



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA**

**CLÉRIO VALENTIN DAMASCENO JUNIOR**

**Produção de biomoléculas por fermentação de glicerol  
utilizando micro-organismos isolados de rúmen bovino**

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Bioenergia, área de concentração Biocombustíveis.

Orientadora: Gisella Maria Zanin.

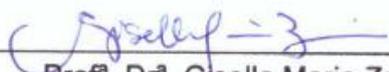
Coorientador: Miguel Angel Aparicio Rodríguez.

Maringá – Paraná – Brasil  
Junho de 2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA**

Está é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por **Clério Valentin Damasceno Junior** perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia em 07 de junho de 2013.

**COMISSÃO JULGADORA**



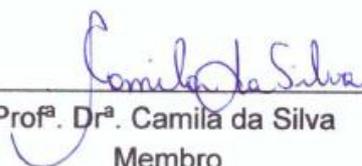
---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Gisella Maria Zanin  
Orientadora



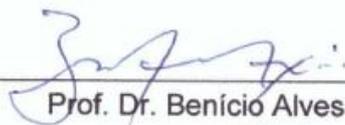
---

Prof. Dr. Miguel Angel Aparicio Rodriguez  
Coorientador



---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Camila da Silva  
Membro



---

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho  
Membro

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

D155p Damasceno Junior, Clério Valentin  
Produção de biomoléculas por fermentação de glicerol utilizando micro-organismos isolados de rúmen bovino / Clério Valentin Damasceno Junior. -- Maringá, 2013.  
40 f. : il. col., figs., tabs.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisella Maria Zanin.  
Coorientador: Prof. Dr. Miguel Angel Aparicio-Rodriguez.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2013.

1. Glicerol. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. 1,3-propanodiol. 4. 2,3-butanodiol. I. Zanin, Gisella Maria, orient. II. Aparicio-Rodriguez, Miguel Angel, Coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. IV. Título.

CDD 21.ed. 660.62

AHS

## **AGRADECIMENTOS**

Aos Professores Doutores Gisella Maria Zanin e Miguel Angel Aparicio Rodríguez pelo acompanhamento e orientação.

Ao Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho pela indispensável ajuda nesse trabalho.

À mestra Marcia dos Anjos, minha companheira de laboratório que me ensinou e me ajudou a aprimorar minhas técnicas de microbiologia.

Aos meus amigos de “sufoco”: Karla, Douglas, Larissa, Raquel e Natalia.

Aos engenheiros Lauro e Luiza que estiveram sempre à disposição para me ajudar.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À minha família pelo apoio e incentivo.

# PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR FERMENTAÇÃO DE GLICEROL UTILIZANDO MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DE RÚMEN BOVINO

**AUTOR: CLÉRIO VALENTIN DAMASCENO JUNIOR**

**ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dra GISELLA MARIA ZANIN**

**COORIENTADOR: Prof Dr. MIGUEL ANGEL APARICIO RODRÍGUEZ**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo 5790, Bloco D-90, CEP 87020-900 - Maringá – PR, Brasil, defendida em 07 de Junho de 2013. 40 p.

## RESUMO

Buscando fontes energéticas menos poluentes foi criada em 2005 no Brasil a lei nº 11097 que estipula a adição de biodiesel ao diesel vendido nos postos de combustíveis, fazendo com que a produção do biocombustível aumentasse exponencialmente. Com a produção do biodiesel existe a geração de 10% de glicerol durante o processo, que já está se tornando problemático para os produtores e podendo se tornar um passivo ambiental. Utilizando da biotecnologia pode-se utilizar micro-organismos para transformar o glicerol em biomoléculas de maior valor agregado sanando o problema e até aumentando a rentabilidade da produção do biodiesel. O presente trabalho teve como objetivo isolar um micro-organismo, observar e quantificar a degradação do glicerol e os produtos de seu metabolismo. Utilizando o rúmen bovino como fonte de micro-organismos foi possível isolar e identificada, com técnicas de provas bioquímicas, a bactéria, degradadora de glicerol, *Klebsiella pneumoniae*. A bactéria foi cultivada em meios contendo glicerol como única fonte de carbono, um deles contendo glicerol P.A. e adicionado de tioglicolato de sódio, outro contendo glicerina proveniente da produção de biodiesel e adicionada de tioglicolato de sódio e um terceiro com o mesmo glicerina só que sem a adição de tioglicolato de sódio. Os experimentos de fermentação foram conduzidos em erlenmeyer de 250 mL por 120 horas à 37 °C, foram retiradas a cada 24 horas, de forma asséptica, alíquotas que foram filtradas, centrifugadas e analisadas com o método de cromatografia líquida de alta eficiência. No meio com glicerol P.A., após 120 horas, houve a produção de 12,53 g/L de 1,3-propanodiol (20,76% de conversão) e 1,50 g/L de etanol (2% de conversão); no meio contendo a glicerina e o tioglicolato de sódio houve a produção de 22,53 g/L de 1,3-propanodiol (27,44% de conversão), 1,42 g/L de etanol (1,73% de conversão) e 1,13 g/L de 2,3-butanodiol (1,37 % de conversão); no meio contendo glicerina do processo sem a adição do tioglicolato de sódio houve a produção de 29,41 g/L de 1,3-propanodiol (30,06% de conversão), 1,03 g/L de etanol (1,31% de conversão) e 2,32 g/L de 2,3-butanodiol (2,76% de conversão). Ao final do trabalho Foi possível isolar e identificar a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. O meio contendo apenas a glicerina foi o mais eficiente na conversão do glicerol em 1,3-propanodiol e em 2,3-butanodiol e o meio contendo glicerina P.A. com tioglicolato de sódio foi mais eficiente na transformação do glicerol em etanol.

**Palavras-chave:** glicerol, *Klebsiella pneumoniae*, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol

# PRODUCTION OF BIOMOLECULES FROM GLYCEROL FERMENTATION USING MICROORGANISMS ISOLATED FROM BOVINE RUMEN

**AUTHOR: CLÉRIO VALENTIN DAMASCENO JUNIOR**

**SUPERVISOR: Prof.<sup>a</sup> Dra GISELLA MARIA ZANIN**

**COSUPERVISOR: Prof. Dr. MIGUEL ANGEL APARICIO RODRÍGUEZ**

Master Thesis; Bioenergy Post-Graduation; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo 5790, Bloco D-90, CEP 87020-900 - Maringá – PR, Brazil, presented in June, 07<sup>th</sup> 2013. 40 p.

