos a vazão utilizada foi de 0,5 mL/min. O detetor utilizado foi do tipo RI, sendo que, no caso do Varian 920-LC também foi utilizado o detetor PDA, com a finalidade de verificar a sobreposição de picos, especialmente quando utilizada a técnica denominada ÁCIDA.

A grande vantagem da metodologia proposta por Talarico et al. (1988) e aperfeiçoada por Chen et al. (2007) consiste no fato que os picos referentes aos ácidos orgânicos tornam-se pequenos e são deslocados para o início da eluição, assim os picos de glicerol, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, DHA e 3-HPA ficam mais bem definidos nos cromatogramas.

#### 4.6 Avaliação da biodegradação da glicerina bruta pela bactéria *Klebsiella oxytoca*

Nos ensaios experimentais das seções 4.4 e 4.5 o substrato utilizado foi glicerol padrão PA. Para avaliar o real potencial da bactéria isolada, nesta fase experimental, foi utilizado como substrato o glicerol obtido da produção industrial de biodiesel, sendo a amostra fornecida pela unidade industrial de São Simão (GO) da empresa Caramuru.

Este produto foi obtido a partir da fase pesada gerada na produção de biodiesel, pela rota metílica, conforme fluxograma apresentado na Figura 10. A fase pesada foi submetida à evaporação simples para recuperação do metanol e o produto resultante é a glicerina bruta que devido à sua cor é também denominada de *glicerina loira*.

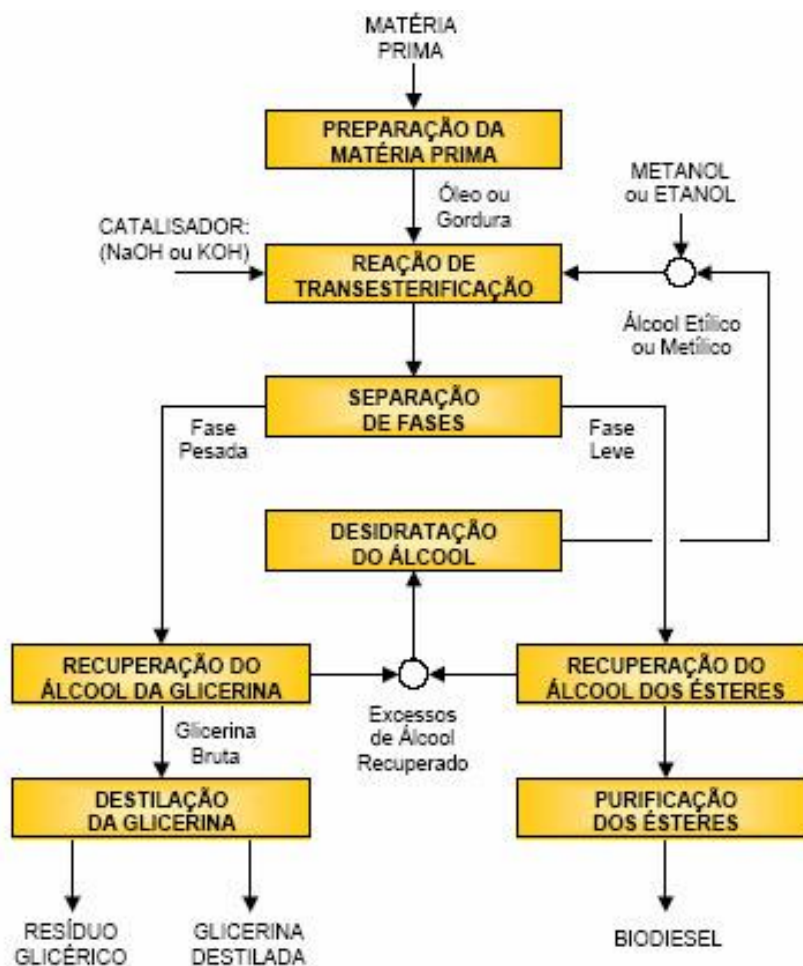


Figura 10 – Fluxograma de produção convencional de biodiesel pela rota metílica  
Fonte: CAEAT, 2003

Este subproduto do biodiesel tem um teor intermediário de sais (6,51 %), traços de metanol (<0,10 %) e um elevado teor de sabões 43.615 ppm. A concentração de glicerol na amostra foi de 81,75 % e a umidade de 8,58 % conforme pode ser observado no Anexo I.

Os parâmetros de composição utilizados nos ensaios estão descritos nas Tabelas 7 e 8. O substrato não sofreu nenhum tipo de pré-tratamento antes de seu uso.

Nesta etapa foram testados os efeitos das variáveis: composição e tamponamento ou não do meio sobre o consumo de glicerol e a produção de 1,3-propanodiol. O planejamento experimental utilizado foi do tipo fatorial  $2^2$  completo com replicata. Os experimentos foram executados em duas etapas ou blocos conforme apresentado na Tabela 9. Na geração deste planejamento experimental e na análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Design Expert (versão 6.0.5). As variáveis respostas avaliadas foram: percentual de consumo de substrato (CG) e produção de 1,3-propanodiol (g/L).

Tabela 7 – Parâmetros relativos à composição dos meios de ensaio da glicerina bruta

Composição	Concentração de agente redutor - tioglicolato de sódio (g/L)	Condições de pH	Concentração de Glicerina Bruta
A1	0,6000	Adição de 9,5 g/L de MOPS e ajuste do pH em 7,4 (codificação C2)	75,60 g/L
A2		Sem adição de tampão e ajuste do pH em 7,4 (codificação C1)	

Tabela 8 – Composição dos meios de ensaio da grade experimental utilizada na avaliação da glicerina bruta como fonte de carbono

COMPONENTE	COMPOSIÇÃO	
	A1 (g/L)	A2 (g/L)
Super Fosfato Triplo	-	0,8926
Ureia (PM 60,07)	1,5	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Fosfato monobásico de potássio (PM 136,10)	0,65	-
KCl Cloreto de potássio	4,3	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Sulfato de potássio (PM 174,26)	0,1	-
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O Cloreto de magnésio hexahidratado (PM 203,30)	0,2	-
Solução de vitaminas	4 mL/L	-
Solução mineral	4 mL/L	-

Na Tabela 9 os termos A1 e A2 representam a composição definida conforme a Tabela 8, enquanto C2 e C1 representam o tamponamento ou não do meio, respectivamente, de acordo com a nomenclatura explicitada na Tabela 7.

Devido às interferências dos sabões e outros resíduos presentes no substrato foi decidido não acompanhar a evolução da DO dos meios. Nas análises de CLAE foram utilizadas as metodologias denominadas ÁCIDA (adaptação das metodologias de GALDEANO et al., 2008 e DU et al., 2006) e CHEN (TALARICO et al., 1988; CHEN et al., 2007), já descritas na seção anterior.

Tabela 9 – Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> completo com replicata para avaliação do potencial de biodegradação da *K. oxytoca*. Codificação correspondente a descrita nas Tabelas 7 e 8.

ORDEM PADRÃO	ENSAIO	BLOCO	COMPOSIÇÃO	CONDIÇÃO DE TAMPONAMENTO
1	1KS	Bloco 1	A1	C1
2		Bloco 2	A1	C1
3	2KS	Bloco 1	A1	C2
4		Bloco 2	A1	C2
5	3KS	Bloco 1	A2	C1
6		Bloco 2	A2	C1
7	4KS	Bloco 1	A2	C2
8		Bloco 2	A2	C2

A análise da composição molar percentual dos gases contidos nos frascos de fermentação foi realizada por cromatografia gasosa no equipamento TRACE CG (Thermo-Finnigan) equipado com detetor de condutividade térmica. A composição do padrão utilizado está descrita na Tabela 10. Como padrão para o oxigênio foi tomado como referência uma amostra de ar.

Tabela 10 – Composição dos padrões utilizados na análise de cromatografia gasosa

<b>PADRÃO</b>				
Componente	Tempo de retenção (min)	Área	% real	
Hidrogênio	1,58	16581560	50,00	
Nitrogênio	2,27	659944	21,33	
Metano	3,43	442913	4,94	
Monóxido de carbono	3,79	56120	2,08	
Dióxido de carbono	5,15	52462	1,95	
Eteno	6,22	643338	9,85	
Etano	7,36	678968	9,85	
TOTAL		19115300	100,00	
<b>AR</b>				
Componente	Tempo de retenção	Área	% real	
Oxigênio	1,95	830679	26,35	
Nitrogênio	2,21	2322193	73,65	
TOTAL		3152872	100,00	

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento e caracterização da cepa selvagem

As amostras retiradas dos erlenmeyers e semeadas nas placas de Agar Nutriente formaram dois tipos de colônias bacterianas: uma predominante de cor branca e mucóide e outra minoritária de formato esférico e cor vermelha. Os resultados do esfregaço e a coloração de Gram indicam a predominância de um pequeno bacilo Gram-negativo e pequenas quantidades de um bacilo Gram-positivo (Figura 11). Esta última devido ao seu fraco desenvolvimento foi considerada como um contaminante.

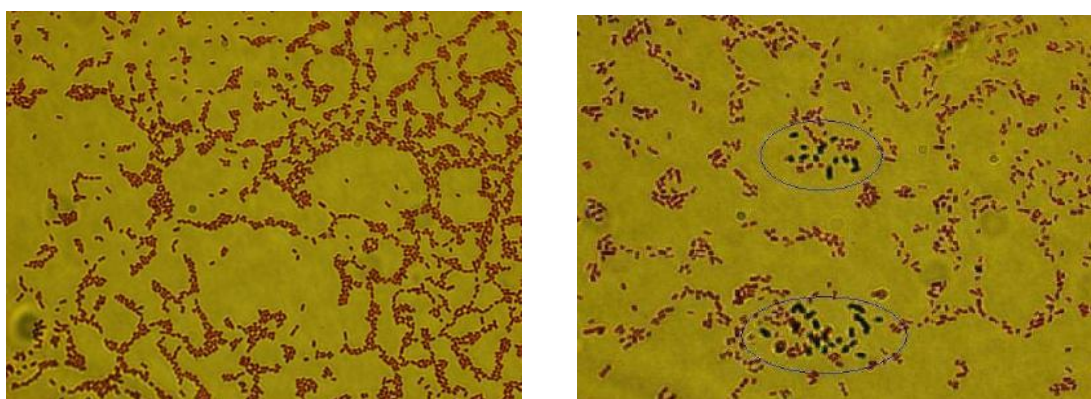


Figura 11 – Análise microscópica do esfregaço após a coloração de Gram das bactérias desenvolvidas nos meios de isolamento. Na microfotografia da direita estão destacadas as bactérias Gram-positivas. O aumento foi de 100X.

No processo de isolamento descrito na seção 4.2.2, o repique entre o meio contendo glicerol e as placas de Agar Nutriente, foi repetido até a obtenção de colônias puras sob o ponto de vista morfológico e microscópico. O objetivo foi isolar a bactéria Gram-negativa predominante identificada nas microfotografias apresentadas na Figura 11.

Após a obtenção da cepa pura foram realizadas avaliações morfológicas, microscópicas e ensaios bioquímicos básicos, sendo os resultados apresentados na Tabela 11. Estes dados e os ensaios realizados nos equipamentos Phoenix 100 e MicroScan 4 indicam que o microrganismo isolado se trata de uma *Klebsiella oxytoca* (Anexo II). Os resultados obtidos no antibiograma indicaram que a bactéria é susceptível a grande maioria

dos antibióticos testados, característica importante quando se pretende fazer uso industrial da mesma, pois em termos de biossegurança deve-se encaixar no grupo I.

Tabela 11 - Testes para identificação do gênero ao qual pertence a bactéria isolada a partir de amostras de solo

Teste	Resultado
Morfologia	Colônias circulares, convexas, margens lisas, brancas e mucóides
Coloração de Gram	Negativo
Prova TSI	A/A com gás e negativo para H <sub>2</sub> S
Caldo nitrato	Positivo
Prova de ureia	Positivo
Prova de oxidase	Negativo
Mobilidade	Negativo

### 5.2 Efeitos do pH, concentração de substrato e fonte de nitrogênio

Os resultados referentes às curvas de crescimento das médias dos diversos ensaios realizados estão representados na Figura 12. A partir destes resultados,  $t = 48$  h foi definido como ponto de referência, pois neste tempo todas as amostras atingiram o início da fase estacionária de crescimento.

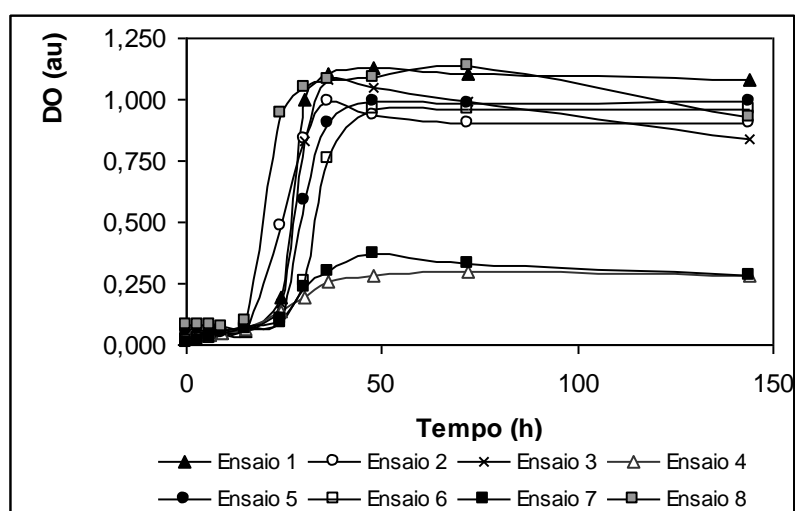


Figura 12 – Curvas de crescimento médias para os ensaios descritos na Tabela 4. A densidade ótica foi medida em termos de absorvância (grandeza adimensional) no comprimento de onda de 600 nm

A avaliação das curvas de crescimento indica que o maior desenvolvimento bacteriano foi obtido nos ensaios com pH = 7,4 e fonte de nitrogênio ureia, enquanto o pior desempenho foi obtido nos ensaios com pH = 6,0 e fonte de nitrogênio cloreto de amônia, conforme pode ser observado na Figura 13 em comparação com a Tabela 4.

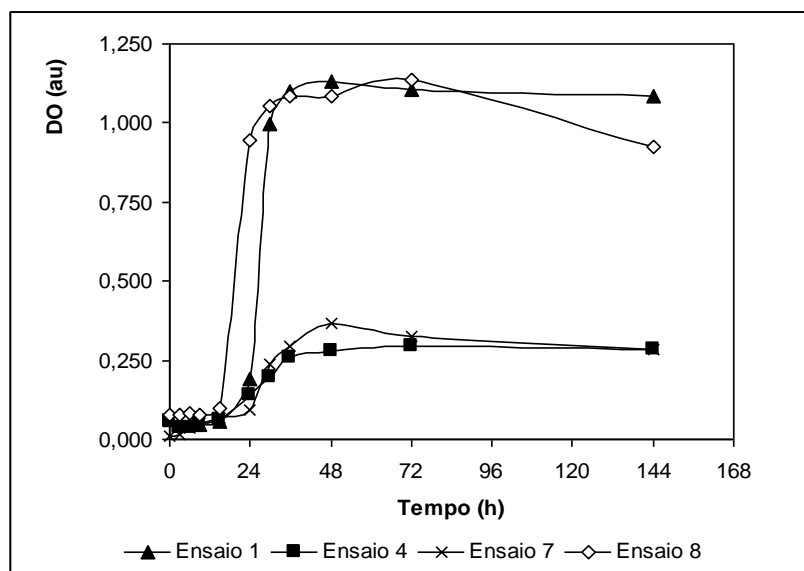


Figura 13 – Curvas de crescimento para os melhores e piores desempenhos de crescimento obtidos nos ensaios descritos na Tabela 4. A densidade ótica foi medida em termos de absorvância (grandeza adimensional) no comprimento de onda de 600 nm. Os ensaios nº 4 e nº 7 foram realizados em pH = 6,0 e com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte de nitrogênio, enquanto os ensaios nº 1 e nº 8 em pH = 7,4 e ureia como fonte de nitrogênio

Os resultados obtidos para as variáveis respostas analisadas no tempo de referência são apresentados na Tabela 12 e no Anexo III. De acordo com os resultados da análise de variância, os modelos lineares, representativos da densidade ótica (DO) e do consumo percentual de glicerol (CG) foram estatisticamente significativos para  $p < 0,05$ . Os requisitos de distribuição normal, média nula, variância constante e independência dos erros foram atendidos de acordo com os testes estatísticos complementares do programa Design Ease versão 6.0.5.

A avaliação gráfica dos dados estatísticos indica que a densidade ótica atinge valores maiores quando a fonte de nitrogênio é a ureia, praticamente independente do pH do meio em especial quando a concentração de substrato foi baixa. Por outro lado, quando a fonte de nitrogênio foi cloreto de amônia o crescimento microbiano foi favorecido em pH igual a 7,4, sendo fortemente inibido sob pH = 6,0 independente da concentração inicial de



substrato. Estes resultados estão representados nas Figuras 14 e 15. Estes resultados divergem daqueles registrados por Hongwen et al. (2005), contudo a cepa utilizada por estes pesquisadores foi uma *Klebsiella pneumoniae*. Além disso, as condições experimentais são diferentes em especial a composição do meio de cultura.

Tabela 12 – Respostas obtidas para DO e CG em t = 48 h para grade experimental da Tabela 4

Nº Ensaio	Nº Corrida	BLOCO	pH	[GLY]	Fonte N	DO	Consumo de Glicerol (%)
1	8	Block 1	1,00	1,00	C2	1,128	43,71
1	14	Block 2	1,00	1,00	C2	1,134	46,25
2	2	Block 1	1,00	-1,00	C1	0,937	83,86
2	9	Block 2	1,00	-1,00	C1	0,941	87,07
3	5	Block 1	-1,00	-1,00	C2	1,042	97,21
3	11	Block 2	-1,00	-1,00	C2	1,059	96,83
4	3	Block 1	-1,00	1,00	C1	0,279	19,53
4	12	Block 2	-1,00	1,00	C1	0,281	18,25
5	4	Block 1	1,00	1,00	C1	0,985	41,50
5	15	Block 2	1,00	1,00	C1	1,005	42,45
6	7	Block 1	-1,00	1,00	C2	0,955	31,31
6	16	Block 2	-1,00	1,00	C2	0,961	33,15
7	1	Block 1	-1,00	-1,00	C1	0,358	26,53
7	13	Block 2	-1,00	-1,00	C1	0,377	28,51
8	6	Block 1	1,00	-1,00	C2	1,078	99,68
8	10	Block 2	1,00	-1,00	C2	1,096	99,86

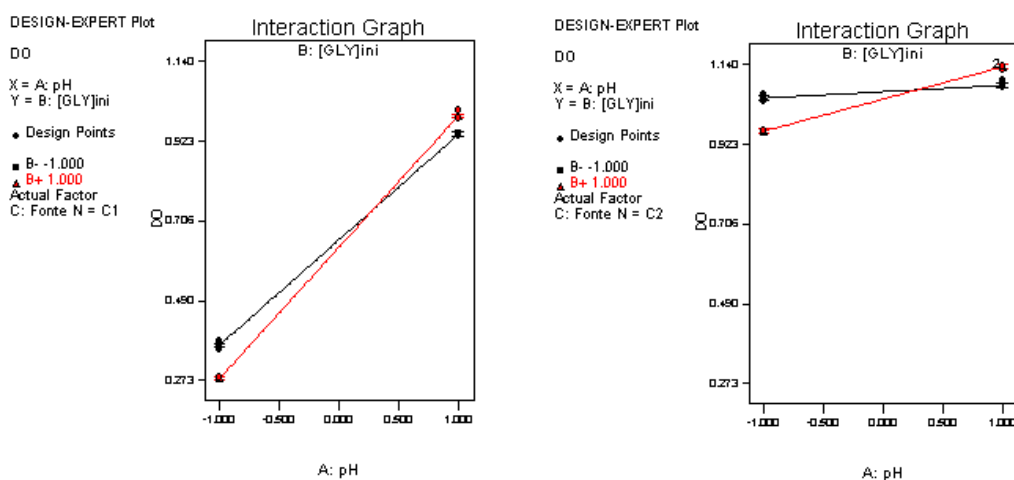


Figura 14 – Interação pH e concentração inicial de substrato em relação à densidade ótica (DO)

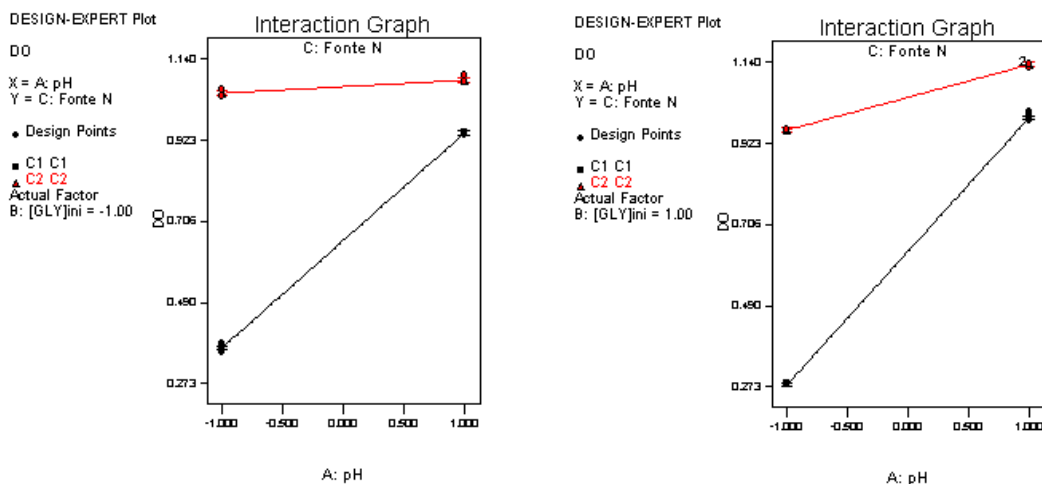


Figura 15 – Interação pH e fonte de nitrogênio em relação à densidade ótica (DO)

Quando a concentração inicial de substrato foi elevada (75,00 g/L) o consumo percentual de glicerol foi baixo 18,89 % e 32,23 %, para nitrogênio proveniente de cloreto de amônia e ureia respectivamente, no pH = 6,0, e 41,98 % e 44,98 % no pH = 7,4. Estes dados se referem à projeção do modelo determinado estatisticamente.

No caso de baixa concentração inicial de substrato a conversão do glicerol atinge valores próximos de 100 % no caso da fonte de nitrogênio ser a ureia indiferente do valor do pH. Entretanto, caso a fonte de nitrogênio seja o cloreto de amônia a conversão do glicerol no pH igual a 6,0 foi extremamente baixa mesmo quando a concentração inicial de glicerol foi baixa. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 16 e 17.

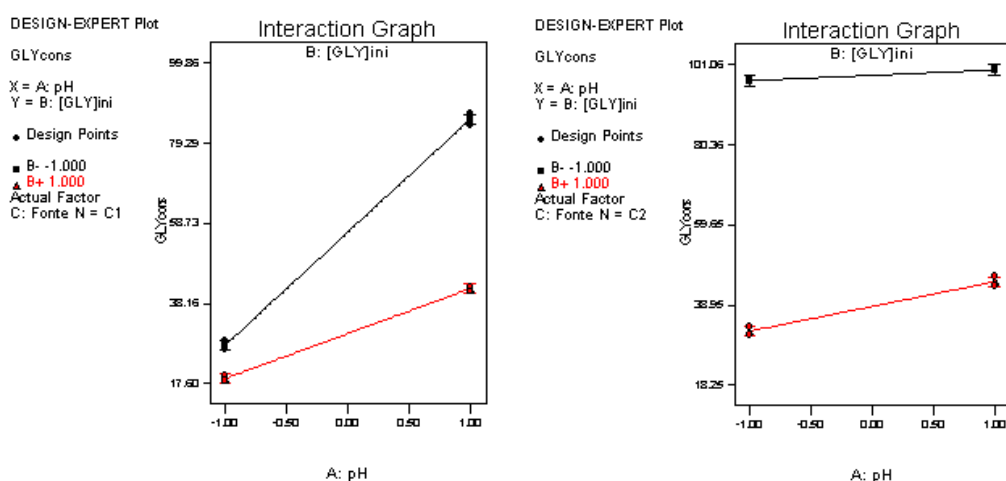


Figura 16 – Interação pH e concentração inicial de substrato em relação ao consumo percentual de glicerol (CG)

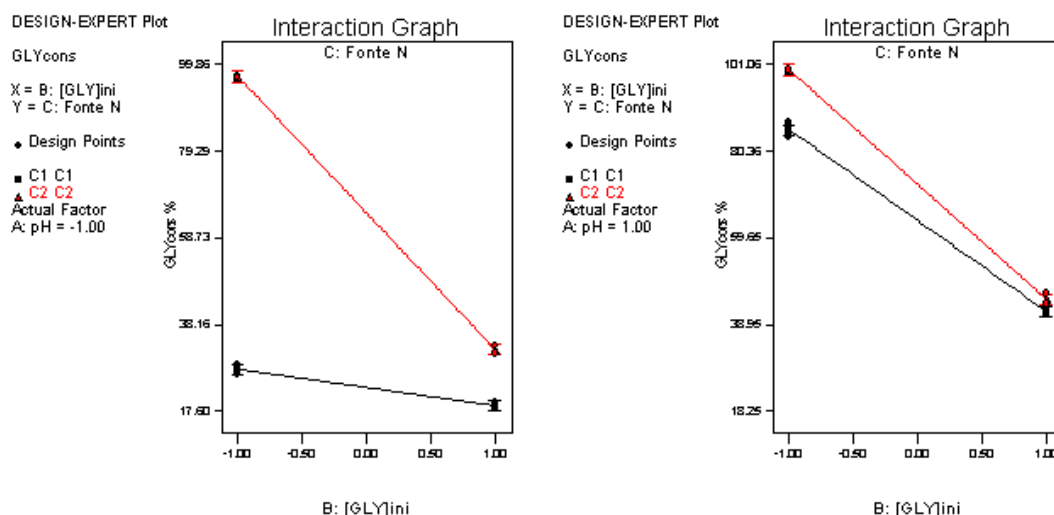


Figura 17 – Interação concentração inicial de substrato e fonte de nitrogênio em relação ao consumo percentual de glicerol (CG)

Os modelos da DO com R-quadrado ajustado igual a 0,9997 e do consumo percentual de glicerol (CG) com R-quadrado ajustado igual a 0,9989, para o caso da fonte de nitrogênio ser a ureia, estão representados pelas equações (1) e (2) respectivamente.

$$DO = 1,057 + 0,052 * pH - 0,010 * [GLY]_{ini} + 0,035 * pH * [GLY]_{ini} \quad (1)$$

$$CG = 68,501 + 3,875 * pH - 29,894 * [GLY]_{ini} + 2,499 * pH * [GLY]_{ini} \quad (2)$$

Os dados obtidos e o modelo matemático produzido a partir da análise de Anova indicam claramente que a ureia e o  $pH = 7,4$  estimulam o crescimento da cepa estudada e conduzem a um maior consumo de glicerol (CG). Além disso, o aumento da concentração inicial de substrato tem efeito negativo sobre o consumo de glicerol para o tempo 48 h.

A evolução do consumo do substrato e o perfil dos produtos para o ensaio n° 8 (Tabela 4) com  $[GLY]_{ini} = 0,137$  mol/L estão representados nas Figuras 18 e 19. Neste caso o rendimento de 1,3-propanodiol, após 72 h de fermentação, atingiu 0,5738 mol/mol de substrato ou 57,38%. Estes valores foram superiores aqueles obtidos por Homann et al. (1990) que obtiveram 44 % para a *Klebsiella oxytoca* Lin e 54,10 % para a *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026, contudo naqueles experimentos a concentração de inicial de glicerol foi de 0,543 mol/L e os valores de rendimento se referem a amostras com tempo de fermentação igual a 12 h.

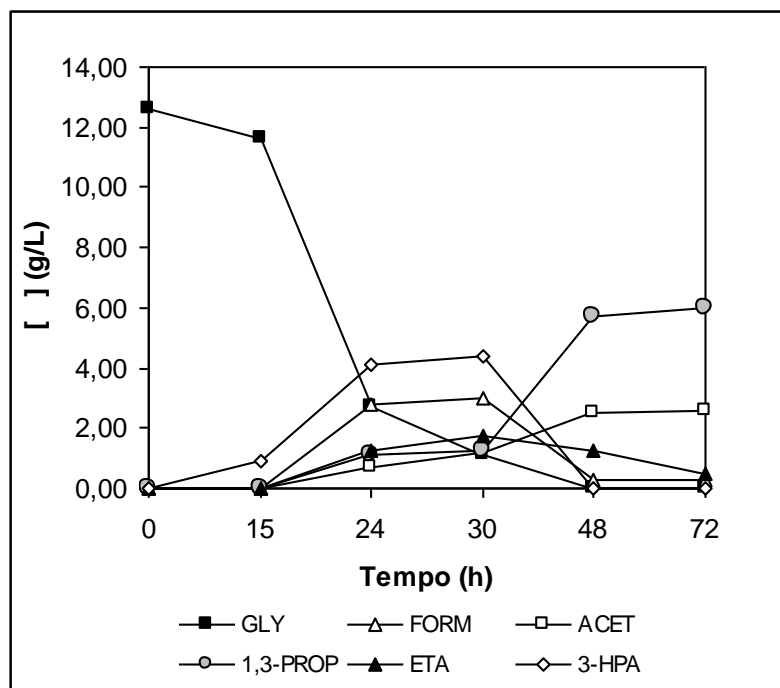


Figura 18 – Consumo do substrato e perfil dos produtos formato, acetato, etanol, 1,3-propanodiol e 3-HPA para o ensaio nº 8 (Tabela 4) com pH 7,4, fonte de nitrogênio – ureia (1,5 g/L) e  $[GLY]_{ini} = 0,137$  mol/L. Onde GLY = glicerol; FORM = formato; ACET = acetato; 1,3-PROP = 1,3-propanodiol; ETA = etanol; 3-HPA = 3-hidroxi-propanal

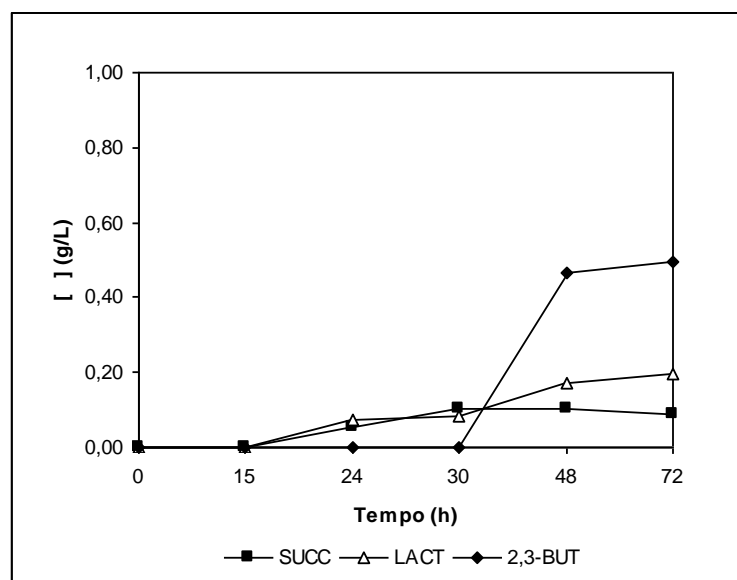


Figura 19 – Perfil dos produtos minoritários: succinato, lactato e 2,3-butanodiol para o ensaio nº 8 (Tabela 4) com pH 7,4, fonte de nitrogênio – ureia (1,5 g/L) e  $[GLY]_{ini} = 0,137$  mol/L. Onde SUCC = succinato; LACT = lactato; 2,3-BUT = 2,3-butanodiol

Avaliando a Figura 18 foi possível observar que a diminuição da velocidade de consumo do glicerol a partir de 24 h de fermentação coincide com a estabilização no valor

da concentração de 3-HPA e de formato. Por outro lado, a maior produção de 1,3-propanodiol, ocorrida no período entre 30 e 48 h (no início da fase estacionária de crescimento – Figura 13), está relacionada com a fase de consumo de 3-HPA como era de se esperar, mas também coincide com a fase de rápida degradação do formato em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. O que leva a supor que exista uma relação entre estes fenômenos. Provalvemente isto esteja relacionado com algum mecanismo alternativo de regeneração de NADH, mas os dados colhidos não permitem esclarecer um vínculo claro e inequívoco sobre essa hipótese.

Na Figura 19 se observa que a produção de 2,3-butadiol somente se inicia após 30 h de fermentação e as quantidades de succinato e lactato são muito pequenas. Assim, os principais produtos do processo foram 1,3-propanodiol e acetato, além de formato que posteriormente se transformou em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>.

### *5.3 Efeitos da triptona, concentração de ureia e tioglicolato*

Os resultados referentes à determinação da densidade ótica são apresentados no Anexo IV. A partir destes dados foram construídas as curvas de crescimento das médias dos diversos ensaios realizados, sendo as mesmas representadas na Figura 20. O tempo igual a 72 h foi definido como ponto de referência, pois neste tempo todas as amostras atingiram a fase estacionária de crescimento no mínimo há 24 h.

A avaliação dos gráficos apresentados nas Figuras 20(A) e 20(B) indicam que os meios contendo triptona exigem um tempo de adaptação da bactéria mais longo em torno de 10 h e no caso no ensaio nº 5 o tempo da fase de adaptação (lag) chega a aproximadamente 20 h. Neste último caso a baixa concentração de ureia e a presença de tioglicolato parecem potencializar o efeito negativo da triptona no tempo da fase lag. Enquanto, os meios sem triptona apresentam um tempo para a fase lag em torno de 3 h.

Por outro lado, quando foi adicionado tioglicolato os valores da DO foram inferiores àqueles observados nos meios sem adição deste. O ensaio nº 7 foi a única exceção, pois neste caso os valores da DO são equivalentes aos observados nos meios sem a presença do tioglicolato.

Os resultados obtidos para o consumo de glicerol (CG) no tempo de referência são apresentados na Tabela 13. Os dados mostram que o consumo máximo de glicerol acontece sob as condições estabelecidas para o ensaio nº 7.

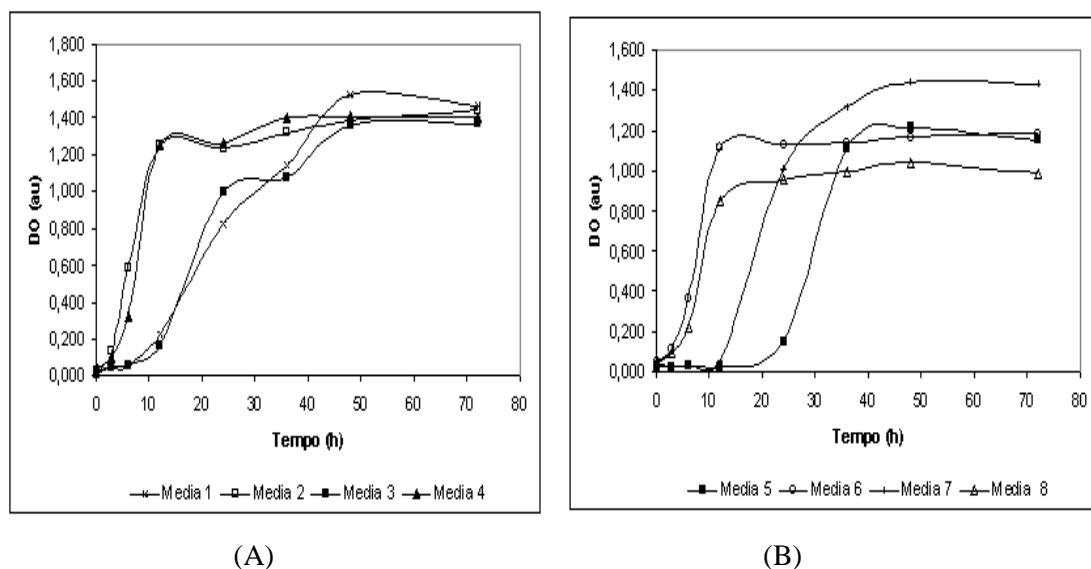


Figura 20 – Curvas de crescimento obtidas para os ensaios descritos na Tabela 6. A densidade ótica foi medida em termos de absorvância (grandeza adimensional) no comprimento de onda de 600 nm. (A) Ensaios onde não houve adição de tioglicolato ao meio de cultura. (B) Ensaios onde foi adicionado 0,6 g/L de tioglicolato ao caldo fermentativo

Tabela 13 – Dados relativos ao consumo de glicerol para a grade experimental descrita na tabela 6. As concentrações de glicerol estão expressas em g/L. Em todas as análises de CLAE foi utilizada a metodologia CHEN (TALARICO et al., 1988; CHEN et al., 2007).

Ensaio	Amostra	Área	Área média	[GLY]res	[GLY]cons	[GLY]res	[GLY]cons	% Cons
1	1T72	11374835	11845985	35,65	39,95	34,23	41,37	54,72
	2T72	12317135						
2	3T72	10507347	10507347	31,62	44,47	31,62	43,98	58,17
	4T72*	74,7						
3	5T72	12248596	12216246	36,77	38,83	36,86	38,74	51,24
	6T72	12183896						
4	7T72*	91,0	13682409	41,18	36,34	37,33	38,27	50,62
	8T72	13682409						
5	9T72	12829166	12393935	37,30	38,30	38,61	36,99	48,93
	10T72	11958704						
6	11T72	14833328	14607462	44,64	30,96	44,64	30,96	40,95
	12T72	14381595						
7	13T72	7716391	7578388	22,81	52,79	23,22	52,38	69,28
	14T72	7440385						
8	15T72	12186487	12783351	38,47	37,13	36,68	38,92	51,49
	16T72	13380215						

Onde [GLY]res = quantidade de glicerol residual e [GLY]cons = quantidade de glicerol consumida

Algumas observações relativas à Tabela 13 devem ser registradas:

- as amostras destacadas com (\*) foram analisadas no CLAE Varian 920 LC, sendo a concentração do padrão igual a 8,0 g/L que combinado com a área determinada no cromatograma 1 do Anexo V fornece um fator de cálculo igual a 0,41025641;
- as amostras não destacadas foram analisadas no CLAE Varian ProStar, sendo a concentração do padrão igual a 1,3 g/L que combinado com o cromatograma 2 do Anexo V fornece um fator de cálculo igual a 3,0096E-06.

De acordo com os resultados da análise de variância, os modelos lineares obtidos a partir dos dados contidos no Anexo IV e na Tabela 13, representativos da densidade ótica (DO) e do consumo percentual de glicerol (CG) foram estatisticamente significativos para  $p < 0,05$ . Os requisitos de distribuição normal, média nula, variância constante e independência dos erros foram atendidos de acordo com os testes estatísticos complementares do programa Design Ease versão 6.0.5.

A avaliação gráfica dos dados estatísticos (Figura 21) indica que a densidade ótica, ou seja, o crescimento microbiano atinge valores levemente superiores quando a concentração de ureia é mínima, praticamente independente da presença de triptona, para meios nos quais não foi adicionado tioglicolato. Por outro lado, quando o meio de cultura contém tioglicolato a DO atinge valores máximos quando se utiliza concentração máxima de ureia sem a adição de triptona e foi fortemente inibida quando adicionada triptona. Contudo, para a concentração mínima de ureia a adição de triptona contribui com o aumento da DO.