## ABSTRACT

Seeking for cleaner energy sources Brazil established in 2005 in the law n° 11097 that stipulates the addition of biodiesel to diesel sold at gas stations, making the biofuel production increase exponentially. In addition to the biodiesel production is generated de amount of 10% glycerol during the process, which is already becoming problematic for manufacturers and can become an environmental liability. Biotechnology can be used to transform glycerol into biomolecules with higher value remedying the problem and to increase the profitability of production of biodiesel. This paper aims to isolate a microorganism, observe and quantify the degradation of glycerol and the products of their metabolism. Using the bovine rumen as a source of microorganisms, it was possible to isolated and identify using techniques of biochemical tests, the glycerol degrading bacteria, *Klebsiella pneumoniae*. The bacteria was grown in culture media containing glycerol as the sole carbon source, one containing glycerol P.A. added sodium thioglycollate, another containing glycerin from the biodiesel production added sodium thioglycollate and a third with only glycerin without the addition of sodium thioglycollate. The fermentation were conducted in erlenmeyers for 120 h at 37 °C where samples were taken, aseptically, every 24 hours and they were filtered, centrifuged and analyzed with the method of high performance liquid chromatography. In the media where there P.A. glycerin was added at the end of the process the production of 12,53 g/L of 1,3-propanediol (20.76 % conversion) and 1,50 g/L of ethanol (2 % conversion), the media containing glycerin and sodium thioglycollate production was 22.53 g/L of 1,3-propanediol (27,44 % conversion), 1,42 g/L of ethanol (1,73 % conversion) and 1,13 g/L of 2, 3-butanediol (1,37 % conversion), in the media containing glycerin without the addition of sodium thioglycollate was 29,41 g/L of 1,3-propanediol (30,06 % conversion), 1.03 g/L of ethanol (1,31 % conversion) and 2,32 g/L of 2,3-butanediol (2,76% conversion). The Bacteria isolated and identified was *Klebsiella pneumoniae*. The media containing only glycerin was the most efficient in the conversion of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol and the glycerin P.A. with media containing sodium thioglycollate was more efficient in conversion of glycerol to ethanol.

**Keywords:** glycerol, *Klebsiella pneumonia*, 1,3-propanediol, 2,3-butanediol

## LISTA DE TABELAS

1	Composição do meio de cultivo.....	12
2	Composição da solução mineral usada no meio de cultivo.....	12
3	Testes bioquímicos para identificação de enterobactérias.....	20
4	Comparação entre consumo e produção de metabólitos.....	31

## LISTA DE FIGURAS

1	Reação de transesterificação de óleos ou gorduras para a produção de ésteres e glicerol.....	4
2	Esquema do processo produtivo de Biodiesel.....	5
3	Esquema do catabolismo do glicerol.....	9
4	Esquema do isolamento de microrganismo degradador de glicerol da flora ruminal de bovino.....	14
5	Aparelho de identificação rápida de cepas bacterianas modelo Phoenix 100 (Becton Dickinson Diagnostics).....	15
6	Meio MacConkey inoculado com líquido ruminal diluído.....	17
7	Bactérias coradas utilizando a técnica da coloração de GRAM.....	18
8	Prova da uréia dos isolados de rúmen bovino.....	19
9	Provas do TSI, citrato EPM (prova de degradação do triptofano, hidrólise da uréia) e MILI (descarboxilação da lisina e motilidade).....	19
10	Consumo do substrato (glicerol) e perfil dos produtos formados: etanol e 1,3-propanodiol. Experimento conduzido com glicerol P.A.....	21
11	Gráfico do experimento utilizando glicerina bruta, onde estão representados os perfis do glicerol presente no meio reacional e dos produtos formados: etanol e 1,3-propanodiol e 2,3butanodiol.....	23
12	Concentrações de etanol e 2,3-butanodiol do experimento onde foi utilizado glicerol bruto.....	24
13	Gráfico do experimento utilizando glicerina bruta sem a adição de tioglicolato de sódio, onde estão representando os perfis do glicerol presente no meio e dos produtos formados: etanol e 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol.....	25
14	Concentrações de etanol e 2,3-butanodiol do experimento onde foi utilizado glicerol bruto sem a adição de tioglicolato.....	26
15	Comparação entre o consumo de glicerol dos experimentos.....	27
16	Comparação da produção de 1,3-propanodiol dos experimentos.....	28
17	Comparação da produção de etanol dos experimentos.....	29
18	Comparação da produção de 2,3-butanodiol dos experimentos.....	30

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1	Biodiesel.....	2
2.2	Glicerol.....	6
2.3	Fermentação de glicerol e rotas metabólicas.....	8
2.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	9
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1	Coleta do líquido ruminal bovino.....	11
3.2	Metodologia para isolamento e identificação de enterobactéria com potencial fermentativo de glicerol.....	11
3.2.1	Meio de cultivo para isolamento.....	11
3.3	Metodologia para isolamento de enterobactérias selvagens.....	13
3.4	Metodologia para identificação de enterobactérias selvagens.....	14
3.5	Avaliação de fermentação de glicerol por <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	15
3.6	Avaliação de fermentação de glicerina bruta por <i>K. pneumoniae</i> .....	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	17
4.1	Identificação de enterobactéria selvagem.....	17
4.2	Fermentação do glicerol puro por <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolada do rúmen bovino.....	21
4.3	Fermentação da glicerina bruta por <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolada do rúmen bovino.....	23
4.4	Fermentação da glicerina bruta por <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolada do rúmen bovino sem a adição de tioglicolato de sódio.....	25
4.5	Comparação entre os experimentos.....	27
5	CONCLUSÕES.....	32
6	REFERENCIAS E SUGESTÕES.....	33
	ANEXOS.....	37
	Anexo I – Laudo da análise química da glicerina bruta.....	38
	Anexo II – Laudo da identificação bacteriana.....	39
	Anexo III – Exemplo de cromatograma.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

As fontes de energia utilizadas pela sociedade moderna são baseadas basicamente em recursos finitos, como carvão mineral, gás natural e petróleo. Nas últimas décadas tem-se presenciado o aumento constante do preço dessas fontes, os quais geralmente são baseados por motivações políticas, já que as grandes reservas exploradas estão em regiões de conflito, como o Oriente Médio. Esse aumento causa repercussões econômicas mundiais tornando produtos e serviços mais caros. Os combustíveis fósseis também apresentam alta carga poluidora produzindo gases de efeito estufa assim como outros gases tóxicos.

Com a consciência de que os recursos fósseis são finitos, poluidores e de preço instável a busca por alternativas move a pesquisa mundial.

Os biocombustíveis podem ser designados como qualquer combustível derivado de biomassa, como o etanol, metano, o carvão vegetal, o biodiesel e outros mais. A grande quantidade e diversidade de matérias-primas que podem ser encontradas em qualquer lugar do planeta aliada à tecnologia utilizada pela agroindústria fazem da biomassa uma ótima fonte para produção de energias renováveis.

O Brasil é um dos maiores países do mundo e apresenta muitas vantagens agrônomicas para a produção de biomassa, por se situar em uma região de clima tropical, com grandes taxas de luminosidade e temperaturas médias durante todo o ano. Nas últimas décadas com a intensa tecnificação da produção de soja no Brasil houve também o desenvolvimento da indústria de produção óleos, principal matéria-prima do biodiesel.

O biodiesel é constituído por ésteres de ácidos graxos, que são por sua vez obtidos de lipídios, óleos ou gorduras, que podem ser de origem animal ou vegetal, adicionados de um álcool e um catalisador, no caso da transesterificação.

Foi criada em 2005 a Lei nº 11097 que estipula a adição de biodiesel ao diesel vendido nos postos de combustíveis, a cota atual de adição é de 5%. Para suprir a demanda do biocombustível foram produzidos no ano de 2011 aproximadamente 2,4 bilhões de litros de biodiesel segundo dados da ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis).