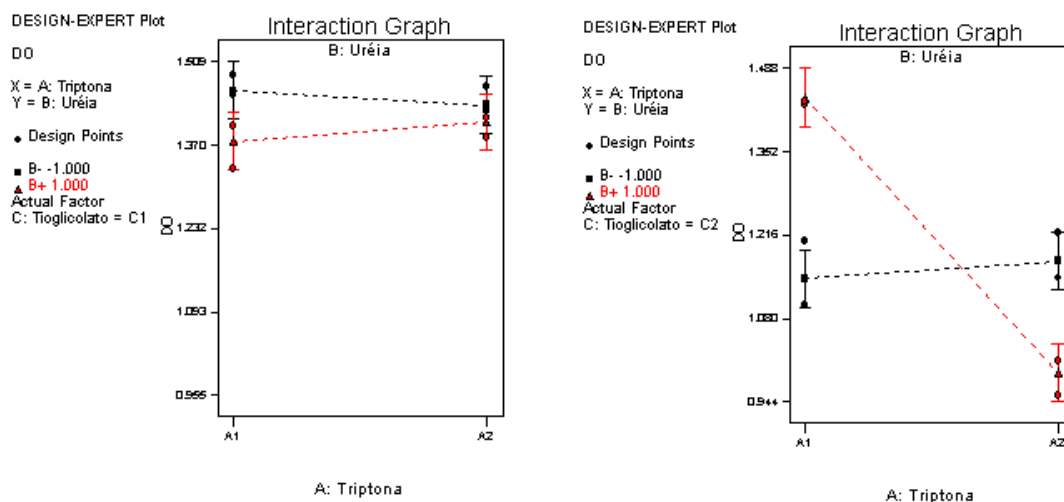


Figura 21 – Interação triptona e concentração de ureia em relação a densidade ótica (DO)

Assim, o crescimento microbiano da cepa estudada foi estimulado por elevadas concentrações de ureia (4,9 g/L), sem adição de triptona, quando sob condições limitadas de oxigênio (adição de tioglicolato).

Em relação ao consumo de glicerol observou-se que o mesmo independe da concentração de ureia para os meios nos quais não foi adicionado tioglicolato e triptona. Contudo, a adição de triptona favorece o consumo do substrato quando a concentração de ureia foi mínima, enquanto diminui a conversão quando a concentração de ureia no meio foi elevada. Sob condições limitantes de oxigênio a adição de triptona atua negativamente no consumo do glicerol, enquanto o aumento da concentração de ureia tem efeito positivo. Assim, a conversão de glicerol foi máxima para o meio limitado de oxigênio (adição de tioglicolato), sem adição de triptona e com concentração de 4,9 g/L de ureia (Ensaio nº 7). Os resultados estão apresentados na Figura 22.

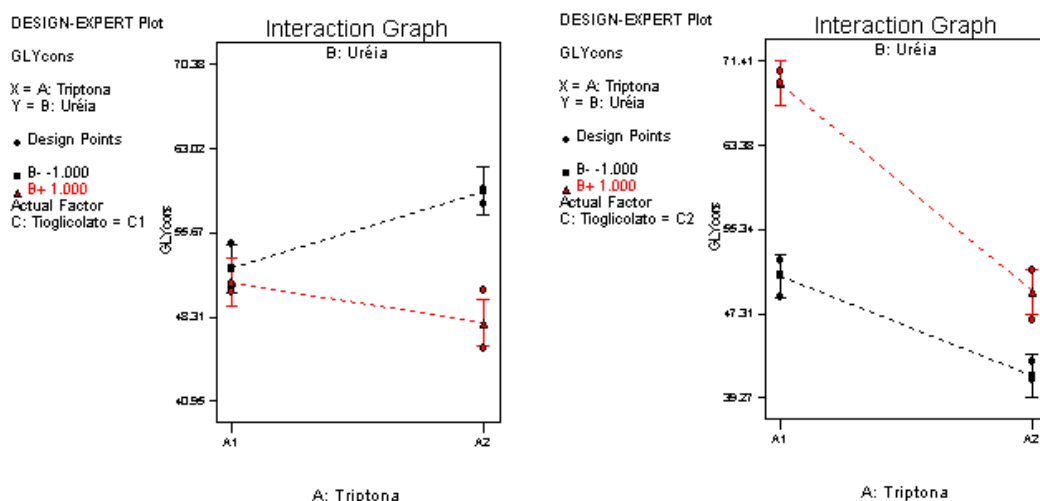


Figura 22 – Interação concentração de ureia e triptona em relação ao consumo percentual de glicerol (CG)

Os modelos da DO com R-quadrado ajustado igual a 0,9394 e do consumo percentual de glicerol (CG) com R-quadrado ajustado igual a 0,9382 estão representados, em termos das variáveis codificadas da Tabela 6, pelas equações (3) e (4) respectivamente.

$$DO = 1,300 - 0,051 * A - 0,120 * C - 0,053 * A * B - 0,054A * C + 0,028 * B * C - 0,067 * A * B * C \quad (3)$$

$$CG = 52,76 - 3,29 * A + 1,71 * B - 2,58 * A * B - 4,09 * A * C + 4,89 * B * C \quad (4)$$



Onde,

A = concentração de triptona (g/L)

B = concentração de ureia (g/L)

C = concentração de tioglicolato (g/L)

Os dados relativos à evolução dos produtos e do substrato ao longo do processo de degradação sob condições microaeróbias, para o ensaio nº 7, estão representados na Tabela 14.

Tabela 14 – Evolução dos produtos e do substrato para o ensaio nº 7. As concentrações do substrato e dos produtos estão expressa em g/L. Nas análises de CLAE foram utilizadas as metodologias: ÁCIDA (adaptação das metodologias de GALDEANO et al., 2008 e DU et al., 2006) e CHEN (TALARICO et al., 1988; CHEN et al., 2007).

AMOSTRA Nº 13 e 14 referentes ao Ensaio 7		TEMPO (h)						
PRODUTO	MÉTODO	0	3	12	24	36	48	72
		Concentração (g/L)						
SUCC	ÁCIDO	0,00	0,00	0,00	0,23	0,47	0,70	0,93
LACT	ÁCIDO	0,00	0,00	0,00	0,33	1,30	2,55	3,90
GLYresd	CHEN	75,60	70,65	68,08	62,71	46,36	39,88	36,02
%GLYcons	CHEN	0,00	6,55	9,95	17,04	38,68	47,25	52,35
GLYresd	ÁCIDO	75,60	75,26	76,69	70,26	52,92	45,58	40,66
ACET	ÁCIDO	0,00	0,00	0,00	1,49	1,95	1,74	1,84
FORM	DIF	0,00	4,62	8,62	7,54	6,56	5,70	4,64
1,3-PROP	CHEN	0,00	0,00	0,00	3,08	10,36	13,47	15,85
2,3-BUT	ÁCIDO	0,00	0,00	0,00	0,00	2,55	3,88	4,18
3-HPA	CHEN	0,00	0,34	0,64	0,77	0,69	0,67	0,71
ETA	ÁCIDO	0,00	0,00	0,95	1,03	1,11	1,22	0,31
Massa bacteriana (g)		0,00	0,00	0,38	0,64	1,46	1,79	1,98
MASSA TOTAL (g)		75,60	75,60	78,66	78,89	73,86	74,51	74,34
Recuperação de carbono (%)		100,00	100,00	104,19	104,49	97,83	98,69	98,46
*Fator de cálculo 1,3-PROP - Varian 920-LC		0,51282	Até o tempo igual a 3 h se supõe que as bactérias estão na fase lag e o consumo de glicerol apenas sustenta a adaptação do inóculo					
*Fator de cálculo 3-HPA - Varian 920-LC		0,02166						

SUCC = succinato, LACT = lactato, GLYresd = glicerol residual, %GLYcons = percentual de glicerol consumido, ACET = acetate, FORM = formato, 1,3-PROP = 1,3-propanodiol, 2,3-BUT = 2,3-butanodiol, 3-HPA = 3-hidroxipropanaldeído, ETA = etanol.

A concentração residual de glicerol foi determinada pelo método CHEN, pois não existe sobreposição de picos. Enquanto, a quantidade de formato produzida foi calculada a partir da observação que o pico determinado como sendo glicerol pelo método ÁCIDO inclui também o formato. Portanto, a diferença entre a concentração calculada pelo método ÁCIDO e o método CHEN representa a quantidade de formato produzida.

Os demais ácidos orgânicos, o etanol e o 2,3-butanodiol foram determinados pela metodologia ÁCIDA. Enquanto, o 1,3-propanodiol foi determinado pelo método CHEN.

Durante a fase lag não há aumento significativo da população bacteriana e o substrato consumido neste período apenas contribui com a sustentação do processo de adaptação do inóculo pela síntese de proteínas e de outros metabólitos ou componentes necessários à utilização satisfatória dos nutrientes presentes no meio (MADIGAN et al., 2004; TORTORA et al., 2005).

Assim, de acordo com os dados fornecidos pela Figura 20(B), para tempos inferiores a 12 h, no caso do ensaio nº 7, não deverá ocorrer crescimento significativo do microrganismo. Partindo deste pressuposto e do princípio de conservação da massa foi calculada a quantidade ou concentração de 3-HPA para o  $t = 3$  h. Conseqüentemente, o fator de cálculo para o 3-HPA pode ser determinado levando em consideração a área observada no cromatograma respectivo (Anexo VI).

Ainda, segundo Homman et al. (1990) a massa bacteriana pode ser calculada como sendo igual a 5 % do glicerol consumido. Esta hipótese foi aplicada para tempos maiores ou iguais a 12 h. Também foi considerado o desaparecimento do formato ao longo do tempo na obtenção na massa total de cada amostragem. Por exemplo, para  $t = 48$  h a massa total foi calculada como sendo a somatória do glicerol residual, dos produtos identificados nos cromatogramas e a diferença da quantidade de formato em relação ao valor registrado em  $t = 12$  h.

A degradação do formato produz  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ , portanto somente pela análise qualitativa e quantitativa da fase gasosa contida nos frascos de fermentação permitiria a determinação precisa desses componentes. Neste caso, os experimentos foram conduzidos de modo que o  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  formados foram expulsos do recipiente de fermentação através de um “respiro”. Mas o balanço de massa pode ser utilizado como uma ferramenta de determinação indireta de grande valia como pode ser verificado pelos valores de recuperação de carbono apresentados na Tabela 14.

A Figura 23 descreve os valores residuais de glicerol determinados pelos métodos: ÁCIDO e CHEN, além de descrever o consumo percentual de glicerol para o Ensaio nº 7.

A observação desta figura permite afirmar que em qualquer amostragem o valor do glicerol residual calculado a partir da metodologia ÁCIDA foi sempre superior ao valor determinado pela metodologia CHEN. Isto confirma a sobreposição dos picos de formato e glicerol, para todos os tempos de amostragem, quando utilizada a metodologia ÁCIDA.

A curva de consumo de glicerol, descrita na Figura 23, pode ser dividida em três fases:

- entre 0 e 24 h, período que inclui a fase lag e praticamente toda a fase logarítmica de crescimento (ver Figura 20B), há um consumo de glicerol igual a 17,04 %. Isto representa uma taxa de consumo de aproximadamente  $5,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .
- entre 24 e 36 h, a velocidade de consumo de glicerol aumenta significativamente apesar de estar no final da fase logarítmica de crescimento (Figura 20B). Neste caso, a taxa de consumo sobe para  $14,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , ou seja, quase triplica de valor.
- entre 36 h e 72 h, no estabelecimento da fase estacionária de crescimento (Figura 20B), a velocidade de consumo de glicerol cai para  $3,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

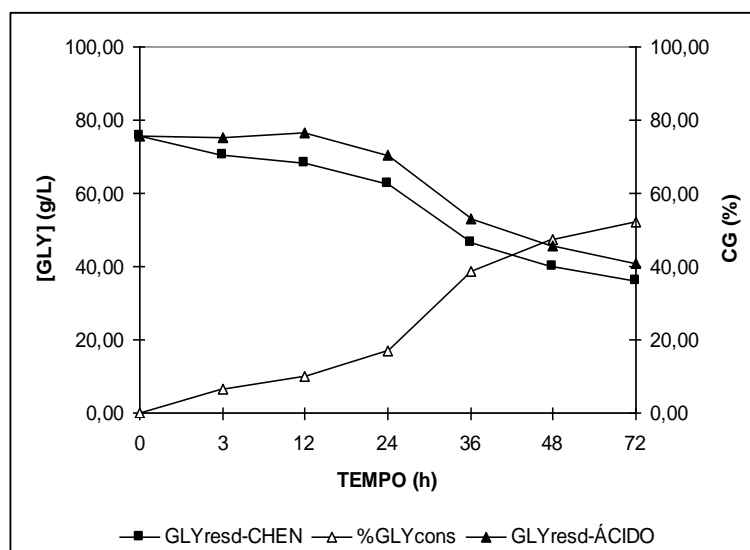


Figura 23 – Evolução da concentração de glicerol residual determinada pelos métodos: ÁCIDO (adaptação das metodologias de GALDEANO et al., 2008 e DU et al., 2006) e CHEN (TALARICO et al., 1988; CHEN et al., 2007), e consumo de glicerol (CG) para o ensaio n° 7 ao longo de 72 h de fermentação

A evolução dos produtos de fermentação para o Ensaio n° 7 está representada nas Figuras 24 e 25.

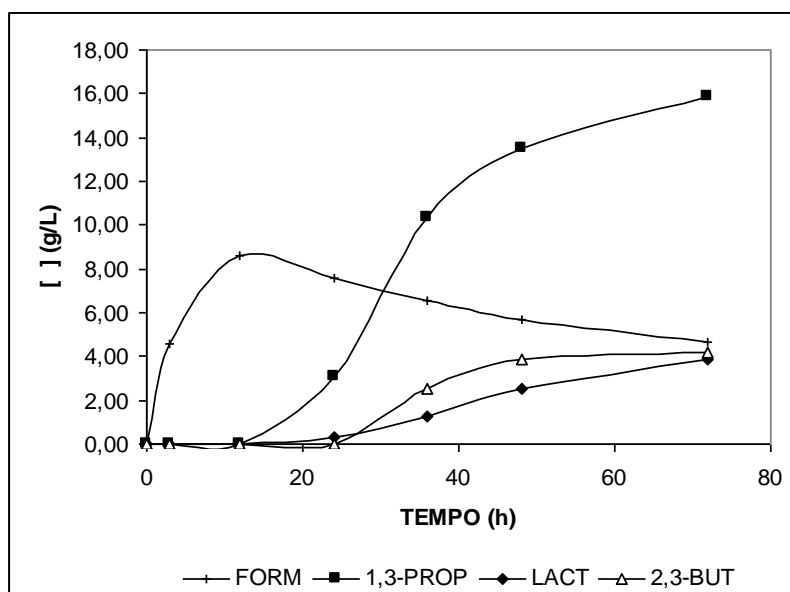


Figura 24 – Produção de formato (FORM), 1,3-propanodiol (1,3-PROP), lactato (LACT) e 2,3-butanodiol (2,3-BUT) para o ensaio n° 7 ao longo de 72 h de fermentação

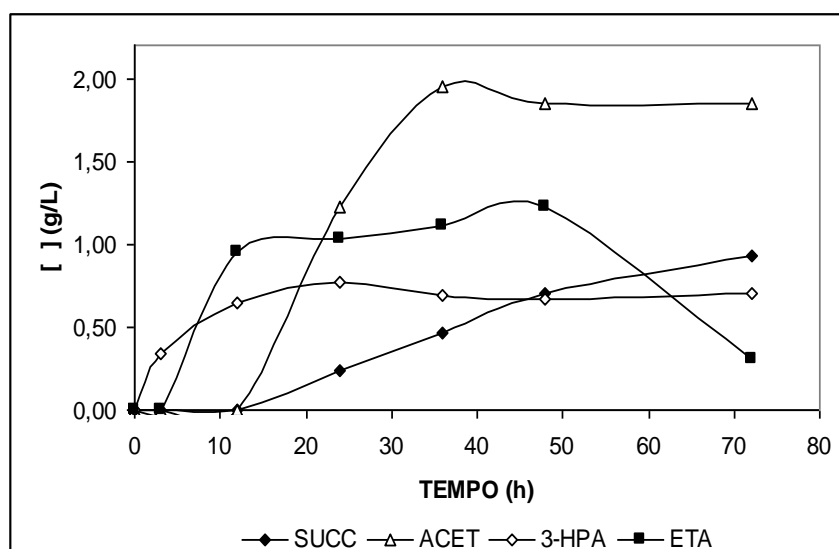


Figura 25 – Produção de succinato (SUCC), acetato (ACET), 3-HPA e etanol (ETA) para o ensaio n° 7 ao longo de 72 h de fermentação

Algumas observações importantes destes gráficos devem ser listadas:

- a produção de 1,3-propanodiol apresenta uma fase de maior velocidade no período compreendido entre 24 e 36 h (Figura 24);
- o formato foi acumulado até o tempo 12 h e depois foi consumido continuamente (Figura 24);

- o intermediário 3-HPA foi acumulado até 24 h, após este período a quantidade deste produto ficou estável (Figura 25);
- quantidades mensuráveis de succinato (Figura 25), lactato e 2,3-butanodiol (Figura 24) somente foram detectadas após 24 h;
- a produção de acetato fica estagnada após 36 h de incubação do inóculo (Figura 25).

Avaliando as Figuras 23, 24 e 25, foi possível observar que o aumento da velocidade de consumo do glicerol e a maior produção de 1,3-propanodiol, ocorrida no período entre 24 e 36 h, coincidem com a fase de consumo do formato e estabilidade na concentração de 3-HPA. O que leva a supor que exista uma relação entre estes fenômenos.

Contudo, uma avaliação mais precisa exigiria o acompanhamento da evolução da concentração de  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ , da composição dos gases produzidos e das enzimas envolvidas no processo degradativo.

#### 5.4 Biodegradação da glicerina bruta

Desde que não se dispunha de dados relativos à evolução da DO, o tempo de referência igual a 72 h foi definido com base nos resultados obtidos nas baterias experimentais anteriores.

Os resultados obtidos para o consumo de glicerol (CG) no tempo de referência são apresentados na Tabela 15. Os dados mostram que o consumo máximo de glicerol acontece sob as condições estabelecidas para o ensaio 2KS que equivale aos experimentos nº 3 e 4 da Tabela 9.

Tabela 15 – Resultados referentes ao consumo de glicerol (CG) para os ensaios com glicerina bruta

Amostra	$[\text{GLY}]_{\text{Resd1}}$ (g/L)	$[\text{GLY}]_{\text{Resd2}}$ (g/L)	$[\text{GLY}]_{\text{Cons1}}$ (g/L)	$[\text{GLY}]_{\text{Cons2}}$ (g/L)	$[\text{GLY}]_{\text{Cons1}}$ (%)	$[\text{GLY}]_{\text{Cons2}}$ (%)
1KS	53,89	49,85	21,71	25,75	28,72	34,06
2KS	42,61	44,21	32,99	31,39	43,64	41,52
3KS	60,36	56,95	15,24	18,65	20,16	24,67
4KS	50,40	49,36	25,20	26,24	33,33	34,71

Os resultados da análise de variância indicam claramente que o CG foi máximo quando se utiliza o meio A1 tamponado em pH igual a 7,4. A diferença entre o valor do CG obtido para o meio A1 tamponado e o mesmo meio não tamponado foi de 35,65 %, enquanto, a diferença para o meio A2 tamponado e A2 não tamponado foi de 25,16 % e 89,92 %, respectivamente.

Em relação às variáveis testadas: composição e tamponamento do meio foi determinado, pela análise de variância, que existe um efeito combinado e interdependente que favorece a produção de 1,3-propanodiol quando se utiliza o meio A1 tamponado em pH = 7,4, conforme pode ser observado na Tabela 16 e na Figura 26.

Tabela 16 – Produção de 1,3-propanodiol nos ensaios com glicerina bruta. Valores determinados pelo método Ácido no equipamento Varian ProStar

Amostra	[1,3-PROP] (g/L) replicata 1	[1,3-PROP] (g/L) replicata 2	[1,3-PROP] (g/L) média
1KS	4,51	3,49	4,00
2KS	11,04	12,06	11,55
3KS	1,01	0,92	0,96
4KS	5,71	5,96	5,83

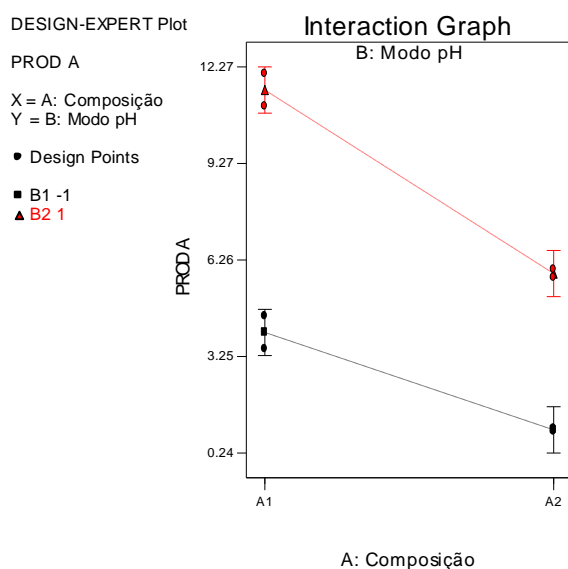


Figura 26 – Interação das variáveis composição e tamponamento sobre a produção de 1,3-propanodiol para os ensaios com glicerina bruta

A Figura 27 descreve os valores residuais de glicerol determinados pelos métodos: ÁCIDO e CHEN, além de descrever a produção de 1,3-propanodiol para o ensaio 2KS. Assim, como fora observado nos ensaios da seção anterior para diversas amostragens o valor do glicerol residual calculado a partir da metodologia ÁCIDA foi superior ao valor determinado pela metodologia CHEN, confirmando a sobreposição dos picos de formato e glicerol quando utilizada a metodologia ácida.

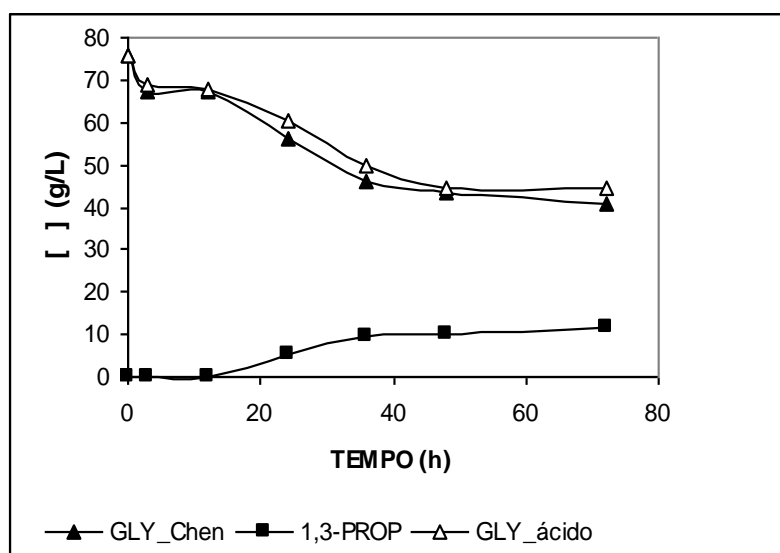


Figura 27 - Concentração de glicerol residual determinado pelos métodos ÁCIDO e CHEN e a produção de 1,3-propanodiol para o ensaio 2KS

A maior velocidade de consumo do glicerol acontece no período compreendido entre 12 e 36 h de fermentação. Fato que coincide com a fase de maior produção de 1,3-propanodiol.

Os dados relativos à evolução dos produtos e do substrato ao longo do processo de degradação sob condições microaeróbias, para o ensaio 2KS, estão representados na Tabela 17 e nas Figuras 28 e 29.

A sistemática utilizada para determinar o glicerol residual e a quantidade de formato formado foi a mesma implementada na seção anterior. Assim, o fator de cálculo para o componente 3-HPA foi determinado pelo balanço de massa no tempo igual a 3 h. Conseqüentemente, o fator de cálculo para o 3-HPA pode ser determinado levando em consideração a área observada no cromatograma respectivo (Anexo VII).

Tabela 17 – Evolução dos produtos e do substrato para o ensaio 2KS

Metabolito	TEMPO (h)						
	0	3	12	24	36	48	72
	Concentração (g/L)						
Succinato <sup>(1)</sup>	0,00	0,00	0,00	0,23	0,37	0,37	0,47
Lactato <sup>(1)</sup>	0,00	0,00	0,00	0,30	0,70	0,90	1,30
Glicerol <sup>(3)</sup>	75,60	67,29	67,40	56,33	46,17	43,65	40,84
Formato <sup>(4)</sup>	0,00	1,70	0,24	3,89	3,60	0,83	3,53
Acetato <sup>(1)</sup>	0,00	0,00	0,00	1,23	1,23	1,23	1,23
1,3-Propanodiol <sup>(3)</sup>	0,00	0,00	0,00	5,28	9,64	9,90	11,44
3-HPA <sup>(1)</sup>	0,00	6,61	6,83	7,09	6,79	5,60	6,74
2,3 butanodiol <sup>(3)</sup>	0,00	0,00	0,00	0,55	3,27	4,00	4,24
Etanol <sup>(1)</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,15	0,15
Massa microbiana <sup>(6)</sup>	0,00	0,00	0,41	0,96	1,47	1,60	1,74
TOTAL <sup>(5)</sup>	75,60	75,60	76,34	77,33	75,15	72,75	76,19
Recuperação de carbono (%)	100,00	100,00	100,98	102,28	99,41	96,23	100,78
Glicerol residual pelo método ácido <sup>(2)</sup>	75,60	68,99	67,64	60,22	49,77	44,49	44,37
Fator de cálculo para 3-HPA	0,440666667	Anexo VII					
Observações:	<p>(1) Determinado pelo método ácido em sistema CLAE Varian 920-LC com detetor RI sensibilidade padrão</p> <p>(2) Determinado pelo método ácido em sistema CLAE Varian ProStar com detetor RI marca CG 410 sensibilidade 1/2</p> <p>(3) Determinado pelo método de CHEN em sistema CLAE Varian 920-LC com detetor RI sensibilidade padrão</p> <p>(4) Diferença entre o valor do glicerol residual determinado pelo método ácido e pelo método CHEN</p> <p>(5) A somatória leva em consideração a degradação do formato em dióxido de carbono e hidrogênio</p> <p>(6) A massa bacteriana foi calculada pela aproximação de Homman et al. (1990) aplicada para tempos maiores ou iguais a 12 h.</p>						



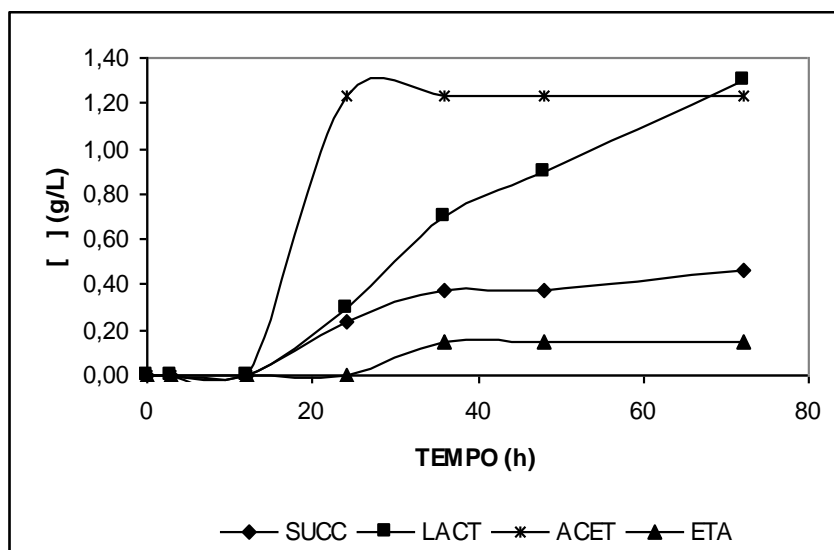


Figura 28 – Produção dos metabólitos minoritários: succinato (SUCC), lactato (LACT), acetato (ACET) e etanol (ETA) para o ensaio 2KS

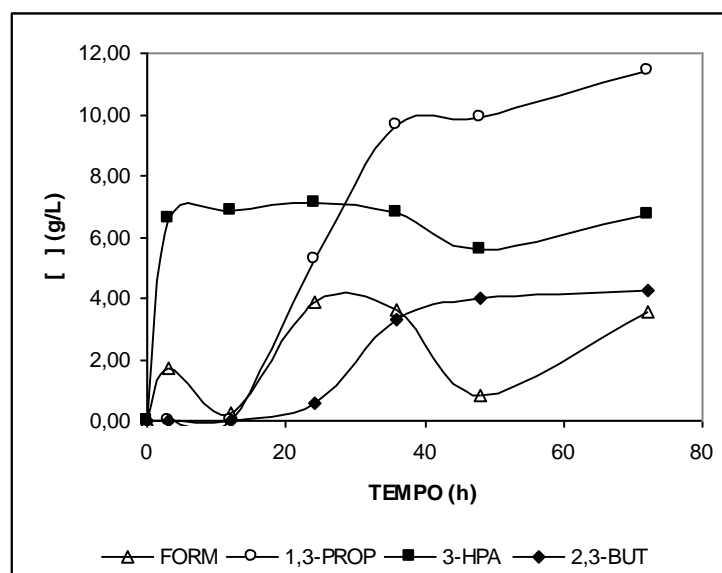


Figura 29 - Produção dos metabólitos majoritários: formato (FORM), 1,3-propanodiol (1,3-PROP), 3-hidroxiopropanaldeído (3-HPA) e 2,3-butanodiol (2,3-BUT) para o ensaio 2KS

Algumas observações importantes relativas às Figuras 28 e 29 devem ser listadas:

- a velocidade de formação do lactato foi maior entre 12 e 36 h, sendo sua produção contínua e crescente até 72 h;
- o succinato começa a ser produzido depois de 12 h e a sua concentração fica estável após 36 h;
- a produção de etanol somente acontece entre 24 e 36 h e não há consumo de etanol;

- os processos de formação e degradação de formato apresentam características cíclicas;
- o acúmulo e a degradação do intermediário 3-HPA acompanha suavemente o comportamento de formação e degradação de formato;
- a velocidade de formação de 1,3-propanodiol foi maior entre 12 e 36 h (5,28 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), parece se estabilizar entre 36 e 48 h, tornando a aumentar após esse tempo (0,84 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>);
- estas duas últimas observações reforçam a hipótese de que a regeneração de parte do NADH passa pelo consumo do hidrogênio formado a partir do formato quando o mesmo não foi liberado para a atmosfera;
- 2,3-butanodiol somente foi produzido no período entre 24 e 48 h.

Os dados mostram que a produção de 1,3-propanodiol foi limitada pela disponibilidade de NADH. O acúmulo de 3-HPA parece indicar não somente a indisponibilidade da nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH), mas também a síntese e a atividade exacerbada da enzima glicerol desidratase para situações de alta concentração do substrato.

Isto faz pressupor que a alta atividade da GDHt levaria ao desequilíbrio entre as reações do braço oxidativo e redutivo, além de terminar inibindo o crescimento microbiano em função do acúmulo de 3-HPA.

Esta hipótese é reforçada pela comparação dos valores do  $K_{m\_aparente}$  e da atividade específica das enzimas GDH e GDHt em relação ao substrato comum – glicerol, para a bactéria *Klebsiella*. Os valores do  $K_{m\_aparente}$  variam entre 0,53 e 1,5 mmol L<sup>-1</sup> (BRENDA, 2010) e entre 20 e 44,9 mmol L<sup>-1</sup> (LIN e MAGASANIK, 1960; MCGREGOR et al., 1974; NEIJSEL et al., 1975), para as enzimas GDHt e GDH, respectivamente. Enquanto a atividade específica varia entre 65,4 e 228  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  (BRENDA, 2010), para a GDHt, e entre 0,3 e 6,1  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  (RUCH et al., 1974; NEIJSEL et al., 1975; RUCH e LIN, 1975; RUCH et al., 1980; FORAGE e LIN, 1982; JOHNSON et al., 1985;), para a GDH. Isto pode implicar em um fluxo maior de material no braço redutivo.

Ainda, de acordo com Hao et al. (2008) a enzima PDOR constitui o passo limitante na produção de 1,3-propanodiol, na fase exponencial de crescimento, contrário daquilo que afirmara Ahrens et al. (1998).

Estes dados constituem mais um argumento para corroborar a hipótese de que, para altas concentrações de substrato, a velocidade de formação de 3-HPA é muito superior à

velocidade de formação de DHA, confirmando o provável desequilíbrio entre as reações do braço redutivo e o braço oxidativo, fato que explicaria o acúmulo 3-HPA.

Nesta fase experimental, foi realizada a análise dos gases contidos nos frascos de fermentação para  $t = 48$  h para as amostras 2KS, 3KS e 4KS da Tabela 16. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 18.

Tabela 18 – Composição percentual molar dos gases contidos nos frascos de fermentação para o tempo de 48 h.

<b>Amostra 2KS (-+)</b>		
Componente	Tempo de retenção (min)	% molar
Hidrogênio	1,51	14,58
Oxigênio	1,95	4,66
Nitrogênio	2,24	35,55
Dióxido de carbono	4,86	43,13
TOTAL		97,91
<b>Amostra 3KS (-+)</b>		
Componente	Tempo de retenção (min)	% molar
Hidrogênio	1,47	4,89
Oxigênio	1,94	17,18
Nitrogênio	2,20	73,00
Dióxido de carbono	5,12	4,75
TOTAL		99,82
<b>Amostra 4KS (++)</b>		
Componente	Tempo de retenção (min)	% molar
Hidrogênio	1,50	14,79
Oxigênio	1,95	7,62
Nitrogênio	2,23	47,66
Dióxido de carbono	4,94	28,10
TOTAL		98,17

A análise destes dados à luz dos resultados apresentados na Tabela 16 indica que a maior produção de 1,3-propanodiol está relacionada com um consumo maior de oxigênio presente no meio, pois as razões nitrogênio/oxigênio aumentam na seguinte ordem 3KS (4,25) < 4KS (6,25) < 2KS (7,63).

Por outro lado, as razões  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  também aumentam: 3KS (1:1) < 4KS (2:1) < 2KS (3:1). Considerando o esquema metabólico proposto por Galdeano et al. (2008) a

produção de CO<sub>2</sub> acontece por dois possíveis caminhos: a produção de 2,3-butanodiol e degradação equimolar de formato.

Como a formação de 1 mol de 2,3-butanodiol gera 2 mol de CO<sub>2</sub>, para t = 48 h, de acordo com os dados da Tabela 17 seriam produzidos 44,39 mmol de dióxido de carbono. Ainda, de acordo com a Tabela 17 haveria a formação de 66,49 mmol de CO<sub>2</sub> provenientes da degradação do formato, ou seja, o total seria de 110,88 mmol. Neste caso a razão esperada entre CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> seria de aproximadamente 1,67.

Entretanto, para o ensaio 2KS a razão foi igual a 3, ou seja, 80% maior. Levando em consideração a degradação total da ureia adicionada ao meio de cultura, que geraria 25 mmol de dióxido de carbono, a razão entre o CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> seria de 2:1. Este fato significa que houve assimilação do H<sub>2</sub> por meio de algum mecanismo metabólico.

A degradação do formato nas enterobactérias acontece via complexo formato-hidrogênio-liase (FHL). Este complexo é constituído por um selenopolipeptídeo denominado de formato-dehidrogenase-H (FDH-H), hidrogenases (Hyd) e algumas proteínas de membranas que desempenham o papel de ancoragem ou de carreadores de elétrons (LEONHARTSBERGER et al., 2002).

Diversos estudos indicam que a ativação do complexo FHL, com a ação da enzima FDH-H, acontece sob condições anaeróbias ou de baixa oxigenação e na ausência de outros aceptores de elétrons (LEONHARTSBERGER et al., 2002; BAGRAMYAN et al., 2002; HAKOBYAN et al., 2005; TRCHOUNIAN e TRCHOUNIAN, 2009).

De acordo com as informações disponíveis na base de dados UniProtKB (2010) foi identificada a presença de uma enzima FDH-H-NAD<sup>+</sup>-dependente nas bactérias *K. pneumoniae* (Cepa 342 genoma completo disponível) e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (ATCC 13884). Cabe lembrar que estas espécies são muito próximas da *K. oxytoca* em termos genéticos.

Contudo, de acordo com Galdeano et al. (2008) e Zhang et al. (2009) esse mecanismo não poderia ser atribuído a degradação do formato pela enzima formato-desidrogenase-NAD<sup>+</sup>-dependente, pois este tipo de enzima não estaria presente na *K. oxytoca*. O acesso a base de dados UniProtKB (2010) corrobora esta hipótese parcialmente, pois o rastreamento com o programa Blast não detectou o registro desta enzima para a espécie *K. oxytoca* (genoma incompleto).

A bactéria *E. coli* apresenta a codificação de quatro hidrogenases no seu genoma: Hyd-1, Hyd-2, Hyd-3 e Hyd-4 (VANDAR-SCHARA et al., 2007). A respeito da hidrogenase Hyd-3, de acordo com Mnatsakanyan et al. (2004), a atividade enzimática

umenta durante a fermentação de glicose, em pH levemente alcalino (7,5) e na presença de formato. Apesar disso, nestas condições a principal enzima responsável pela produção de  $H_2$  foi a Hyd-4. Segundo Maeda et al. (2007), a enzima Hyd-3 presente na *E. coli* pode atuar de forma reversível: produzindo ou consumindo  $H_2$ .

Trchounian e Trchounian (2009) estudaram a atuação das enzimas Hyd-1, Hyd-2, Hyd-3 e Hyd-4 na fermentação de glicerol pela bactéria *E. coli*, sob condições de pH neutro ou levemente alcalino. Os resultados destes pesquisadores mostram que a produção de  $H_2$  está ligada, em ordem crescente, à ação enzimática de Hyd-1 e Hyd-2. Enquanto, o consumo de  $H_2$  está relacionado com a atividade enzimática de Hyd-3 e Hyd-4. Exercendo funções inversas ou contrárias àquelas observadas no processo de fermentação da glicose (LEONHARTSBERGER et al., 2002; MNATSAKANYAN et al., 2004; VANDAR-SCHARA et al., 2007; REDWOOD et al., 2008).

Portanto, no caso da *E. coli* o resultado líquido na produção ou consumo de hidrogênio seria dado pela somatória das atividades das hidrogenases envolvidas no processo (TRCHOUNIAN e TRCHOUNIAN, 2009). Este conceito seria aplicável a qualquer situação na qual haja a ação de duas ou mais hidrogenases.

De acordo com os dados da base UniProtKB (2010), a bactéria *K. oxytoca* não apresenta no seu genoma as hidrogenases Hyd-1, Hyd-2 e Hyd-4, assim como acontece com as outras cepas do gênero *Klebsiella* registradas naquela base. Em relação à enzima Hyd-3 seus componentes protéicos *hycE* e *hycG* apresentam 90 % e 97 %, respectivamente, de similaridade com os correspondentes componentes da *E. coli* (K 12). Contudo, é importante ressaltar que o genoma da *K. oxytoca* foi apenas parcialmente estudado e identificado.

Este conjunto de informações parece indicar que a regeneração do NADH não deve acontecer por meio do complexo de hidrogenases, pois a bactéria estudada apresenta apenas um dos tipos desta enzima. Assim, esta hidrogenase deve ser a responsável, em conjunto com a enzima FDH-H, pela degradação do formato em  $CO_2$  e  $H_2$ .

Para a gênero *Clostridium* diversos pesquisadores identificaram um mecanismo de regeneração de NADH ligado ao sistema enzimático piruvato:ferrodoxina-oxidoredutase (PFO). Neste caso a regeneração do NADH estaria ligada a uma enzima bidirecional NADH:ferrodoxina-redutase ou a enzima ferrodoxina: $NAD^+$  redutase (VASCONCELOS et al., 1994; SAINT-AMANS et al., 2001; GIRBAL e SOUCAILLE, 1994; GIRBAL et al., 1995; GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2006). Na transformação de piruvato para acetilCoA seria gerado  $CO_2$ . Isto poderia alterar a relação molar de  $CO_2$  e  $H_2$ .

Zeng et al. (1993) propuseram a existência de um mecanismo similar no processo de fermentação do glicerol pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* (cepa DSM 2026). Na estrutura do caminho metabólico proposto por Galdeano et al. (2008) foi considerada esta possibilidade, contudo a participação do complexo enzimático PFO no caso da *K. pneumoniae* (cepa DSM 2026) foi descartada por Menzel et al. (1997).

Assim, a indicação de um provável mecanismo para incorporação de  $H_2$  somente poderá ser proposto futuramente após a determinação das atividades enzimáticas presentes no processo fermentativo de degradação do glicerol pela bactéria *K. oxytoca*.

No caso da glicerina bruta o maior consumo de glicerol e a formação de 1,3-propanodiol se mostraram crescentes até 36 h de fermentação, conforme pode ser observado na Figura 27. Este comportamento foi similar àquele registrado, para a bactéria *E. agglomerans*, por Barbirato et al. (1998) e descrito na Figura 30.