O aumento da produção do biodiesel representa menor poluição e maior sustentabilidade ao sistema, porém acarreta um problema. Com a produção do

biodiesel 10% do seu volume é produzido em glicerol. O glicerol é um componente muito utilizado na indústria, porém na sua forma mais pura, o glicerol produzido em conjunto com o biocombustível contem contaminantes que o torna difícil de ser utilizado e caro para ser purificado.

Muitas pesquisas tratam sobre a utilização do glicerol bruto, uma dessas vertentes é a biotecnologia. Com a utilização de micro-organismos pode-se transformar o glicerol bruto que esta com valor de mercado muito baixo em biomoléculas de alto valor agregado.

O presente trabalho teve como objetivo geral a utilização da glicerina, coproduto da produção de biodiesel, como única fonte de carbono em processo de fermentação em batelada, quantificar e qualificar seus produtos.

Os objetivos específicos foram:

- O isolamento e identificação de bactéria do rúmen bovino;
- Fermentação de glicerol em batelada utilizando o micro-organismo isolado;
- Fermentação de glicerina, proveniente da produção do biodiesel, em batelada utilizando o micro-organismo isolado;
- Identificação e quantificação dos produtos das fermentações.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

### **2.1. Biodiesel**

A utilização de fontes alternativas de energia é uma das maiores prioridades atuais, que vem ajudar significativamente a amenizar os graves problemas ocasionados pelo desenvolvimento tecnológico e a diminuição das fontes de matérias-primas. A preocupação atual pela redução da poluição e a crise energética tem estimulado o mercado mundial de biocombustíveis. A economia global mantém-se em crescimento e a demanda por energia limpa e recursos renováveis encontra-se em aumento contínuo (BILGEN et al., 2006).

Neste sentido, a busca intensiva por combustíveis alternativos ao petróleo, como o biodiesel, apresenta grande importância principalmente para os países emergentes, uma vez que sua produção auxilia na conservação do meio ambiente, devido à redução da emissão dos gases responsáveis pelo aquecimento global, e contribui para o desenvolvimento social mediante a geração de empregos (RIVALDI et al., 2008).

O biodiesel é um combustível alternativo para os motores de combustão interna, definido como uma mistura de ésteres de alquil derivados de ácidos graxos de cadeia longa provenientes de uma matéria-prima lipídica renovável, tais como óleo vegetal ou gordura animal (ENCINAR, 2002).

A transesterificação (também chamada de alcoólise) é a reação de uma gordura ou óleo, com um álcool para a formação de ésteres e glicerol. A reação é mostrada na Figura 1. Um catalisador é utilizado para melhorar a velocidade de reação e o rendimento. Devido a reação ser reversível, o excesso de álcool é usado para deslocar o equilíbrio para o lado dos produtos (MA e HANNA, 1999).

O processo de produção do biodiesel pode ser feito de duas formas: via química e via enzimática. A produção do biodiesel pode ser catalisada por bases, ácidos ou enzimas. As reações básicas incluem hidróxido de sódio ou de potássio, carbonatos de sódio ou de potássio e alcóxidos tais como metóxido de sódio, etóxido de sódio, propóxido de sódio ou butóxido de sódio. Ácido sulfúrico, ácido sulfônico e ácido clorídrico são geralmente utilizados como catalisadores ácidos. As lipases também podem ser utilizadas como biocatalisadores nas reações enzimáticas (MA e HANNA, 1999; BILGEN et al., 2006).

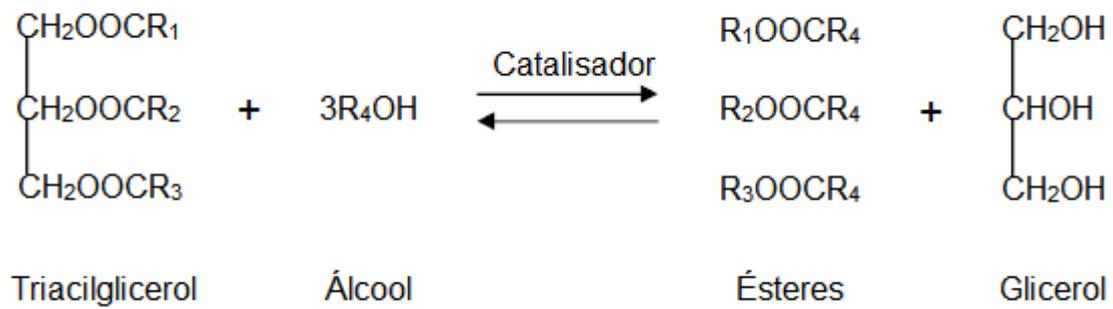


Figura 1 - Reação de transesterificação de óleos ou gorduras para a formação de ésteres e glicerol.

O processo químico de transesterificação utiliza catalisadores, e geralmente o processo acontece em reatores batelada com excesso de álcool. Ao final da reação a massa final é constituída de duas fases, que são separadas por decantação ou por centrifugação, sendo que a fase pesada contém o glicerol bruto e a fase leve o biodiesel.

O álcool em excesso é retirado do biodiesel e do glicerol bruto por evaporação, em seguida o biodiesel é lavado com água, centrifugado e desumidificado. O excesso de álcool reconstituído é então destilado e reutilizado no processo. O glicerol bruto obtido (80-88% de pureza) é vendido para outras indústrias (MA e HANNA, 1999; FUKUDA et al., 2001). O diagrama da produção de biodiesel está representado na Figura 2.