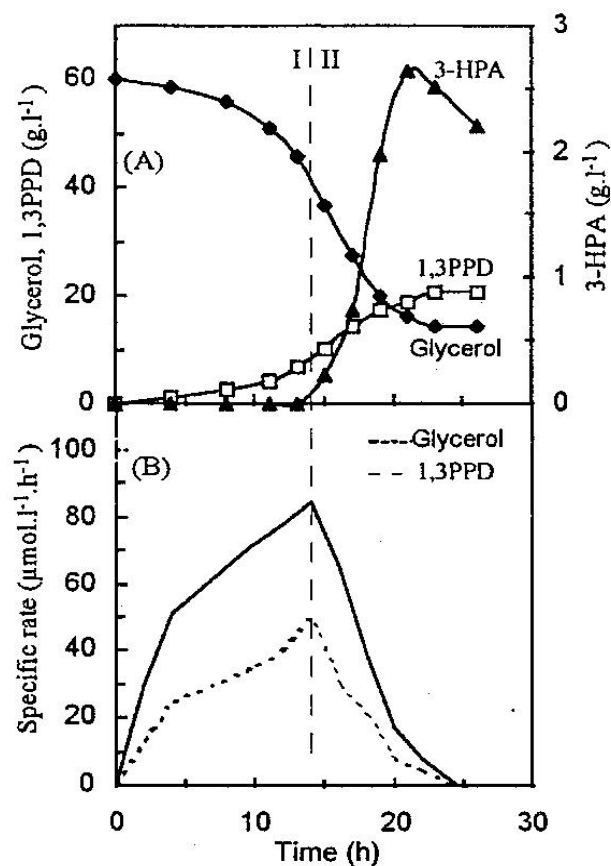


Figura 30 – Evolução do consumo de substrato, acúmulo de 3-HPA e produção de 1,3 propanodiol pela bactéria *E. agglomerans*. A linha tracejada divide o comportamento da cultura antes (Fase I) e depois (Fase II) do aparecimento do intermediário 3-HPA. Adaptado de Barbirato et al. (1998)

Contudo, quando se confronta o perfil de produção/acúmulo de 3-HPA (Figura 29) associado ao consumo de substrato e produção de 1,3-propanodiol (Figura 27) com a Figura 30 (BARBIRATO et al., 1998) se percebe que nos experimentos com glicerina bruta e *K. oxytoca*, a concentração de 1,3-propanodiol foi crescente até 36 h, ficando estável entre 36 e 48 h, e tornando a aumentar após este período.

Após 36 h de fermentação, a degradação do intermediário 3-HPA parece sustentada, basicamente, pela regeneração do NADH por meio de um mecanismo alternativo, diferente daquele associado às principais reações do braço oxidativo da degradação de glicerol. Esta afirmação leva em conta a estabilidade na produção da massa microbiana e dos principais produtos desta rota metabólica: acetato, etanol, 2,3-butanodiol, com exceção do lactato e formato. Isto permite levantar a hipótese de que a fenomenologia responsável pelo processo de degradação de glicerol pela *K. oxytoca*, sob as condições experimentais utilizadas, difere daquela descrita na seção 3.5.9.

Analisando a proposta de fluxo metabólico descrita por Galdeano et al. (2008) e Zhnag et al. (2009), Figura 5, e os perfis de consumo de substrato e formação de produtos (Figuras 27, 28 e 29), aparentemente a fase log de crescimento se estendeu até 36 h de fermentação, sendo que após este tempo a bactéria, já na fase estacionária, utiliza mecanismos alternativos de sobrevivência diminuindo a concentração de 3-HPA, pois este componente possui marcante ação negativa sobre o crescimento e a sobrevivência bacteriana (AXELSSON et al., 1989; TALARICO e DOBROGOSZ, 1989).

Um fato contrastante entre os experimentos das seções 5.3 e 5.4 foi a concentração de 3-HPA acumulada, para  $t = 24$  h,  $0,77 \text{ g L}^{-1}$  e  $7,09 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente.

Além disso, a produção de 1,3-propanodiol nos experimentos da seção 5.3 foi de  $15,85 \text{ g L}^{-1}$ , para  $t = 72$  h, enquanto nos experimentos da seção 5.4 a produção atingiu  $11,55 \text{ g L}^{-1}$ , ou seja, nos experimentos da seção 5.3 a produção de 1,3-propanodiol foi 37,23 % superior.

Isto poderia ser atribuído exclusivamente à composição do meio, em especial o tipo de substrato utilizado, glicerol padrão PA nos experimentos da seção 5.3, e glicerina bruta nos experimentos da seção 5.4. Entretanto, os experimentos da seção 5.3 foram realizados com auxílio de um “respiro”. Assim, há a troca de gases entre o meio ambiente, o frasco reacional e o meio de cultura, apesar da barreira de óleo mineral. É importante lembrar que a enzima GDHt é inibida pelo oxigênio (SEIFERT et al., 2001).

Deste modo, a hipótese aqui proposta é que o menor acúmulo de 3-HPA e consequentemente o maior rendimento em termos de 1,3-propanodiol, obtidos na seção

5.3, se deve parcialmente à diminuição da atividade da GDHt em função da presença de oxigênio no meio reacional, pois nestas circunstâncias se induz a um equilíbrio entre as reações dos braços oxidativo e redutivo, e à razão de formação e consumo do intermediário 3-HPA.

Esta proposição encontra apoio em algumas observações realizadas por diversos pesquisadores, relativas a cepas de *Klebsiella* e *Citrobacter*, que demonstraram que condições estritamente anaeróbias não são necessárias para a produção satisfatória de 1,3-propanodiol. Além disso, a atividade das enzimas GDHt e PDOR, sob condições de aerobiose possuem valores muito próximos ao longo do processo fermentativo, e a presença de oxigênio favorece a regeneração de NADH (ZHENG et al., 2008; HAO et al., 2008; CHEN et al., 2009). Pasteris e Strasser de Saad (2009) também registraram atividade das enzimas GDHt e PDOR sob condições microaeróbias durante o cultivo de *L. hilgardii* utilizando glicerol como substrato.

Outro dado interessante foi que Hao et al. (2008) observaram que a enzima GDH está ativa sob condições aeróbias, este fato já fora cogitado por Neijssel et al. (1975). Ainda, de acordo com os dados de Hao et al. (2008), a atividade da enzima GDHt, para  $t = 7,5$  h, foi três vezes superior à atividade da enzima PDOR. Esta diferença justificaria o acúmulo temporário de 3-HPA nas primeiras horas de fermentação nos ensaios realizados por esses pesquisadores.

Assim, no caso dos ensaios da seção 5.3, onde houve disponibilidade de oxigênio pelo respiro, o acúmulo de 3-HPA, após 24 h, ficou praticamente estável entre 9,0 e 9,5  $\text{mmol L}^{-1}$ , muito próximo do valor máximo (7,5  $\text{mmol L}^{-1}$ ) observado nos experimentos de Hao et al. (2008).

Em relação aos experimentos da seção 5.4, a disponibilidade de oxigênio foi limitada, visto que, os frascos foram lacrados e não tinham respiro. Nestes ensaios o acúmulo de 3-HPA alcançou o valor de 95  $\text{mmol L}^{-1}$ . Se pressupõe que este acúmulo deve inibir a enzima GDH como fora observado por Barbirato et al. (1996b), para *E. agglomerans*, em estudos sobre a fermentação em batelada de glicerol, com concentração inicial de substrato igual a 700 mM.

Ainda, de acordo com dados da base BRENDA (2010) a enzima PDOR, presente na *K. pneumoniae*, é fortemente inibida para concentrações de glicerol superiores a 40 g/L. Nos ensaios das seções 5.3 e 5.4 a concentração inicial de substrato foi de 75,6 g/L, ou seja muito superior ao valor indicado na base citada. Deste modo, o processo degradativo de glicerol foi limitado pelo desequilíbrio entre as velocidades de formação de 3-HPA, da



transformação deste em 1,3-propanodiol, e da transformação de glicerol em DHA. Esse desequilíbrio foi atenuado pela troca de oxigênio que aconteceu através do respiro no caso dos ensaios da seção 5.3.

### 5.5 Comparação dos resultados obtidos com outros trabalhos científicos

A Tabela 19 apresenta uma comparação entre os dados de rendimento obtidos em diversos trabalhos científicos e os resultados do presente trabalho.

O rendimento da cepa isolada, aqui denominada de Mig, ficou em 39,6 % quando o substrato foi glicerina bruta, enquanto atingiu 42,9 % quando se utilizou glicerol padrão PA. As cepas NRCC 3006, Lin e DSM 2026 tiveram rendimentos de 41 %, 44 % e 54,1 %, respectivamente, contudo nos experimentos foi utilizado glicerol PA.

Para as cepas NRRL B-199 e YMU1 o rendimento foi de 36,3 % e 38,7 %, respectivamente, neste caso também foi utilizado como substrato glicerol padrão PA.

Diferente das cepas testadas por Homman et al. (1990) e Zhang et al. (2009) a quantidade de 2,3-butanodiol produzida é significativa.

Quando os dados obtidos nas seções anteriores foram comparados com aqueles que Zeng et al. (1994) obtiveram para *K. pneumoniae* se verifica que a bactéria isolada neste trabalho teve comportamento similar àquele descrito para condições de excesso de substrato. Assim, os principais produtos foram 1,3-propanodiol, formato, 2,3-butanodiol, lactato e acetato, sendo produzidas quantidades muito pequenas de etanol.

Deste modo, se pode afirmar que a cepa isolada neste trabalho e denominada Mig teve desempenho similar ao observado para outras cepas de *K. oxytoca* e mesmo de *K. pneumoniae*.

Tabela 19 – Comparação dos dados de rendimento de 1,3-propanodiol de diversos trabalhos publicados

Cepa	Condições experimentais	Produtos formados (mol/mol de glicerol consumido)					Biomassa (g/L)	Rendimento 1,3-propanodiol (mol/100 mol de glicerol)
		1,3-Propanodiol	Etanol	Acetato	Lactato	2,3-Butanodiol		
<i>K. oxytoca</i> Mig - Ensaio 2KS	Temperatura 37 °; pH tamponado em 7,4; tempo de fermentação 36 h, [GLY] <sub>ini</sub> = 0,820 mol/L	0,396	0,010	0,060	0,024	0,114	1,47	39,60
<i>K. oxytoca</i> Mig - Ensaio nº 7	Temperatura 37 °; pH tamponado em 7,4; tempo de fermentação 36 h, [GLY] <sub>ini</sub> = 0,820 mol/L	0,429	0,008	0,096	0,045	0,089	1,46	42,90
<i>K. oxytoca</i> NRCC 3006 (HOMMAN et al., 1990)	Temperatura 37 °; pH controlado em 7,0; tempo de fermentação 25 h, [GLY] <sub>ini</sub> = 0,543 mol/L	0,410	0,184	0,125	0,059	—	3,00	41,00
<i>K. oxytoca</i> Lin (HOMMAN et al., 1990)	Temperatura 32 °; pH controlado em 7,0; tempo de fermentação 20 h, [GLY] <sub>ini</sub> = 0,543 mol/L	0,440	0,180	0,081	0,041	—	2,10	44,00
<i>K. oxytoca</i> YMU1 (ZHANG et al., 2009)	Temperatura 35 °; pH controlado em 7,0; tempo de fermentação 12 h, [GLY] foi mantida entre 10 - 30 g/L	0,387	0,096	0,056	0,032	—	0,92	38,70
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026 (HOMMAN et al., 1990)	Temperatura 37 °; pH controlado em 7,0; tempo de fermentação 12 h, [GLY] <sub>ini</sub> = 0,543 mol/L	0,541	0,042	0,162	0,059	—	3,50	54,10
<i>K. oxytoca</i> NRRL B-199 (GALDEANO et al., 2008)	Temperatura 30 °; pH tamponado em 7,0; tempo de fermentação 12 h, [GLY] <sub>ini</sub> = 0,434 mol/L	0,363	—	—	—	—	—	36,30

## 6. PRINCIPAIS CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de seleção proposto neste trabalho com o objetivo de isolar microrganismos com capacidade de fermentar glicerol se mostrou adequado e eficiente no caso da amostra de solo. Assim, foi identificada uma cepa de *Klebsiella oxytoca* com níveis de rendimento de 1,3-propanodiol comparáveis aos citados na literatura. Os principais produtos formados foram 1,3-propanodiol, formato, 2,3-butanodiol, lactato e acetato, sendo produzidas quantidades muito pequenas de etanol e o rendimento de 1,3-propanodiol alcançando 42,90 % e 39,60 %, para glicerol padrão PA e glicerina bruta, respectivamente, para 80 g L<sup>-1</sup> iniciais de glicerol.

No decorrer desta pesquisa foi assinalada a importância do estudo das variáveis que influenciam o desenvolvimento bacteriano na obtenção de um rendimento maior de 1,3-propanodiol. Assim, determinou-se que o pH 7,4 e a ureia como fonte de nitrogênio contribuem para a obtenção de um maior consumo de glicerol e um maior rendimento de 1,3-propanodiol. Contudo, não basta apenas ajustar o pH, pois os melhores resultados foram obtidos para meios tamponados. Além disso, a triptona tem efeito negativo sobre o consumo de glicerol.

A maior velocidade de produção de 1,3-propanodiol ocorreu durante a fase logarítmica de crescimento, tanto para glicerol PA (5,67 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), quanto para glicerina bruta (5,28 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). A produção de etanol foi baixa (0,15 g L<sup>-1</sup>) quando o CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> não foram retirados do meio fermentativo, porém a análise dos produtos mostrou que ao se remover os gases formados pela fermentação houve um aumento na produção de etanol. A degradação de formato está ligada ao processo de regeneração de NADH. Contudo, o mecanismo de consumo do hidrogênio formado a partir do formato não foi completamente esclarecido. Este mecanismo funciona como uma alternativa de manutenção do equilíbrio de redox do sistema e foi mais ativo na etapa final da fase logarítmica de crescimento ou na fase estacionária.

Destaca-se, aqui também, que apesar desta pesquisa não ter sido focada no estabelecimento dos parâmetros operacionais para execução de experimentos em biorreatores, mas sim na identificação das variáveis que influenciam o processo fermentativo, os resultados alcançados estabelecem as bases para o delineamento de um planejamento experimental deste processo em uma escala maior.

A totalidade dos resultados alcançados com este trabalho possibilitou a comprovação da tese de que o desequilíbrio entre as reações do braço oxidativo e redutivo

da degradação de glicerol conduziram ao acúmulo de 3-HPA e a interrupção do crescimento bacteriano. Este fenômeno se deve provavelmente a uma elevada atividade *in vivo* da enzima GDHt quando comparada às outras enzimas constituintes do regulon *dha*, sob as condições experimentais utilizadas. Os dados também indicaram que este descompasso pode ser diminuído pela manutenção de condições microaeróbias no meio fermentativo.

O mecanismo de regeneração de NADH presente na bactéria *Klebsiella oxytoca* parece não estar restrito a uma única direção de fluxo deste componente (formação da forma reduzida ou oxidada) nas reações catalisadas pelas enzimas GDH (braço oxidativo) e PDOR (braço redutivo), pois os dados indicam que o microrganismo consumiu H<sub>2</sub> parcialmente para regenerar NADH. Esta parece ser uma alternativa metabólica de compensação para estabilizar ou diminuir a concentração de 3-HPA.

Adicionalmente aos relevantes resultados já citados, destaca-se que a introdução das novas metodologias e técnicas utilizadas neste trabalho, abrem novos horizontes para as pesquisas na área de bioprocessos do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá e simultaneamente se cria um novo grupo de pesquisa junto à Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O ferramental operacional (microbiologia) e de apoio (uso de bases informatizadas internacionais), e a bagagem teórica ligada a este trabalho, consolidam uma nova visão na busca de soluções tecnológicas para o aproveitamento da biomassa proveniente do processo de obtenção de biodiesel.

## 7. PROPOSIÇÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

Poderiam ser adotadas quatro linhas de pesquisa que utilizem os dados obtidos no presente trabalho:

- a primeira delas pode ter como objetivo principal elucidar os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de degradação de glicerol sob condições microaeróbias.
- a segunda linha de trabalho teria como objetivo o ajuste dos parâmetros de processo em um reator batelada de bancada.
- a terceira linha de pesquisa seria direcionada à seleção de novas cepas produtoras de 1,3-propanodiol a partir de glicerol.
- A quarta linha seria focada na análise do fluxo de carbono (Engenharia metabólica) ou análise de modos elementares.

No primeiro caso seria necessário determinar, além do perfil de produtos, a evolução dos componentes  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADH}$ ,  $\text{ADP}$  e  $\text{ATP}$ , assim como as atividades das enzimas GDHt, PDOR, GDH, DHA quinase, glicerol quinase, G3PDH ao longo do processo fermentativo para diversas concentrações de substrato. Neste sentido também seria interessante elucidar o motivo pelo qual a ureia tem efeito positivo no consumo do substrato. Esta linha de pesquisa contribuiria ao entendimento dos mecanismos de degradação e controle do processo fermentativo de glicerol pela bactéria *Klebsiella oxytoca*.

Na segunda opção, o foco seria determinar as condições ótimas de concentração de substrato, aeração e concentração de ureia que conduzam a uma produção máxima de 1,3-propanodiol. Este tipo de enfoque é possível, pois os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que o rendimento de 1,3-propanodiol é função destas variáveis, e o meio de fermentação proposto sustenta a viabilidade do microrganismo isolado como produtor desse componente. Esta linha de trabalho poderá contribuir com a obtenção dos parâmetros empíricos para a produção de 1,3-propanodiol em pequena escala, visando estudos posteriores para a aplicação industrial.

Na última linha de pesquisa os conhecimentos adquiridos neste trabalho seriam utilizados para isolar e identificar cepas provenientes de outras fontes com potencial de degradação de glicerol. Neste caso a busca teria como objetivo identificar cepas com melhor potencial de rendimento de 1,3-propanodiol.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAD-ANDALOUSSI, S. et al. “Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431”. **Journal of Applied Microbiology** (1998), vol. 84, n. 4, pp. 515 – 522.
2. ABELES, R. H.; BROWNSTEIN, A. M.; RANGLES, C. H. “ $\beta$ -Hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*”. **Biochimica et Biophysica Acta** (1960), vol. 41, pp. 530 - 531.
3. AHRENS, K. et al. “Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation”. **Biotechnology and Bioengineering** (1998), vol. 59, n. 5, pp. 544 – 552.
4. ANP – Agência Nacional de Petróleo. **Boletim Mensal de Biodiesel**. Dezembro/2010. Disponível em: [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br) Acesso em: 10/01/2011.
5. AXELSSON, L. T. et. al. “Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*”. **Microbial Ecology in Health and Disease** (1989), vol. 2, n. 2, pp. 131 – 136.
6. BAGRAMYAM, K. et al. “The roles of hydrogenases 3 and 4, and the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, in H<sub>2</sub> production by *Escherichia coli* at alkaline and acidic pH”. **FEBS Letters** (2002), vol. 516, n. 1-3, pp. 172 – 178.
7. BARBIRATO, et al. “Uncoupled glycerol distribution as the origin of the accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during the fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210”. **Biotechnology and Bioengineering** (1998), vol. 58, n. 2-3, pp. 303 – 305.
8. BARBIRATO, F. et al. “3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species”. **Applied and Environmental Microbiology** (1996a), vol. 62, n. 4, pp. 1448 – 1451.

9. BARBIRATO, F. et al. "Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitations and regulations". **Microbiology** (1997b), vol. 143, n. 7, pp. 2423 – 2432.
10. BARBIRATO, F. et al. "Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*". **Applied Microbiology and Biotechnology** (1995), vol. 43, n. 5, pp. 786 – 793.
11. BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. "Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates". **Applied Microbiology and Biotechnology** (1997a), vol. 47, n. 4, pp. 441 - 446.
12. 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** (1996b), vol. 62, n. 12, pp. 4405 – 4409.
13. BARBIRATO, F.; BORIES, A. "Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions". **Research in Microbiology** (1997), vol. 148, n. 6, pp. 475 - 484.
14. BAUER, R.; TOIT, M.; KOSSMANN, J. "Influence environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSZM 20016 and its accumulation by wine *Lactobacilli*". **International Journal of Food Microbiology** (2010), vol. 137, n. 1, pp. 28 – 31.
15. BEHR, A. et al. "Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol". **Green Chemistry** (2008), vol. 10, n. 1, pp. 13 – 30.
16. BIEBL, H. "Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* — batch and continuous culture studies". **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** (2001), vol. 27, n. 1, pp. 18 – 26.

17. BIEBL, H. et al. "Microbial production of 1,3-propanediol". **Applied Microbiology and Biotechnology** (1999), vol. 52, n. 3, pp. 289 - 297.
18. BOENIGK, R.; BOWIEN, S; GOTTSCHALK, G. "Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*". **Applied Microbiology and Biotechnology** (1993), vol. 38, n. 4, pp. 453 – 457.
19. BOUVET, O. M. M. et al. "Phenotypic diversity of anaerobic glycerol dissimilation shown by seven enterobacterial species". **Research in Microbiology** (1994), vol. 145, n. 2, pp.129 - 139.
20. BOUVET, O. M. M. et al. "Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the *Enterobacteriaceae*". **Research in Microbiology** (1995), vol. 146, n. 4, pp. 279 – 290.
21. BRAAK, H. R. **Onderzoekingen over Vergisting van glycerine**. 1928. 233 f. Thesis. Delft University of Thechnology, Holland (1928).
22. BRENDA. **The Comprehensive Enzyme Information System**. Disponível em: <http://www.brenda-enzymes.org/index.php4>. Consultado em: 01/2010.
23. CAMERON, D. C. et al. "Metabolic engineering of propanediol pathways". **Biotechnology Progress** (1998), vol. 14, n. 1, pp. 116 - 125.
24. CANTONI, C.; MOLNAR, M. R. "Investigations on the glycerol metabolism of *Lactobacilli*". **The Journal of Applied Bacteriology** (1967), vol. 30, n. 1, pp. 197 - 205.
25. CARROLL, K. C. *et. al.* "Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterobacteriaceae*". **Journal of Clinical Microbiology** (2006), vol. 44, n. 10, pp. 3506 – 3509.
26. CHEN, H.; FANG, B.; HU, Z. "Simultaneous HPLC determination of four key metabolites in the metabolic pathway for production of 1,3-propanediol from glycerol". **Chromatographia** (2007), vol. 65, n. 9-10, pp. 629-632.



27. CHEN, J-W; WU, W-T. "Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification". **Journal of Bioscience and Bioengineering** (2003), vol. 95, n. 5, pp. 466 - 469.
28. CHEN, Z. et al. "Cell physiology and metabolic flux response of *Klebsiella pneumoniae* to aerobic conditions". **Process Biochemistry** (2009), vol. 44, n. 8, pp. 862 -868.
29. CHI, L. **The production of methyl esters from vegetable oil/fatty acid mixtures**. 1999. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas) – Departamento de Engenharia Química e Química Aplicada. University of Toronto. Canadá.
30. CLAISSE, O. e LONVAUD-FUNEL, A. "Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider". **Food Microbiology** (2000), vol. 17, n. 5, pp. 513 – 519.
31. CNPE – Conselho Nacional de Política Energética. **Resolução 06/09**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 26 de outubro de 2009, seção 1, p. 16.
32. CAEAT – Conselho de Altos Estudos e Avaliação Tecnológica. **Biodiesel a a inclusão social**. Brasília: Câmara do Deputados, Coordenação de Publicações, 2003.
33. DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. "Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*". **Applied and Environmental Microbiology** (1992), vol. 58, n. 4, pp. 1233 – 1239.
34. DANIEL, R.; BOBIK, T. A.; GOTTSCHALK, G. "Biochemistry of coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes". **FEMS Microbiology Reviews** (1999), vol. 22, n. 5, pp. 553 -566.
35. DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. "Growth temperature-dependent activity of glycerol dehydratase in *Escherichia coli* expressing the *Citrobacter freundii* *dha* regulon". **FEMS Microbiology Letters** (1992), vol 100, n. 1-3, pp. 281 –

285.

36. DANIEL, R.; STUERTZ, K.; GOTTSCHALK, G. "Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*". **Journal of Bacteriology** (1995), vol. 177, n. 5, pp. 4392 - 4401.
37. DEMIRBAS, A. "Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections". **Energy Conversion and Management** (2008), vol. 49, n. 8, pp. 2106 - 2116.
38. DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. "Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering". **Biotechnology and Bioengineering** (2006), vol. 94, n. 5, pp. 821 - 829.
39. DOLEYRES, Y. *et al.* "Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*". **Applied Microbiology and Biotechnology** (2005), vol. 68, n. 4, pp. 467 - 474.
40. DU, C. *et al.* "Use of oxidoreduction potential as an indicator to regulate 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*". **Applied Microbiology and Biotechnology** (2006), vol. 69, n. 5, pp. 554 -563.
41. EBB – European Biodiesel Board. **Statistics**. Disponível em: <http://www.ebb-eu.org/stats.php> Consultado em: 20/10/2008.
42. EL-ZINEY *et. Al.* "Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures". **Biotechnology Letters** (1998), vol. 20, n. 10, pp. 913 - 916.
43. ERNI, B. *et al.* "Small substrate, big surprise: fold, function and phylogeny of dihydroxyacetone kinase". **Cellular and Molecular Life Sciences** (2006), vol. 63, pp. 890 - 900.
44. EVEN, S *et al.* "Pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* is dependent upon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity". **Metabolic Engineering**

- (1999), vol. 1, n. 3, pp. 198 - 205.
45. FEATHERSTONE, A. M.; WOOLVERTON, M. W. “Biofuels production in the United States”. **New Zealand Journal of Primary Industry Management** (2007), vol. 10, pp. 7 – 11. Disponível em: [http://www.agmanager.info/events/risk\\_profit/2007/papers.asp](http://www.agmanager.info/events/risk_profit/2007/papers.asp) Consultado em: 15/09/2008.
  46. FERRARI, R. A.; SILVA, V. S.; SCABIO, A. “Biodiesel de soja — taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia”. **Química Nova** (2005), vol. 28, n. 1, pp. 19 – 23.
  47. FORAGE, R. G. e LIN, E. C. C. “*dha* System mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418”. **Journal of Bacteriology** (1982), vol. 151, n. 2, pp. 591-599.
  48. FORSBERG, C. W. “Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and Other *Clostridium* Species”. **Applied and Environmental Microbiology** (1987), vol. 53, n. 4, p. 639 – 643.
  49. FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. **Wine microbiology – Practical applications and procedures**. 2ª Ed. New York: Springer, 2007, pp. 176 - 177.
  50. FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. “Biodiesel fuel production by transesterification of oils”. **Journal of Bioscience and Bioengineering** (2001), vol. 92, n. 5, pp. 405 - 416.
  51. GALDEANO, C. et al. “Glycerol fermentation to 1,3-propanediol by *Klebsiella oxytoca* NRRL B-199: study of the inhibition of the final products of both the oxydative and the reductive routes”. In: **Industrial Biotechnology International Conference**, Napoles, 2008. Disponível em: [www.aidic.it/IBIC2008/webpapers/97Galdeano.pdf](http://www.aidic.it/IBIC2008/webpapers/97Galdeano.pdf). Consultado em: 03/02/2010.
  52. GARAI-IBABE, G. et. al. “Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking”. **International Journal of Food**

- Microbiology** (2008), vol. 121, n. 3, pp. 253 – 261.
53. GARRIGUES, C. et al. “Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio”. **Journal of Bacteriology** (1997), vol. 179, n.17, pp. 5282 – 5287.
54. GERPEN, J. V. “Biodiesel processing and production”. **Fuel Processing Technology** (2005), vol. 86, n. 10, pp. 1097-1107.
55. GHESTI, G. F. **Estudo de catalisadores para obtenção de biodiesel por transesterificação e determinação do rendimento por espectroscopia Raman**. 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química/UNB. Brasília/DF.
56. GIRBAL, L. e SOUCAILLE, P. “Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool”. **Journal of Bacteriology** (1994), vol. 176, n. 21, pp. 6433 - 6438.
57. GIRBAL, L. et al. “Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824”. **FEMS Microbiology Reviews** (1995), vol. 17, n. 3, pp. 287 – 297.
58. GONZÁLEZ-PAJUELO, M. et al. “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** (2006), vol. 72, n. 1, pp. 96 –101.
59. GUNSALUS, I. C. “Products of anaerobic glycerol fermentation by *Streptococci faecalis*”. **Journal of Bacteriology** (1947), vol. 54, n. 2, pp. 239 – 244.
60. HAKOBYAN, M.; SARGSYAN, H.; BAGRAMYAM, K. “Proton translocation coupled to formate oxidation in anaerobically grown fermenting *Escherichia coli*”. **Biophysical Chemistry** (2005), vol. 115, n. 1, pp. 55– 61.

61. HAO, J. et al. "Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions". **World Journal of Microbiology & Biotechnology** (2008), vol. 24, n. 9, pp. 1731 – 1740.
62. HEYNDRICKX, M. et al. "The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212<sub>t2</sub> and 1213<sub>t1</sub> and *C. pasteurianum* LMG 3285". **Applied Microbiology and Biotechnology** (1991), vol. 34, n. 5, pp. 637 – 642.
63. HIMMI, E. H. et al. "Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii*". **Applied Microbiology and Biotechnology** (2000), vol. 53, n. 4, pp. 435 - 440.
64. HOMANN, T. et al. "Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains". **Applied Microbiology and Biotechnology** (1990), vol. 33, n. 2, pp. 121 – 126.
65. HONGWEN, C.; BAISHAN, F.; ZONGDING, H. "Optimization of process parameters for key enzymes accumulation of 1,3-propanediol production from *Klebsiella pneumoniae*". **Biochemical Engineering Journal** (2005), vol. 25, n. 1, pp. 47 - 53.
66. IEA - INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Biofuels for transport: an international perspective**. Paris: IEA/EET, 2004. Disponível em: [www.iea.org/textbase/nppdf/free/2004/biofuels2004.pdf](http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2004/biofuels2004.pdf). Consultado em: 19/08/2007.
67. ISO, M. et al. "Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase". **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** (2001), vol. 16, n. 1, pp. 53 - 58.
68. ITO, T. et al. "Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process". **Journal of Bioscience and Bioengineering** (2005), vol. 100, n. 3, pp. 260 - 265.
69. JARVIS, G. N.; MOORE, E. R.; THIELE, J. H. "Formate and ethanol are the

- major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer”. **Journal of Applied Microbiology** (1997), vol. 83, n. 2, pp. 166 – 174.
70. JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. “The glycerin glut: options for to value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production”. **Environmental. Progress** (2007), vol. 26, n. 4, pp. 338 – 348.
71. JOHNSON, E. A.; LEVINE, R. L.; LIN, E. C. C. “Inactivation of glycerol dehydrogenase of *Klebsiella pneumoniae* and the role of divalent cations”. **Journal of Bacteriology** (1985), vol. 164, n. 1, pp. 479 – 483.
72. KIM, H-J. et al. “Transesterification of vegetable oil to biodiesel using heterogeneous base catalyst”. **Catalysis Today** (2004), vol. 93-95, pp. 315 - 320.
73. KOCH, J. P.; HAYASHI, S-I; LIN, E. C. C. “The control of dissimilation of glycerol and L-glycerophosphate in *Escherichia coli*”. **The Journal of Biological Chemistry** (1964), vol. 239, n. 9, pp. 3106 -3108.
74. KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J. “Lactic acid bacteria”. In: Eds. König, H.; Uden, G.; Fröhlich, J. **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine** – 1<sup>a</sup> Ed., Cap. 1, pp. 7 – 10, Berlin: Springer, 2009.
75. KREBS, H. A. e EGGLESTON, L. V. “Biological synthesis of oxaloacetic acid from pyruvic acid and carbon dioxide”. **Biochemical Journal** (1941), vol. 35, n. 5-6, pp. 676 –687.
76. KRIEG, N. R. (Editor). **BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology**. Vol 1. 1<sup>a</sup> Ed. BALTIMORE: Williams & Wilkins , 1984.
77. LEE, P. C. et al. “Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source”. **Biotechnology and Bioengineering** (2001), vol. 72, n. 1, pp. 41 - 48.
78. LEONHARTSBERGER, S.; KORSA, I.; BÖCK, A. “The molecular biology

- of formate metabolism in enterobacteria". **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology** (2002), vol. 4, n. 3, pp. 269 – 276.
79. LIN, E. C. C. "Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria". **Annual Review of Microbiology** (1976), vol. 30, pp. 535 - 578.
80. LIN, E. C. C.; LEVIN, A. P.; MAGASANIK, B. "The effect of aerobic metabolism on the inducible glycerol dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*". **The Journal of Biological Chemistry** (1960), vol. 235, n. 6, pp. 1824 – 1829.
81. LIN, E. C. C. e MAGASANIK, B. "The activation of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by monovalent cations". **The Journal of Biological Chemistry** (1960), vol. 235, n. 6, pp. 1820 – 1823.
82. LUERS, F. et al. "Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase". **FEMS Microbiology Letters** (1997), vol. 154, n. 2, pp. 337 – 345.
83. LÜTHI-PENG, Q.; DILEME, F. B.; PUHAN, Z. "Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*". **Applied Microbiology and Biotechnology** (2002b), vol. 59, n. 2-3, pp. 289 – 296.
84. LÜTHI-PENG, Q.; SCHÄRER, S.; PUHAN, Z. "Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*". **Applied Microbiology and Biotechnology** (2002a), vol. 60, n. 1-2, pp. 73 – 80.
85. MA, F. e HANNA, M. A. "Biodiesel production: a review". **Bioresource Technology** (1999), vol. 70, n. 1, pp. 1 - 15.
86. MACEDO, G. A. e MACEDO J. A. "Biodiesel". **Biocnologia: Ciência & Desenvolvimento** (2004), n. 32, p. 38 – 46. Brasília: KL3 Publicações Ltda. Disponível em: <http://www.biocnologia.com.br> Consultado em: 30/09/2006.
87. MACIS, L.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. "Properties and sequence of the coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium*

- pasteurianum*". **FEMS Microbiology Letters** (1998), vol. 164, n. 1, pp. 21 - 28.
88. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, 2004, pp. 26-27, 106-122 e 191 - 205.
89. MAEDA, T.; SANCHEZ-TORRES, V.; WOOD, T. K. "Escherichia coli hydrogenase 3 is a reversible enzyme possessing hydrogen uptake and synthesis activities". **Applied Microbiology and Biotechnology** (2007), vol. 76, n. 5, pp. 1035 -1042.
90. MAGASANIK, B.; BROOKE, M. S.; KARIBIAN, D. "Metabolic pathways of glycerol dissimilation - A comparative study of two strains of *Aerobacter aerogenes*". **Journal of Bacteriology** (1953), vol. 66, n. 5, pp. 611 – 619.
91. MAGNUSSON, J. **Antifungal activity of lactic acid bacteria**. PhD Thesis, Agraria 397, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2003.
92. MAKAROVA, K. *et. al.* "Comparative genomics of the lactic acid bacteria". **PNAS** (2006), vol. 103, n. 42, pp. 15611 – 15616.
93. MALAOUI, H; MARCZAK, R. "Separation and characterization of the 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D". **Journal of Applied Microbiology** (2001), vol. 90, n. 6, pp. 1006 - 1014.
94. MARTÍN, R. *et. al.* "Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese". **International Journal of Food Microbiology** (2005), vol. 104, n. 3, pp. 267 – 277.
95. MCGREGOR, W. G.; PHILLIPS, J.; SUELTER, C. H. "Purification and kinetic characterization of a monovalent cation-activated glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes*". **The Journal of Biological Chemistry** (1974), vol 249, n. 10, pp. 3132 – 3139.
96. MENOZZI, R. G. . *et. al.* "Two-center collaborative evaluation of



- performance of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacteria". **Journal of Clinical Microbiology** (2006), vol. 44, n. 11, pp. 4085 – 4094.
97. MENZEL, K. et al. "Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: IV Enzymes and fluxes of pyruvate metabolism". **Biotechnology and Bioengineering** (1998), vol. 60, n. 5, pp. 617 - 626.
98. MENZEL, K.; ZENG, A-P; DECKWER, W-D. "Enzymatic evidence for an involvement of pyruvate dehydrogenase in the anaerobic glycerol metabolism of *Klebsiella pneumoniae*". **Journal of Biotechnology** (1997), vol. 56, n. 2, pp. 135 - 142.
99. MICKELSON, M. N., WERKMAN, C. H. "The dissimilation of glycerol by *Coli-aerogenes* intermediates". **Journal of Bacteriology** (1940), vol. 39, n. 6, pp. 709 - 715.
100. MILLS, D. E.; BAUGH, W. D.; CONNER, H. A. "Studies on the formation of acrolein in distillery mashes". **Applied Microbiology** (1954), vol. 2, n. 1, pp. 9 - 13.
101. MNATSAKANYAN, N.; BAGRAMYAN, K.; TRCHOUNIAN, A. "Hydrogenase 3 but not Hydrogenase 4 is major in hydrogen gas production by *Escherichia coli* formate hydrogenlyase at acidic pH and in the presence of external formate". **Cell Biochemistry and Biophysics** (2004), vol. 41, n. 3, pp. 357 -365.
102. MORITA, H et. al. "Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production". **DNA Research** (2008), vol. 15, n. 3, pp. 151 – 161.
103. MURPHY, M. G. et. al. "Oxygen dependent lactate utilization by *Lactobacillus plantarum*". **Archives of Microbiology** (1985), vol. 141, n. 1, pp. 75 - 79.

104. MURPHY, M. G.; CONDON, S. "Correlation of oxygen utilization and hydrogen peroxide accumulation with oxygen induced enzymes in *Lactobacillus plantarum* cultures". **Archives of Microbiology** (1984), vol. 138, n. 1, pp. 44 - 48.
105. NAKANISHI, K. *et al.* "Screening of lactic acid bacteria having the ability to produce reuterin". **Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria** (2002), vol. 13, n. 1, pp. 37 – 45.
106. NAKAS, J. P. *et al.* "System development for linked-fermentation production of solvents from algal biomass". **Applied and Environmental Microbiology** (1983), vol. 46, n. 5, pp. 1017 – 1023.
107. NEIJSEL, O. M. *et al.* "Dual pathways of glycerol assimilation in *Klebsiella aerogenes* NCIB 418: their regulation and possible functional significance". **Archives of Microbiology** (1975), vol.104, n. 1, pp. 83 – 87.
108. NELSON, D. L. e COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3ª edição. São Paulo: Editora Sarvier, 2002.
109. NÉMETH, A.; SEVELLA, B. "Development of a new bioprocess for production of 1,3-propanediol I.: modeling of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol with *Klebsiella pneumoniae* enzymes". **Applied Biochemistry and Biotechnology** (2008), vol. 144, n. 1, pp. 47 – 58.
110. NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. "Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil". **Bioresource Technology** (2005), vol. 96, n. 7, pp. 769 - 777.
111. O'HARA, C. "Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST System and NID Panel for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and commonly isolated nonenteric Gram-negative *Bacilli*". **Journal of Clinical Microbiology** (2006), vol. 44, n. 3, pp. 928 – 933.
112. PACHAURI, N.; HE, B. "Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities". In: **2006 ASABE**

**Annual International Meeting.** Paper Number: 066223. Disponível em: [www.webpages.uidaho.edu/~bhe/pdfs/asabe066223.pdf](http://www.webpages.uidaho.edu/~bhe/pdfs/asabe066223.pdf) Consultado em: 09/09/2007.

113. PAPANIKOLAOU, S. et al. “*Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol”. **Journal of Applied Microbiology** (2002), vol.92, n. 4, pp. 737 – 744.
114. PAPANIKOLAOU, S.; FICK, M.; AGGELIS, G. “The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*”. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** (2004), vol.79, n. 11, pp. 1189-1196.
115. PASTERIS, S. E. e STRASSER de SAAD, A. M. “Characterization of glycerol kinase and NAD-independent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Pediococcus pentosaceus* N5p”. **Letters in Applied Microbiology** (1998), vol. 27, pp. 93 - 97.
116. PASTERIS, S. E.; STRASSER DE SAAD, A. M. “Aerobic glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine”. **Food Microbiology** (2005), vol. 22, n. 5, pp. 399 - 407.
117. PASTERIS, S. E.; STRASSER DE SAAD, A. M. “Enzymatic activities involved in glycerol utilization by *Pedicoccus pentosaceus* from Argentinian wine”. **Microbiologie, Aliments, Nutrition** (1997), vol. 15, n. 2, pp. 139 – 145.
118. PASTERIS, S. E.; STRASSER DE SAAD, A. M. “Sugar-glycerol cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** (2009), vol. 57, n. 9, pp. 3853 – 3858.
119. PERETÓ, J.; LÓPEZ-GARCIA, P.; MOREIRA, D. “Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution”. **Trends in Biochemical Sciences** (2004), vol. 29, n. 9, pp. 469 – 477.
120. PFLUGMACHER, U.; GOTTSCHALK, G. “Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*”.