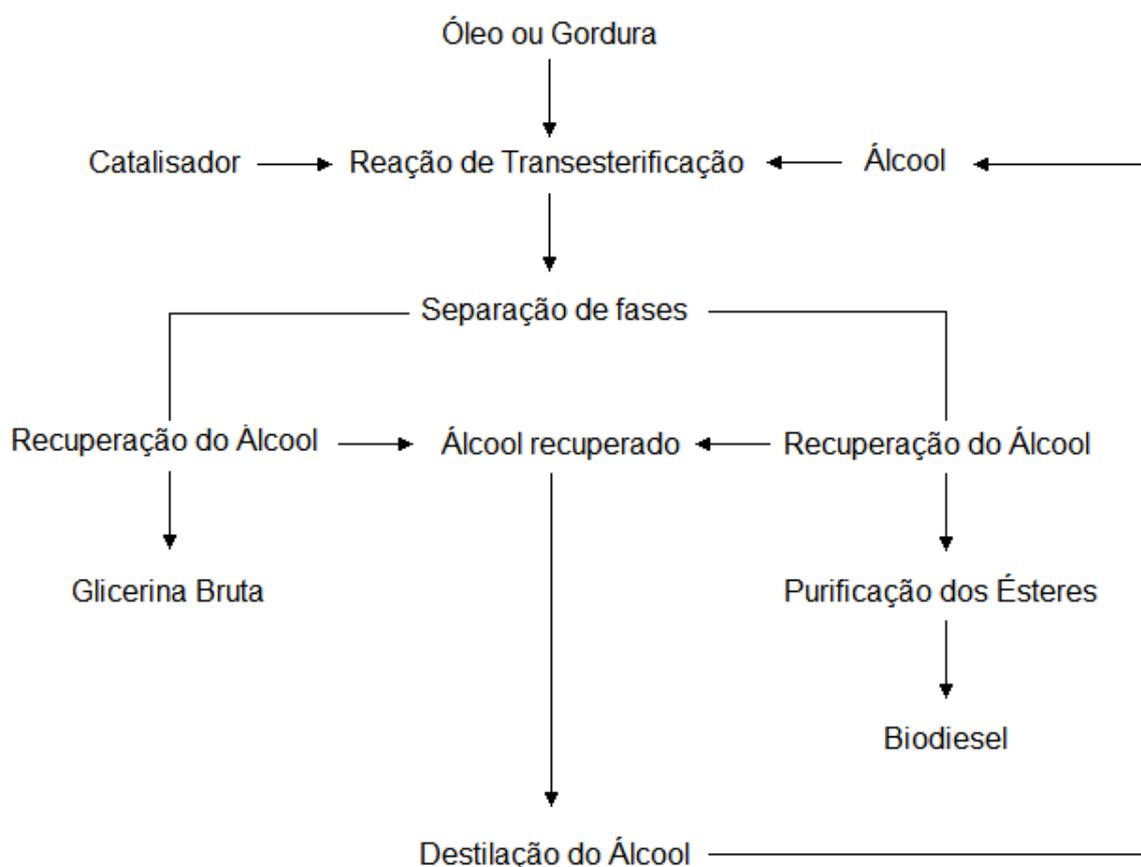


Figura 2 – Esquema do processo produtivo de Biodiesel

No Brasil, a produção e comercialização de biodiesel possuem importantes vantagens devido à grande disponibilidade de matéria-prima para sua produção e ao crescimento contínuo da indústria de óleos vegetais. Segundo dados da ANP mais de 78% do biodiesel produzido no Brasil têm como base óleo de soja e outros 15% feitos de gordura bovina (OLIVEIRA et al., 2006; ANP 2012).

A produção de biodiesel está significativamente acelerada, uma vez que o governo brasileiro estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao combustível de petróleo mediante a Lei 11097/2005 (RIVALDI et al., 2008).

De acordo com dados extraídos da ANP o Brasil desde o início do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), em dezembro de 2004, até o final do ano de 2011 teve a produção de 8,3 bilhões de litros de biodiesel.

## 2.2. Glicerol

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva. Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano (OECD-SIDS, 2002).

Na natureza, o glicerol existe em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê) e animais em formas combinadas de glicerina com ácidos graxos (THOMPSON; HE, 2006). Em micro-organismos eucarióticos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos. O glicerol na sua forma pura apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e em clorofórmio (WANG et al., 2001).

O glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol (DASARI et al., 2005). Foi estimado o incremento do volume de biodiesel, e o glicerol coproduzido aumentaria de 83 para 330 milhões L/ano até o ano 2010 (RIVALDI et al., 2008). Com o intuito de evitar futuros problemas derivados do acúmulo de glicerol e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessário a busca de alternativas para o uso do glicerol bruto gerado nesta produção.

A rentabilidade de vários processos químicos depende em parte, da venda dos subprodutos, permitindo a redução dos custos de produção e conseqüentemente, do preço final do produto. Em alguns países europeus, a produção de glicerol aumentou significativamente devido à produção de biodiesel. Como consequência, os preços caíram e a maioria das empresas que produziam quimicamente o glicerol tiveram de fechar (DHARMADI et al., 2006).

O glicerol está presente em muitas aplicações como: tintas, cosméticos, indústria automotiva, tabaco, alimentos, farmacêutica, papel e celulose, couro e indústrias têxteis. Também é utilizado como matéria-prima para a produção de vários produtos químicos. Novas aplicações estão sendo avaliadas na indústria alimentar, o poliglicerol e poliuretano industrial, estabilizadores de madeira e produção de pequenas moléculas, tais como a dihidroxiacetona, ácidos glicérico e hidróxi-pirúvico e carbonato de glicerol (WANG et al., 2001).

Dessa forma, existe um grande interesse na purificação do glicerol ou no seu reaproveitamento direto, sem tratamento, o que proporcionará a viabilização do processo de produção de biodiesel, permitindo que este se torne competitivo no crescente mercado de biocombustíveis. Os processos para sua purificação incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para a remoção principalmente de  $K^+$  e  $Na^+$  utilizados como catalisadores (YONG et al., 2001). A aplicação do glicerol na indústria está condicionada ao grau de pureza, que deve ser igual ou superior a 95% (grau alimentício e farmacêutico). No entanto, os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel (DHARMADI et al., 2006).

Na União Européia, algumas empresas de biodiesel têm graves problemas com o excesso de glicerol e descarte desse material que é muito caro. O colapso dos preços de glicerol causa grandes problemas para estas empresas (WILKE e VORLOP, 2004; DHARMADI et al., 2006.).

Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando conseqüentemente, os problemas e riscos ambientais. A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (ITO et al., 2005).

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel. Nele contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, e que são factíveis de serem utilizados por micro-organismos para o seu crescimento durante processos fermentativos (PAPANIKOLAOU et al., 2002).

O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula. Vários estudos foram desenvolvidos visando à utilização de glicerol como fonte de carbono por micro-organismos, especialmente por bactérias. Neste sentido, a biotecnologia moderna, com todo seu avanço trará grandes contribuições e permitirá a obtenção de biomoléculas e produtos com importantes propriedades (ITO et al., 2005).

### 2.3. Fermentação de glicerol e rotas metabólicas

O glicerol é uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (GANCEDO; GANCEDO, 1968; ITO et al., 2005)

Muitos estudos, já foram e estão sendo, desenvolvidos visando à utilização de glicerol como fonte de carbono por micro-organismos, especialmente por bactérias. Muitos destes apontam, principalmente, os mecanismos de assimilação do glicerol por estes micro-organismos para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (PAPANIKOLOAU et al., 2002; ITO et al., 2005; CHENG et al., 2007).

Alguns micro-organismos são, comprovadamente, capazes de crescer em anaerobiose utilizando glicerol como fonte única de carbono e de energia, tais como: *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* e *Lactobacillus reuteri*.

Em bactérias como *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* e *Enterobacter*, o glicerol é metabolizado tanto pela via oxidativa quanto pela redutiva. Na via oxidativa, a enzima NAD<sup>+</sup> dependente da glicerol-desidrogenase (EC 1.1.1.6) catalisa a conversão de glicerol em dihidroxiacetona e a enzima glicolítica dihidroxiacetona-quinase (EC 2,7.1.29) fosforila este último produto, o qual é então enviado para a glicólise. Na via redutiva é catalisada pela coenzima dependente de vitamina B<sub>12</sub> glicerol-desidratase (EC 4.2.1.30) e diol-desidratases (EC 4.2.1.28), convertendo de glicerol a 3-hidroxi propionaldeído, e pela enzima dependente de NADH+H + 1,3-propanodiol-desidrogenase (1,3-propanodiol-oxidoreductase, EC 1.1.1.202), reduzindo o 3-hidroxi propionaldeído em 1,3-propanodiol e regenerando NAD<sup>+</sup> (Figura 3) (DA SILVA et al., 2009).