- Applied Microbiology and Biotechnology** (1994), vol. 41, n. 3, pp. 313 – 316.
121. PYLE, D. J. **Use of biodiesel-derived crude glycerol for the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids by the microalga *Schizochytrium limacinum***. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas Biológicos). Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, VA.
122. REDWOOD, M. D. et al. “Dissecting the roles of *Escherichia coli* hydrogenases in biohydrogen production”. **FEMS Microbiology Letters** (2008), vol. 278, n. 1, pp. 48 – 55.
123. REIMANN, A. et al. “1,3-Propanediol formation with product-tolerant mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 in continuous culture: productivity, carbon and electron flow”. **Journal of Applied Microbiology** (1998), vol. 84, n. 6, pp. 1125 – 1130.
124. ROYON, D. et al. “Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent”. **Bioresource Technology** (2007), vol 98, n. 3, pp. 648 - 653.
125. RUCH, F. E. et al. “*In vivo* inactivation of glycerol dehydrogenase in *Klebsiella aerogenes*: properties of active and inactivated proteins”. **Journal of Bacteriology** (1980), vol. 141, n. 3, pp. 1077 – 1085.
126. RUCH, F. E.; LIN, E. C. C. “Independent constitutive expression of the aerobic and anaerobic pathways of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*”. **Journal of Bacteriology** (1975), vol. 124, n. 1, pp. 348 - 352.
127. RUCH, F. E.; LENGELER, J.; LIN, E. C. C. “Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*”. **Journal of Bacteriology** (1974), vol. 119, n. 1, pp. 50 – 56.
128. RUSH, D. et al. “Pathways of glycerol dissimilation in two strains of *Aerobacter aerogenes*: enzymatic and tracer studies”. **The Journal of**

- Biological Chemistry** (1957), vol. 226, n. 2, pp. 891 - 899.
129. RUZHEINIKOV, S. N. et al. "Glycerol dehydrogenase: structure, specificity, and mechanism of a family III polyol dehydrogenase". **Structure** (2001), vol. 9, n. 9, pp. 789 - 802.
130. SAINT-AMANS, S. S. et al. "Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures". **Journal of Bacteriology** (2001), vol. 183, n. 5, pp. 1748 – 1754.
131. SALADO, A. I. C.; STRASSER DE SAAD, A. M. "Glycerol utilization by *Pedococcus pentosaceus* from Argentinian wine". **Microbiologie, Aliments, Nutrition** (1995), vol. 13, pp. 319 – 325.
132. SAMUKAWA, T. et al. "Pretreatment of immobilized *Candida Antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil". **Journal of Bioscience and Bioengineering** (2000), vol. 90, n. 2, pp. 180 - 183.
133. SAUVAGEOT, N. et al. "Characterization of the diol dehydratase *pdu* operon of *Lactobacillus collinoides*". **FEMS Microbiology Letters** (2002a), vol. 209, n. 1, pp. 69 -74.
134. SAUVAGEOT, N. et al. "Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein". **International Journal of Food Microbiology** (2000), vol. 55, n. 1-3, pp. 167 - 170.
135. SAUVAGEOT, N. et al. "Purification, characterization and subunits identification of the diol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*". **European Journal of Biochemistry** (2002b), vol. 269, n. 22, pp. 5731 – 5737.
136. SAWERS, R. G. "Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*". **Biochemical Society Transactions** (2005), vol. 33, n. 1, pp. 42 – 46.
137. SCHLEGEL, H. G.; JANNASCH, H.W. "Prokaryotes and their habitats". In: Editores: Starr, M. R.; Stolp, H.; Trüper, H.G. et al. **The Prokaryotes**. Volume 11, pp. 43-82. New York: Springer Verlag, 1981.

138. SCHUCHARDT, U.; SERCHELY, R.; VARGAS, R. M. “Transesterification of vegetable oils: a review”. **Journal of the Brazilian Chemical Society** (1998), vol. 9, no. 3, pp.199 - 210.
139. SCHUTZ, H.; RADLER, F. “Anaerobic reduction of glycerol to 1,3-propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*”. **Systematic and Applied Microbiology** (1984), vol. 5, n. 2, pp. 169 – 178.
140. SEIFERT, C. et al. “Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*”. **European Journal of Biochemistry** (2001), vol. 268, n. 8, pp. 2369 - 2378.
141. SELLENRIEK, P. et al. “Comparison of MicroScan Walk-Away®, Phoenix™ and VITEK-TWO® microbiology systems used in the identification and susceptibility testing of bacteria”. In: **105th General Meeting of the American Society for Microbiology**, Atlanta, 2005. Disponível em: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/whitepapers/lr900.pdf> Consultado em: 20/01/2010.
142. SERJAK, W. C. *et. al.*, “Acrolein production by bacteria found in distillery grain mashes”. **Applied Microbiology** (1954), vol. 2, n. 1, pp. 14 - 20.
143. SEYFRIED, M.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. “Cloning, sequencing, and overexpression of the genes encoding coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*”. **Journal of Bacteriology** (1996), vol. 178, n. 19, pp. 5793 - 5796.
144. SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. “Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology” **Biotechnology Advances** (2009), vol. 27, n. 1, pp. 30 – 39.
145. SILVEIRA, S. **Biofuels in Sweden – moving the sustainability agenda forward**. Material de apoio. Curso de combustíveis líquidos. UNICAMP, 2006.

146. SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J.; SMILEY, K. L. "Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol". **Applied and Environmental Microbiology** (1983), Vol. 46, n. 1, pp. 62 - 67.
147. SNYDER, J. W.; MUNIER, G. K.; JOHNSON, C. L. Direct Comparison of the BD Phoenix System with the MicroScan WalkAway System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Enterobacteriaceae* and Nonfermentative Gram-Negative Organisms. **Journal of Clinical Microbiology** (2008), vol. 46, n. 7, pp. 2327 – 2333.
148. SOBOLOV, M.; SMILEY, K. L. "Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *lactobacillus*". **Journal of Bacteriology** (1960), vol. 79, pp. 261 – 266.
149. SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. "Triglycerides-based diesel fuels". **Renewable and Sustainable Energy Reviews** (2000), vol. 4, n. 2, pp. 111 - 133.
150. STEELE, D. B. e STOWERS, M. D. "Techniques for selection of industrially important microorganism". In: **Annual Review of Microbiology** (1991), vol. 45, pp. 89 – 106.
151. STREEKSTRA, H. et al. "Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture". **Archives of Microbiology** (1987), vol. 147, n. 3, pp. 268 - 275.
152. SUN, J. et al. "Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria". **Biotechnology Progress** (2003), vol. 19, n. 2, pp. 263-272.
153. TALARICO, T. L. DOBROGOSZ, W. J. "Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*". **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** (1989), vol. 33, n. 5, pp. 674 – 679.
154. TALARICO, T. L. *et. al.* "Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by

- Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase". **Applied and Environmental Microbiology** (1990), vol. 56, n. 4, pp. 943 – 948.
155. TALARICO, T. L. *et al.*, "Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*". **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** (1988), vol. 32, n. 12, pp. 1854 – 1858.
156. TALARICO, T. L.; DOBROGOSZ, W. J. "Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*". **Applied and Environmental Microbiology** (1990), vol. 56, n. 4, pp. 1195 – 1197.
157. TANNOCK, G. W. *et al.* "Ecological behavior of *Lactobacillus reuteri* 100-23 is affected by mutation of the *luxS* gene". **Applied Microbiology and Biotechnology** (2005), vol. 71, n. 12, pp. 8419–8425.
158. TOBAJAS, M. *et al.* "Unstructured kinetic model for reuterin and 1,3-propanediol production by *Lactobacillus reuteri* from glycerol/glucose cofermentation". **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** (2009), vol. 84, n. 5, pp. 675 – 680.
159. TORAYA, T. "Radical catalysis of B12 enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases". **Cellular and Molecular Life Sciences** (2000), vol. 57, n. 1, pp. 106 – 127.
160. TORAYA, T. *et al.* "Coenzyme B12-dependent diol dehydratase: regulation of apoenzyme synthesis in *Klebsiella pneumoniae* (*Aerobacter aerogenes*) ATCC 8724". **Journal of Bacteriology** (1978), vol. 135, n. 2, pp. 726 – 729.
161. TORAYA, T. *et al.* "Substrate specificity of coenzyme B12-dependent diol dehydratase: glycerol as both a good substrate and a potent inactivator". **Biochemical and Biophysical Research Communications** (1976), vol. 69, pp. 475 – 480.
162. TORAYA, T.; FUKUI, S. "Immunochemical evidence for the difference between coenzyme-B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase". **European Journal of Biochemistry** (1977), vol. 76, n. 1, pp.



285 -289.

163. TORAYA, T.; KUNO, S.; FUKUI, S. “Distribution of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*”. **Journal of Bacteriology** (1980), vol. 141, n. 3, pp. 1439 – 1442.
164. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
165. TRCHOUNIAN, K.; TRCHOUNIAN A. “Hydrogenase 2 is most and hydrogenase 1 is less responsible for H<sub>2</sub> production by *Escherichia coli* under glycerol fermentation at neutral and slightly alkaline pH”. **International Journal of Hydrogen Energy** (2009), vol. 34, n. 21, pp. 8839 – 8845.
166. TYSON, K. S. et al. **Biomass oil analysis: research needs and recommendations**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Technical Report (2004), n. 510-34796, 116 p.
167. UniProtKB. UniProt Knowledgebase. Disponível em: <http://www.uniprot.org>  
Consultado em: 01/2010.
168. VANDAMME, P. et al. “Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics”. **Microbiology Review** (1996), vol. 60, n. 2, pp. 407–438.
169. VANDAR-SCHARA, G.; MAEDA, T.; WOOD, T. K. “Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation”. **Microbial Biotechnology** (2008), vol. 1, n. 2, pp 107 – 125.
170. VASCONCELOS, I.; GIRBAL, L.; SOUCAILLE, P. “Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol”. **Journal of Bacteriology** (1994), vol. 176, n. 5, pp. 1443 – 1450.
171. VEIGA da CUNHA, M.; FOSTER, M. A. “1,3-Propanediol :NAD<sup>+</sup> oxidoreductase of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*”.

- Applied and Environmental Microbiology** (1992b), vol. 58, n. 6, pp. 2005 – 2010.
172. VEIGA da CUNHA, M.; FOSTER, M. A. “Sugar-glycerol cofermentations in *lactobacilli*: the fate of lactate”. **Journal of Bacteriology** (1992a), vol. 174, n. 3, pp. 1013 – 1019.
173. VIZOSO PINTO, M. G; PASTERIS, S. E.; STRASSER DE SAAD, A. M. “Glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from beer”. **Food Microbiology** (2004), vol. 21, n. 1, pp. 111 – 118.
174. VOLLENWEIDER, S. et al. “Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** (2003), vol. 51, n. 11, pp. 3287 – 3293.
175. VOLLENWEIDER, S.; LACROIX, C. “3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production”. **Applied Microbiology and Biotechnology** (2004), vol. 64, n. 1, pp. 16 - 27.
176. WANG, W. et al. “Combined use of proteomic analysis and enzyme activity assays for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*”. **Biotechnology and Bioengineering** (2003), vol. 83, n. 5, pp. 525 – 536.
177. WERKMAN, C. H.; GILLEN, G. F. “Bacteria producing trimethylene glycol”. **Journal of Bacteriology** (1932), vol. 23, n. 2, pp. 167 - 182.
178. WILLKE, T.; VORLOP, K. “Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol”. **European Journal of Lipid Science and Technology** (2008), vol. 110, n. 9, pp. 831 - 840.
179. WOOD, H. G.; WERKMAN, C. H. “The utilisation of CO<sub>2</sub> in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria”. **The Biochemical Journal** (1936), vol. 30, n. 1, pp. 48 – 53.
180. XU, Y.; DU, W.; LIU, D. “Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate

- as the acyl acceptor". **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** (2005), vol. 32, n. 5-6, pp. 241 - 245.
181. YAMADA-ONODERA, K. et al. "Characterisation of glycerol dehydrogenase from a methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha* DI-1, and its gene cloning". **Acta Biotechnology** (2002), vol. 22, n. 3-4, pp. 337 - 353.
182. YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. "Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry". **Current Opinion in Biotechnology** (2007), vol. 18, n. 3, pp. 213 - 219.
183. ZAMUDIO-JARAMILLO, M. A. et al. "Reuterin production by *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 immobilized in alginate". **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** (2009), vol. 84, n. 1, pp. 100 – 105.
184. ZENG, A-P. et al. "Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation". **Biotechnology and Bioengineering** (1994), vol. 44, n. 8, p. 902 - 911.
185. ZENG, A-P.; MENZEL, K.; DECKWER, W. D. "Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture II: analysis of metabolic rates and pathways under oscillation and steady-state conditions". **Biotechnology and Bioengineering** (1996), vol. 52, n. 5, pp. 561 - 571.
186. ZENG, A-P. et al. "Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation". **Enzyme and Microbial Technology** (1993), vol. 15, n. 9, pp. 770 – 779.
187. ZHENG, Z-M. et al. "Statistical optimization of culture conditions for 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* AC 15 via central composite design". **Bioresource Technology** (2008), vol. 99, n. 5, pp. 1052 - 1056
188. ZHANG, Y. et al. "Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhance doxidative and reductive metabolism of

glycerol". **Metabolic Engineering** (2009), vol. 11, n. 2, pp. 101–106.

**ANEXO I – LAUDO DE ANÁLISES DA GLICERINA  
BRUTA**



São Simão-GO, 14 de setembro de 2009.

Universidade Estadual de Maringá  
Departamento de Engenharia Química  
Bloco D90. Laboratório 14  
Avenida Colombo, 5790. Jardim Universitário  
Maringá - PR  
CEP: 87020-900

Prezado Sr. Miguel A. A. Rodríguez

Conforme requisitado pela Sra. Sueli Strazzi, estamos enviando 02 Litros de Glicerina Caramuru e seu respectivo Certificado de Análise. O resultado de sabões desta amostra é: 43.615 ppm este resultado é para controle de processo então, não está incluído no laudo de análise.

Atenciosamente,

A handwritten signature in cursive script, reading "Carolina Vinagre da Silva".

Control de Qualidade Biodiesel

Fone: (64) 3658-3033

Fax: (64) 3658-3007

E-Mail: [carolineoliveira@caramuru.com](mailto:carolineoliveira@caramuru.com)

[cqbiodiesel@caramuru.com](mailto:cqbiodiesel@caramuru.com)



## LAUDO DE ANÁLISES

Cliente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Cidade/Estado: Maringá-PR

Produto: Glicerina

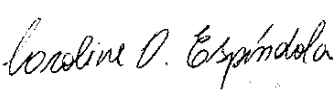
Tipo: Glicerina Loira

Data de Fabricação: 09/09/2009

Validade: 12 meses

Data de Emissão: 14/09/2009

Lote: LF090909TGL02

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	RESULTADOS	ESPECIFICAÇÃO
Glicerol (%)	81,75	Mín. 80,00
Umidade (%)	8,58	Máx. 13,00
Sais (%)	6,51	Máx. 7,00
Metanol (%)	<0,10	Máx. 0,10
Responsável Caroline Oliveira Espíndola CRQ-GO 12300392 Supervisora de Controle de Qualidade	Assinatura 	

Av. Eliezer Oliveira Guimarães, módulo10 - Distrito Agroindustrial - CEP: 75.890-000 - São Simão-GO

Tel.: (64) 3658-3033 - Fax: (64) 3658-3007 - e-mail: carolineoliveira@caramuru.com

0643658 0100

**ANEXO II – RESULTADOS DA ANÁLISE E  
IDENTIFICAÇÃO DA BACTERIA ISOLADA A  
PARTIR DE AMOSTRA DE SOLO**



# Microbiology Report

LABORATORIO SANTA CASA DE MISERICORDIA DE MARINGÁ

SETOR MICROBIOLOGIA  
LABORATÓRIO STA. CASA MARINGÁ

RAFAEL R. B. MOREIRA  
FARMACÊUTICO BIOQUÍMICO

Name	BENICIO	Specimen	310310002	Status	Final
Patient ID	310310002	Source		Status Date	1/4/2010
Date of Birth		Ward of Iso		Collected	30/3/2010
Att. Phys				Req Phys	

01 **Klebsiella oxytoca** Status: Final 1/4/2010

**01 K. oxytoca**

Drug	MIC	Expert	Interps	Origin
Amikacin	<=16		S	
Amox/K Clav	<=8/4		S	
Amp/Sulbactam	<=8/4		S	
Ampicillin	>16		R	
Aztreonam	<=8		S	
Cefazolin	<=8		S	
Cefepime	<=8		S	
Cefotaxime	<=8		S	
Ceftazidime	<=2		S	
Ceftriaxone	<=8		S	
Cefuroxime	<=4		S	
Cephalothin	<=8		S	
Ciprofloxacin	<=1		S	
ESBL-a Scrn	<=4			
ESBL-b Scrn	<=1			
Gatifloxacin	<=2		S	
Gentamicin	<=1		S	
Imipenem	<=4		S	
Levofloxacin	<=2		S	
Nitrofurantoin	<=32			
Pip/Tazo	<=16		S	
Piperacillin	>64		R	
Tetracycline	<=4		S	
Ticar/K Clav	<=16		S	
Tobramycin	<=1		S	
Trimeth/Sulfa	<=2/38		S	
Trimethoprim	<=8			

S = Susceptible	N/R = Not Reported	Blank = Data not available, or drug not advisable or tested
I = Intermediate	--- = Not Tested	ESBL = Extended spectrum beta-lactamase
R = Resistant	TFG = Thymidine-dependent strain	BlaC = Beta-lactamase positive
MIC = mcg/ml (mg/L)		

S\* = Predicted susceptible interpretation  
R\* = Predicted resistant interpretation  
EBL? = Suspected ESBL. Confirmatory tests needed to differentiate ESBL from other beta-lactamases.  
IB = Inducible Beta-lactamase. Appears in place of "Susceptible" with species known to possess inducible beta-lactamases; potentially they may become resistant to all beta-lactam drugs. Monitoring of patients during/after therapy is recommended. Avoid other/combined beta-lactam drugs.  
^ = Reported interpretation changed

For blood and CSF isolates, a beta-lactamase test is recommended for Enterococcus species.