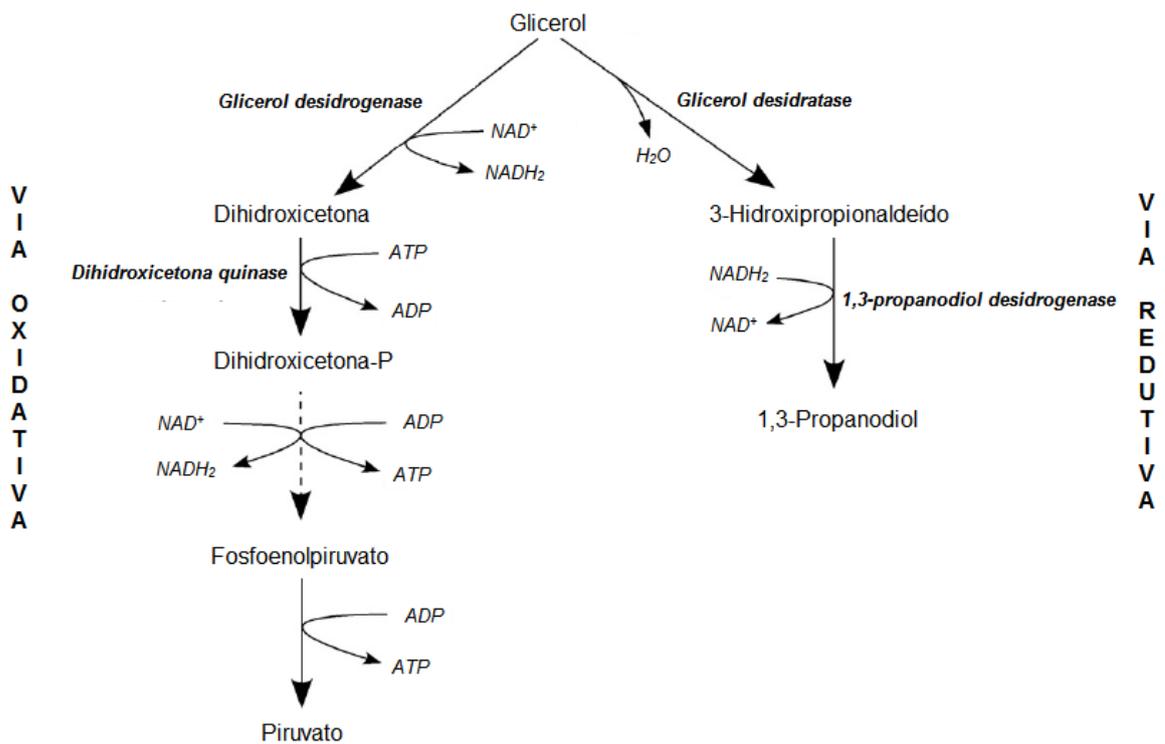


Figura 3 - Esquema do catabolismo do glicerol

No final, 1,3-propanodiol é um produto altamente específico para a fermentação de glicerol e não pode ser obtido a partir de qualquer outra conversão anaeróbica.

#### 2.4. *Klebsiella pneumoniae*

As bactérias do gênero *Klebsiella* são bacilos de hastes retas medindo de 0,3 a 1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e apresentando 0,6 a 6,0  $\mu\text{m}$  de comprimento. Dispõem-se isoladas, em pares ou em pequenas correntes de bacilos. As células são capsuladas, Gram negativas e não móveis. Elas são anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas e apresentam tanto metabolismo respiratório, quanto fermentativo. Sua temperatura ótima de crescimento está em 37 °C. Ocorrem em fezes animais, solo, água, frutas e vegetais (KRIEG et al. 1994).

*K. pneumoniae* e *K. oxytoca* são patógenos oportunistas que podem causar bacteremia (presença de bactérias no sangue), pneumonia e infecção urinária em humanos. Frequentemente causam infecções nosocomiais em pacientes

com problemas urinários, neonatal, em tratamento intensivo e pacientes geriátricos (KRIEG et al. 1994).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Engenharia Química e no Departamento de Ciências Básicas da Saúde ambos da Universidade Estadual de Maringá.

### 3.1 Coleta do líquido ruminal bovino

No dia 18 do mês de Outubro de 2011, próximo as 8 horas, na fazenda escola da UEM, foram coletadas amostras de líquido ruminal de uma vaca em jejum. A temperatura do material recém-coletado foi de 31,5 °C e o pH de 6,7. Amostras no volume de 100 mL foram transferidas para frascos de schott previamente esterilizados, contendo 250 mg de tioglicolato de sódio e as amostras foram congeladas.

### 3.2 Metodologia para isolamento e identificação de enterobactéria com potencial fermentativo de glicerol

#### 3.2.1 Meio de cultivo para isolamento

Para o isolamento de cepas fermentativas do rúmen foi utilizado um meio de cultivo baseado na metodologia de APARICIO-RODRÍGUEZ (2010) apresentado nas Tabelas 1 e 2:

Tabela 1 – Composição do meio usado nos processos fermentativos

Componentes	Concentração
Uréia	2,50 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,65 g/L
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,40 g/L
KCl	4,30 g/L

K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,40 g/L
Glicerol	40 mL/L
Tioglicolato de sódio	0,60 g/L
Solução mineral (tabela 2)	4 mL/L

Tabela 2 – Composição da solução mineral usada no meio de cultivo

Componentes	Concentração
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,085 g/L
Ácido cítrico monohidratado	10,00 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,735 g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,422 g/L
ZnCl <sub>2</sub>	1,363 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,242 g/L
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,174 g/L
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,190 g/L

O meio foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos sem a adição da uréia, que foi esterilizada por filtração (0,22 µm). Tal procedimento é necessário a fim de impedir a ocorrência de reações indesejáveis e também para evitar a precipitação de sais. Após este procedimento, as duas partes do meio foram misturadas em frascos de Erlenmeyers estéreis, e o pH inicial foi ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L.

### 3.3 Metodologia para isolamento de enterobactérias selvagens

Para o isolamento foi adaptado o método utilizado por APARICIO-RODRÍGUEZ (2010), onde foram diluídos 50 g de líquido ruminal em 500 mL de água estéril, mantido em repouso por aproximadamente 1 hora e filtrado em papel qualitativo.

Do filtrado foram utilizados 100 µL como inóculo e adicionados a tubos de ensaio de 10 mL contendo 4 mL de meio de cultivo contendo apenas glicerol como

fonte de carbono (descrito no item 3.2.1), além de uma fina camada de óleo mineral (qsp) adicionada como barreira ao oxigênio. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas.

A partir dos tubos recém-cultivados foram semeadas utilizando a técnica de estrias em placas contendo meio de cultivo MacConkey. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Das placas de meio MacConkey cultivadas posteriormente foram selecionadas colônias uniformes e coradas, que foram transferidas para tubos de ensaio individuais de 10 mL contendo 4 mL de meio de cultivo TSB (Caldo triptona de soja) e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação foram feitos repiques em placas contendo meio de cultivo TSA (Ágar triptona de soja) e incubadas por 24 horas à 37 °C.