Name	BENICIO	Specimen	310310002	Status	Final
Patient ID	310310002	Source		Status Date	1/4/2010
Date of Birth		Ward/Rm	EXT /	Collected	30/3/2010

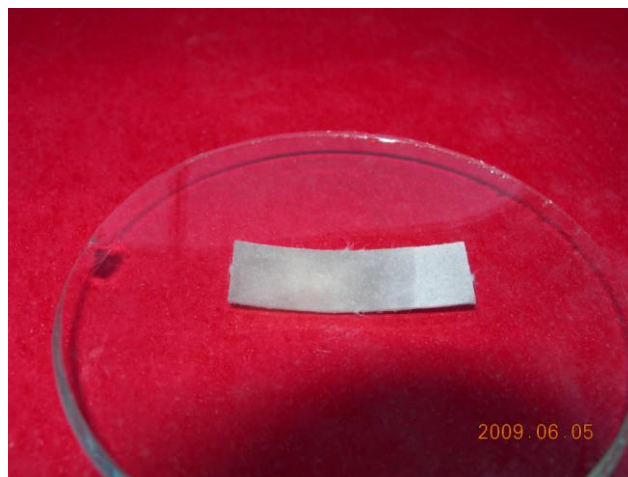
Printed 6/4/2010 07:51

Page 1 of 1

Tech: \_\_\_\_\_



TESTES DE UREIA, NITRATO E TSI



PROVA DE OXIDASE



TESTE DE MOBILIDADE



TESTES BIOQUÍMICOS - PAINEL MICROSCAN



TESTES BIOQUÍMICOS E ANTIBIOGRAMA –  
PAINEL BD PHOENIX

**ANEXO III – TABELAS DE DENSIDADE ÓTICA  
(DO) E CONSUMO PERCENTUAL DE GLICEROL  
(CG) OBTIDOS PARA OS ENSAIOS DA GRADE  
EXPERIMENTAL REPRESENTADA NA TABELA 4**

DENSIDADE ÓTICA (au)

ENSAIO	1			2			3			4			5			6			7			8					
	(+++)			(+ --)			(- - +)			(- + -)			(++ -)			(- + +)			(- - -)			(+- +)					
TEMPO																											
0	0,060	0,060	0,060	0,032	0,032	0,032	0,021	0,021	0,021	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,019	0,019	0,019	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,080	0,080	0,080
3	0,048	0,048	0,048	0,032	0,032	0,032	0,033	0,033	0,033	0,038	0,038	0,038	0,063	0,063	0,063	0,023	0,023	0,023	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,078	0,078	0,078
6	0,045	0,045	0,045	0,043	0,043	0,043	0,033	0,033	0,033	0,038	0,038	0,038	0,049	0,049	0,049	0,025	0,025	0,025	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	0,081	0,081	0,081
9	0,046	0,052	0,049	0,037	0,036	0,037	0,049	0,053	0,051	0,054	0,049	0,052	0,052	0,047	0,050	0,052	0,053	0,053	0,054	0,052	0,053	0,054	0,052	0,053	0,086	0,067	0,077
15	0,057	0,053	0,055	0,059	0,046	0,053	0,051	0,054	0,053	0,070	0,055	0,063	0,086	0,056	0,071	0,090	0,055	0,073	0,082	0,048	0,065	0,082	0,048	0,065	0,098	0,099	0,099
24	0,196	0,185	0,191	0,490	0,475	0,483	0,153	0,184	0,169	0,149	0,132	0,141	0,103	0,108	0,106	0,114	0,088	0,101	0,091	0,094	0,093	0,091	0,094	0,093	0,956	0,933	0,945
30	1,012	0,985	0,999	0,854	0,828	0,841	0,833	0,823	0,828	0,197	0,193	0,195	0,535	0,648	0,592	0,218	0,306	0,262	0,276	0,198	0,237	0,276	0,198	0,237	0,973	1,131	1,052
36	1,126	1,077	1,102	1,030	0,949	0,990	1,104	1,060	1,082	0,265	0,254	0,260	0,838	0,962	0,900	0,706	0,815	0,761	0,316	0,278	0,297	0,316	0,278	0,297	1,070	1,098	1,084
48	1,128	1,134	1,131	0,937	0,941	0,939	1,042	1,059	1,051	0,279	0,281	0,280	0,985	1,005	0,995	0,955	0,961	0,958	0,358	0,377	0,368	0,358	0,377	0,368	1,078	1,096	1,087
72	1,137	1,075	1,106	0,958	0,847	0,903	1,056	0,926	0,991	0,282	0,309	0,296	0,998	0,969	0,984	0,979	0,934	0,957	0,319	0,336	0,328	0,319	0,336	0,328	1,131	1,142	1,137
144	0,996	1,170	1,083	0,954	0,854	0,904	0,932	0,738	0,835	0,262	0,303	0,283	1,042	0,947	0,995	0,873	1,054	0,964	0,309	0,262	0,286	0,309	0,262	0,286	1,008	0,840	0,924

TEMPO 48 h								
Área								
Ensaio	Replicata 1	Replicata 2	Média	[ ] (g/L)	Fator de diluição	[ ] <sub>corrigida</sub> (g/L)	[GLY] <sub>cons</sub> (g/L)	% de consumo
1	4912506,00	4690320,24	4801413,12	0,412644028	100,000	41,26	33,74	44,98
2	2366238,00	1895238,38	2130738,19	0,183120337	10,000	1,83	10,77	85,47
3	408996,41	464866,50	436931,46	0,037550852	10,000	0,38	12,22	97,02
4	7022195,00	7134564,00	7078379,50	0,608331538	100,000	60,83	14,17	18,89
5	5105083,05	5021974,00	5063528,53	0,435170804	100,000	43,52	31,48	41,98
6	5994266,00	5833530,00	5913898,00	0,508253431	100,000	50,83	24,17	32,23
7	10771205,00	10480836,00	10626020,50	0,913223626	10,000	9,13	3,47	27,52
8	46442,00	20854,00	33648,00	0,002891783	10,000	0,03	12,57	99,77
Padrão Glicerol	3490718,00	[GLY] <sub>padrão</sub> = 0,3 g/L						
Observação: GLY 0,3 g/L para 0,75 mL/min é 2036769,00								

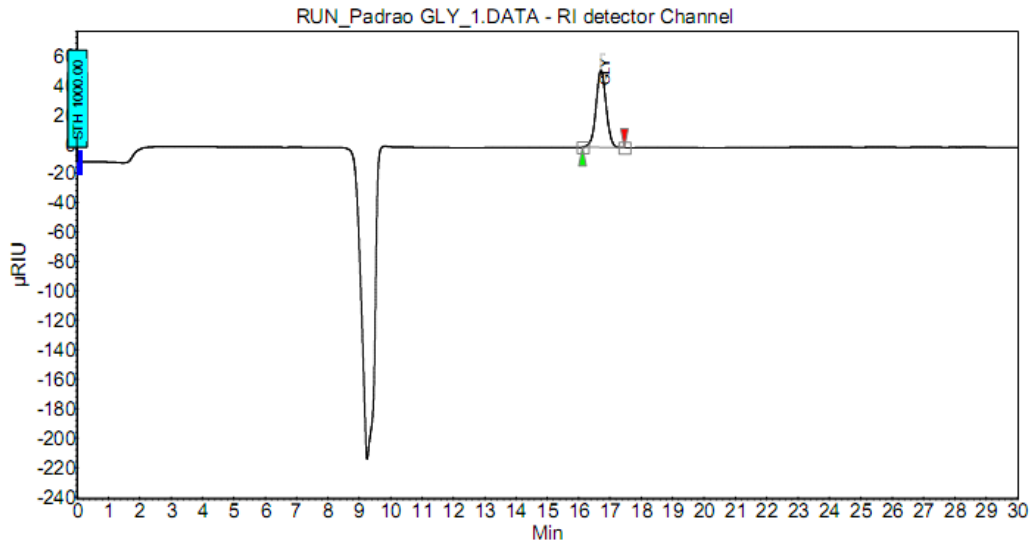
Ensaio	Replicata 1	Replicata 2	[GLY] <sub>Resd1</sub>	[GLY] <sub>Resd2</sub>	[GLY] <sub>Resd1</sub> (g/L)	[GLY] <sub>Resd2</sub> (g/L)	[GLY] <sub>Cons1</sub> (g/L)	[GLY] <sub>Cons2</sub> (g/L)	[GLY] <sub>Cons1</sub> (%)	[GLY] <sub>Cons2</sub> (%)	[GLY] <sub>Cons_Médio</sub> (%)
1	4912506,00	4690320,24	0,4222	0,4031	42,22	40,31	32,78	34,69	43,71	46,25	44,98
2	2366238,00	1895238,38	0,2034	0,1629	2,03	1,63	10,57	10,97	83,86	87,07	85,47
3	408996,41	464866,50	0,0352	0,0400	0,35	0,40	12,25	12,20	97,21	96,83	97,02
4	7022195,00	7134564,00	0,6035	0,6132	60,35	61,32	14,65	13,68	19,53	18,25	18,89
5	5105083,05	5021974,00	0,4387	0,4316	43,87	43,16	31,13	31,84	41,50	42,45	41,98
6	5994266,00	5833530,00	0,5152	0,5013	51,52	50,13	23,48	24,87	31,31	33,15	32,23
7	10771205,00	10480836,00	0,9257	0,9007	9,26	9,01	3,34	3,59	26,53	28,51	27,52
8	46442,00	20854,00	0,0040	0,0018	0,04	0,02	12,56	12,58	99,68	99,86	99,77

**ANEXO IV - TABELA DE DENSIDADE ÓTICA  
(DO) OBTIDA PARA OS ENSAIOS DA GRADE  
EXPERIMENTAL REPRESENTADA NA TABELA 6**

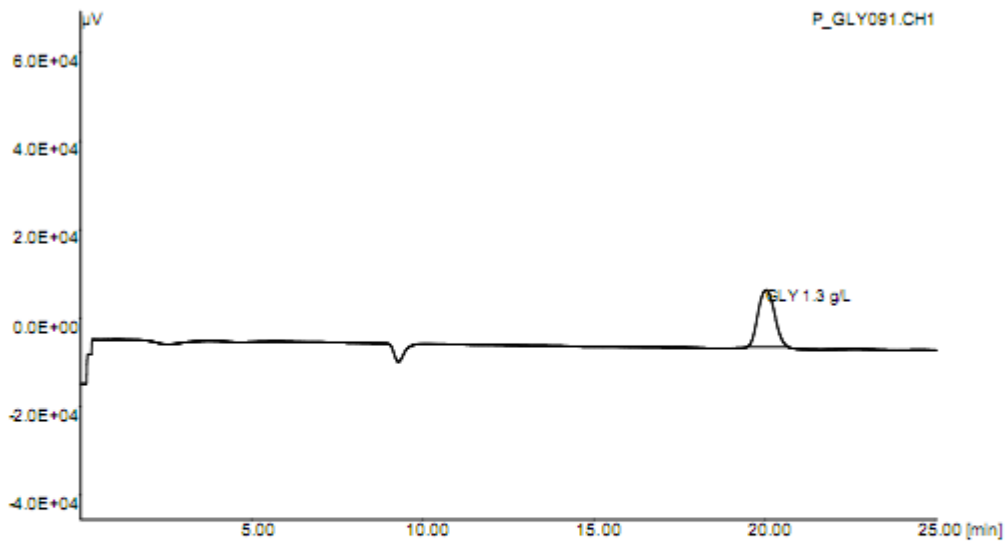


						<b>Amostragens</b>							
						0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
Corrida Std	Run	Bloco	Triptona	Uréia	Tioglicolato	OD <sub>KS</sub>	OD <sub>KS</sub>	OD <sub>KS</sub>	OD <sub>KS</sub>	OD <sub>KS</sub>	OD <sub>KS</sub>	OD <sub>KS</sub>	OD <sub>KS</sub>
1	2	Block 1	-1	-1	-1	0,029	0,036	0,051	0,220	0,823	1,150	1,524	1,455
2	14	Block 2	-1	-1	-1	0,031	0,049	0,052	0,231	0,824	1,172	1,533	1,486
3	6	Block 1	1	-1	-1	0,011	0,138	0,583	1,256	1,225	1,330	1,365	1,468
4	13	Block 2	1	-1	-1	0,014	0,129	0,592	1,242	1,239	1,307	1,410	1,426
5	8	Block 1	-1	1	-1	0,007	0,046	0,057	0,167	1,014	1,047	1,384	1,331
6	11	Block 2	-1	1	-1	0,010	0,053	0,063	0,168	0,971	1,104	1,333	1,403
7	5	Block 1	1	1	-1	0,039	0,096	0,326	1,255	1,281	1,439	1,389	1,416
8	12	Block 2	1	1	-1	0,037	0,094	0,317	1,248	1,246	1,369	1,426	1,383
9	7	Block 1	-1	-1	1	0,022	0,023	0,026	0,024	0,129	1,089	1,190	1,103
10	9	Block 2	-1	-1	1	0,019	0,025	0,032	0,029	0,168	1,134	1,237	1,206
11	1	Block 1	1	-1	1	0,048	0,107	0,372	1,113	1,128	1,151	1,195	1,221
12	10	Block 2	1	-1	1	0,049	0,124	0,363	1,122	1,132	1,126	1,136	1,146
13	3	Block 1	-1	1	1	0,039	0,039	0,026	0,048	0,975	1,309	1,465	1,428
14	15	Block 2	-1	1	1	0,037	0,026	0,035	0,060	1,043	1,328	1,412	1,434
15	4	Block 1	1	1	1	0,046	0,090	0,216	0,856	0,964	1,018	1,055	1,010
16	16	Block 2	1	1	1	0,048	0,092	0,225	0,839	0,940	0,970	1,026	0,955

**ANEXO V – CROMATOGRAMAS REFERENTES  
AOS PADRÕES DE GLICEROL UTILIZADOS NOS  
CÁLCULOS DA TABELA 13**



Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [µRIU]	Area [µRIU.Min]	Area % [%]
1	GLY	16.72	100.00	52.6	19.5	100.000
Total			100.00	52.6	19.5	100.000



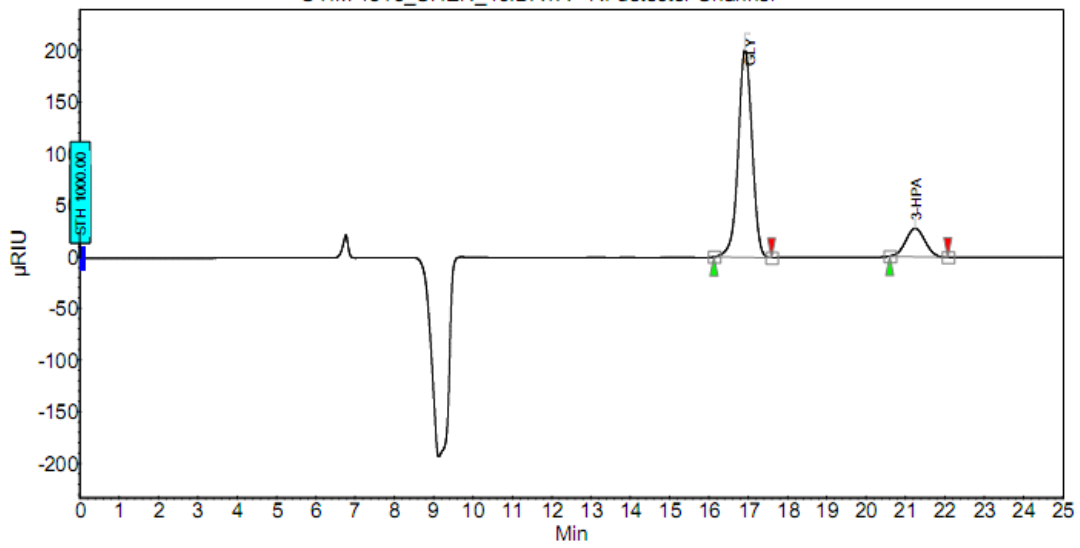
File name : P\_GLY091.CH1

Info :  
 Amostra Glicerol 1,3 g/L  
 Vol. amostra 20 microL  
 Coluna HPLC 87 H 300 x 78 mm  
 fase H2SO4 5mM  
 temperatura 65 °C  
 fluxo 0.45 ml/min  
 pressão 53 atm  
 Detetor RI Mod. CG 410  
 Sensibilidade 1/2

#	Name	RT	Height[µV]	Area[µV.Sec]	%Area
1	GLY 1.3 g/L	20.030	12841	427584.200	100.00
Total Area of Peak = 427584.200 [µV.Sec]					

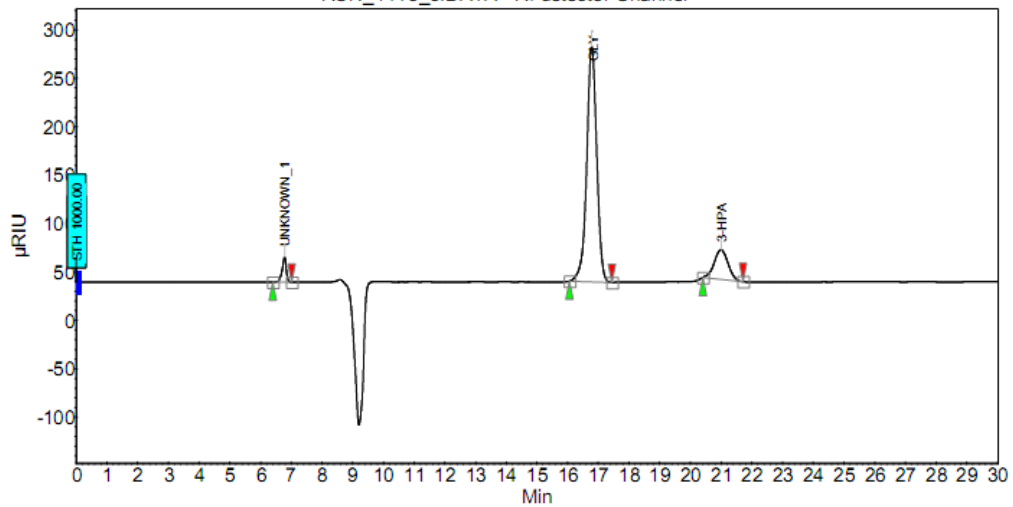
**ANEXO VI – CROMATOGRAMAS RELATIVOS  
AO TEMPO 3 h DO ENSAIO N. 7 DA SEÇÃO 5.3**

OTIM 13T3\_CHEN\_16.DATA - RI detector Channel



Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [µRIU]	Area [µRIU.Min]	Area % [%]
1	GLY	16.92	84.15	200.6	82.1	84.151
2	3-HPA	21.25	15.85	27.3	15.5	15.849
Total			100.00	227.9	97.6	100.000

RUN\_14T3\_8.DATA - RI detector Channel



Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [µRIU]	Area [µRIU.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN_1	6.78	3.54	26.1	4.0	3.539
2	GLY	16.79	82.08	243.2	91.7	82.079
3	3-HPA	21.00	14.38	31.2	16.1	14.383
Total			100.00	300.5	111.7	100.000

Description

Amostra 13T3 diluicao 1:1

Coluna HPX 87 H 300 x 78 mm

Temperatura 25°C

Fase movel agua:acetonitrila 65:35 acidificada 0,5mM de H2SO4

Vazao 0,5 mL/min

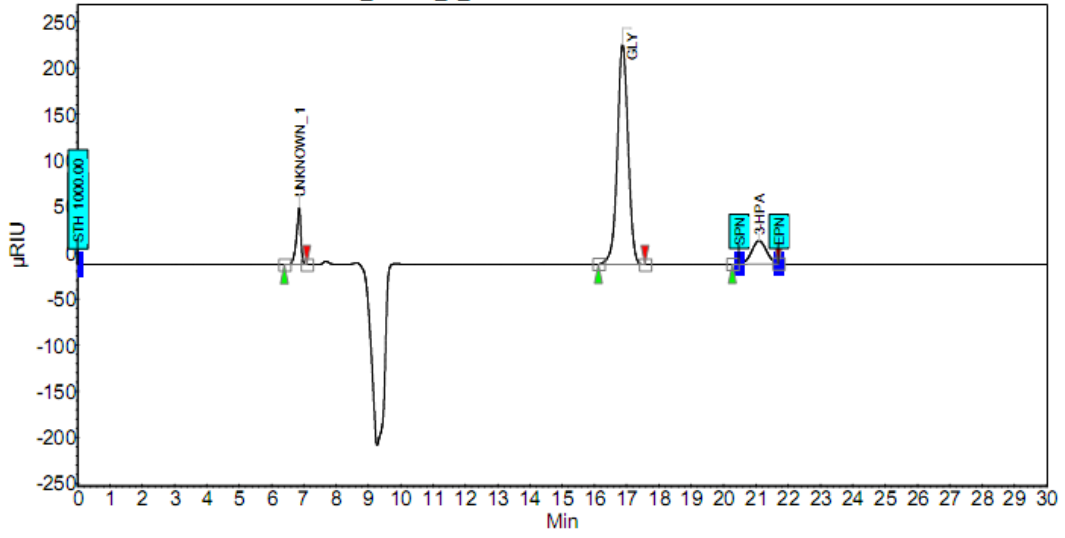
Detetor RI 35°C

Run Id. : -1

Run Time : 25.00

**ANEXO VII – CROMATOGRAMA RELATIVO AO  
TEMPO 3 h DO ENSAIO 2KS DA SEÇÃO 5.4**

RUN\_2KST3\_5\_2.DATA - RI detector Channel



Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [µRIU]	Area [µRIU.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN_1	6.86	8.57	62.4	9.9	8.572
2	GLY	16.88	79.79	238.4	92.1	79.792
3	3-HPA	21.10	11.64	25.1	13.4	11.636
Total			100.00	325.9	115.4	100.000