Foram escolhidas colônias uniformes de cada placa e feitos os testes de coloração de Gram para comprovar a pureza dos isolados.

Após o isolamento das colônias em cultura pura, os isolados foram estocados em caldo nutriente com glicerol a 20% à -20 °C.

Na Figura 4 mostra-se um esquema da técnica empregada para o isolamento dos micro-organismos.

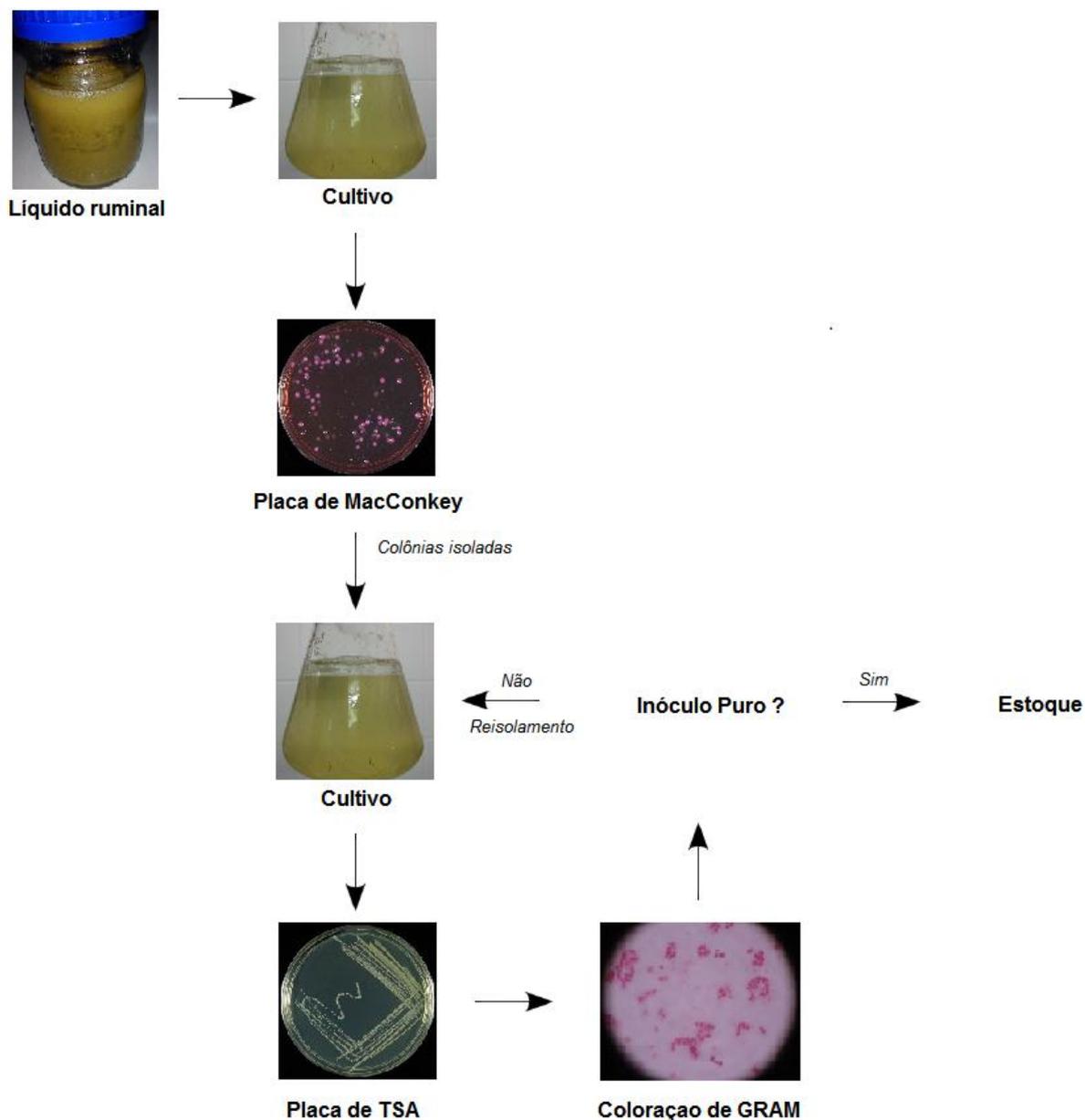


Figura 4 – Esquema do isolamento de micro-organismo degradador de glicerol da flora ruminal de bovino. O cultivo de todos os ensaios foi feito a 37 °C e 24 horas.

### 3.4 Metodologia para identificação de enterobactérias selvagens

Após o isolamento foram realizadas provas bioquímicas de um kit Probac<sup>®</sup> para identificação das bactérias: Prova fermentativa (lactose), prova do TSI (triple sugar iron), prova do indol, prova da utilização do citrato, descarboxilação da lisina, prova da redução dos nitratos, prova da uréase, prova de degradação do triptofano e motilidade.

Uma segunda identificação da espécie bacteriana foi realizada por meio de testes bioquímicos e ensaios de degradação de diversos substratos executados e avaliados automaticamente pelo equipamento BD Phoenix 100 (Figura 5), utilizado para a identificação rápida de bactérias em ambiente hospitalar.



Figura 5 - Aparelho de identificação rápida de cepas bacterianas modelo Phoenix 100 (Becton Dickinson Diagnostics) e placas nas quais são adicionadas as amostras a serem analisadas.

### 3.5 Avaliação de fermentação de glicerol por *Klebsiella pneumoniae*

Os ensaios de fermentação foram feitos em triplicata, eles foram preparados com a adição de 150 mL de meio de cultivo (descrito no item 3.2.1) em erlenmeyers de 250 mL previamente esterilizados. O volume de inóculo adicionado em cada frasco foi de 7,5 mL, com concentração bacteriana aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, que corresponde ao tubo 0,5 da escala de McFarland uma fina camada de óleo mineral (qsp) foi adicionada em todos os frascos como barreira ao oxigênio.

Os frascos com o meio inoculado foram então transferidos para estufa a 37 °C. Foram coletadas alíquotas de 5 mL de forma asséptica, em fluxo laminar, dos frascos de fermentação nos tempo de: 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

As amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a 9000 rpm e 4 °C (JOUAN - Modelo GR 2022), em seguida foram filtradas (porosidade 0,22 µm) e estocadas no congelador para posterior estudo dos metabólitos formados.

Os perfis de fermentação foram analisados em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), utilizando coluna HPX 87H (BioRad) com dimensões de 300 x 7,8 mm, fase móvel acetonitrila/água (35/65, v/v) acidulada (pH 3,3), temperatura de 30 °C e vazão de 0,50 mL/min, segue no anexo III um cromatograma.

Foram utilizados padrões para a comparação com os compostos produzidos sendo eles: Glicerol P.A. 99,5% (J.T. BAKER®), 1,3-Propanodiol 98% (SIGMA-ALDRICH®), 2,3-Butanodiol 97% (SIGMA-ALDRICH®) e Etanol 99,5% (MERCK®).

A conversão foi calculada pela equação abaixo, onde a variável  $P$  são os produtos da fermentação (1,3-Propanodiol, 2,3-Butanodiol ou etanol), a variável  $iG$  é a concentração inicial de glicerol e  $fG$  a concentração final.

$$\frac{P}{fG - iG} \times 100$$

### 3.6 Avaliação de fermentação de glicerina bruta por *Klebsiella pneumoniae*

No ensaio preliminar (item 3.5) foi utilizado glicerol padrão P.A. (Para Análise), para avaliar o potencial do micro-organismo, nesse ensaio o substrato foi substituído por glicerina obtida da produção industrial de biodiesel, 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. 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*.

Este coproduto do biodiesel tem o 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.

A conversão foi calculada pela mesma equação do item 3.5.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Identificação de enterobactéria selvagem

Amostras foram retiradas dos tubos de ensaio e semeadas assepticamente em placas de meio MacConkey e incubadas por 24 horas à 36 °C. Na Figura 6, pode-se observar uma cultura mista. Dessa cultura foram selecionadas colônias diferentes e usadas para chegar a um inóculo puro.

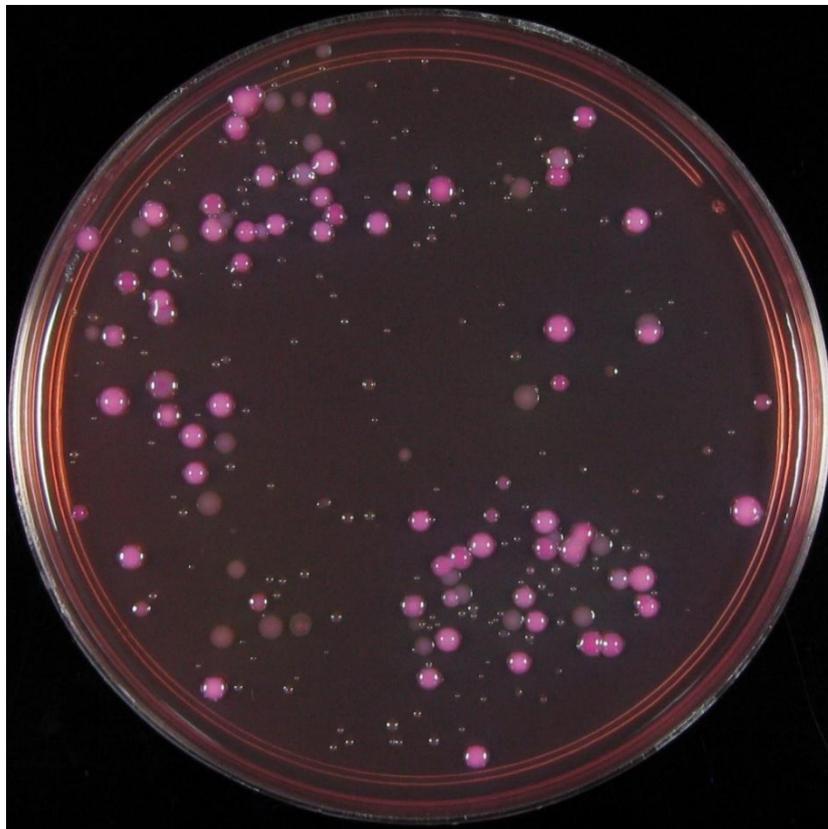


Figura 6 – Meio MacConkey inoculado com líquido ruminal diluído.

Da placa de meio MacConkey foram escolhidas colônias isoladas e feita a coloração de GRAM (Figura 7) para a certificação de colônias puras. Observou-se em microscopia ótica comum (MOC) em óleo de imersão (100x) como sendo bacilos GRAM negativos.

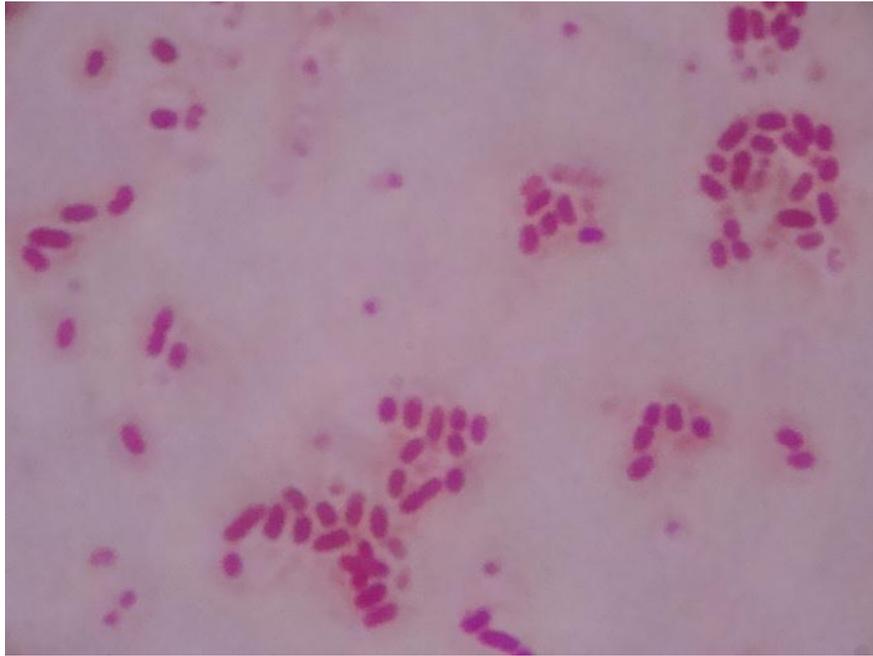


Figura 7 – Bactérias coradas utilizando a técnica de GRAM, onde pode-se observar que são bacilos GRAM negativos, visualização em 100x MOC.

As colônias puras isoladas foram, então, submetidas a diferentes provas bioquímicas, como mostrado nas Figuras 8 e 9.

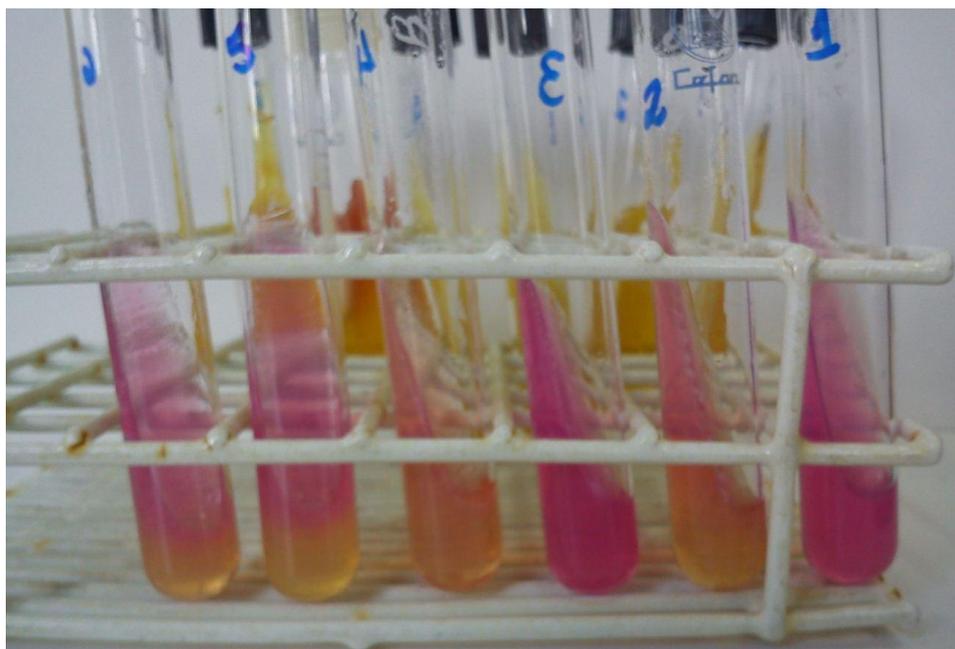


Figura 8 – Prova da uréia dos isolados de rúmen bovino, onde a coloração rosa é positivo.



Figura 9 – Provas do TSI, citrato, EPM (prova de degradação do triptofano, hidrólise da uréia) e MILI (descarboxilação da lisina e motilidade) PROBAC<sup>®</sup>. Ao lado esquerdo as provas sem inoculação, à direita os resultados após 24h de cultivo.

Com os resultados obtidos das provas bioquímicas e a observação tanto da morfologia quanto da coloração de GRAM foi possível elaborar a Tabela 3.

Tabela 3 – Testes bioquímicos para identificação de enterobactérias

Teste	Resultado
-------	-----------

Morfologia	Colônias circulares, convexas, margens lisas, brancas e mucóides
Coloração de GRAM	Negativo
Prova fermentativa	Positivo
Prova do TSI	A/A com formação de gás e negativo para H <sub>2</sub> S
Prova do indol	Negativo
Prova da utilização do citrato	Positivo
Descarboxilação da lisina	Positivo
Prova do nitrato	Positivo
Prova da urease	Positivo
Prova de degradação do triptofano	Negativo
Motilidade	Negativo

Com os dados obtidos foram feitas comparações que indicaram que o isolado se trata de uma *Klebsiella pneumoniae*.

A amostra avaliada pelo equipamento Phoenix 100 também indicou que o micro-organismo isolado é a *Klebsiella pneumoniae* (anexo II). Os resultados do antibiograma mostram que a bactéria isolada é susceptível à maioria dos antibióticos testados.

A bactéria isolada é considerada como nível de biossegurança dois (NB-2) pela CNTBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) o que a classifica como agente de risco moderado, informação importante para possível cultivo em escala industrial.

#### **4.2 Fermentação do glicerol puro por *Klebsiella pneumoniae* isolada do rúmen bovino**

A partir dos resultados obtidos foi construída a Figura 10, que mostra o consumo de glicerol e a produção dos metabólitos 1,3-propanodiol e etanol.

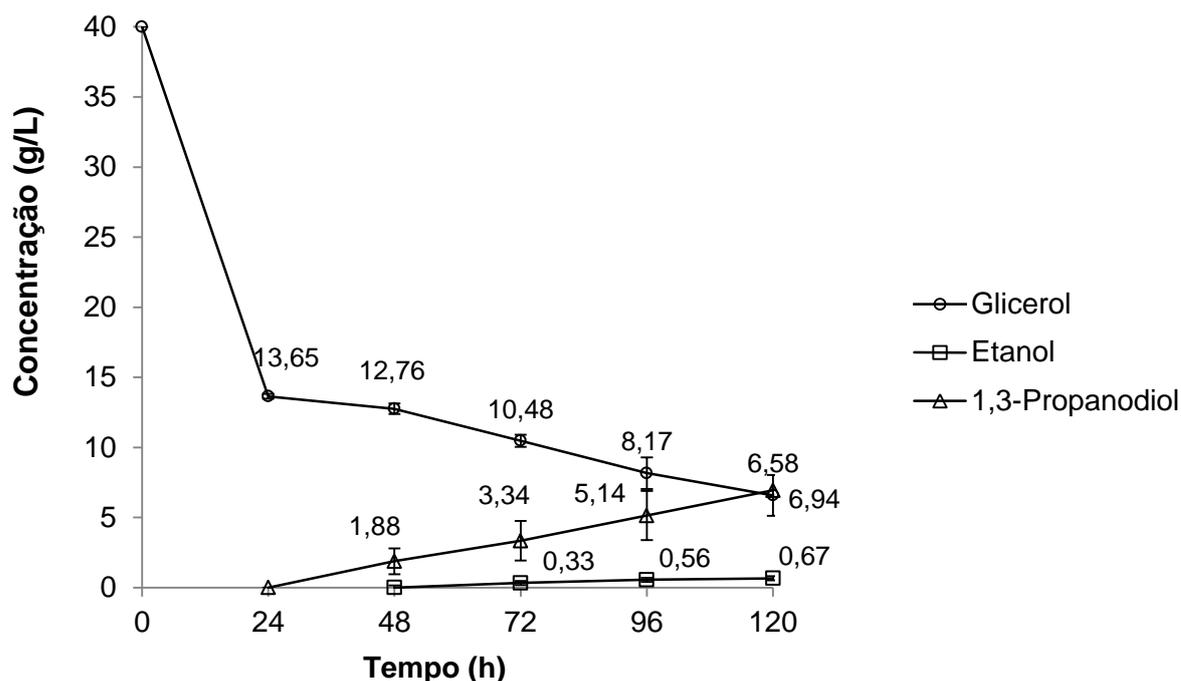


Figura 10 – Consumo do substrato (glicerol) e perfil dos produtos formados: etanol e 1,3-propanodiol. Experimento conduzido com glicerol P.A.

Analisando a Figura 10 é possível notar o consumo quase linear de glicerol após as primeiras 24 horas do cultivo. A produção de 1,3-propanodiol começou após as 24 horas do cultivo e continuou aumentando com o decorrer do tempo. O mesmo ocorreu com o etanol que foi produzido após as 48 horas e continuou aumentando durante o resto do experimento.

Conforme observado por Wu et al. (2011) em seu trabalho utilizando *Klebsiella* sp. HE1 sob condições parecidas de cultivo, apenas adicionando agitação contínua, obtiveram uma produção máxima de 1,3-propanodiol de 9,0 g/L sendo que neste trabalho foi atingida a marca de 6,94 g/L, ainda observando o mesmo trabalho é possível notar que a produção de etanol de 9,8 g/L, superou a do presente trabalho onde se alcançou 0,67 g/L.

Oh et al. (2012) utilizando uma cepa engenheirada, para a maior produção de 1,3-propanodiol, *K. pneumoniae* a “AK-VOT” foi capaz de produzir aproximadamente 8 g/L de 1,3-propanodiol após 24 horas de cultivo e o consumo completo de sua fonte de glicerol que era de 20 g/L com eficiência na conversão de glicerol em 1,3-propanodiol de 40%, resultado superior ao obtido no presente trabalho, mostrando a eficiência da transformação feita na bactéria empregada pelos autores.

Wong et al. (2011) utilizando *K. pneumoniae* HE2 obtiveram a produção de 8,75 g/L de 1,3-propanodiol e eficiência de 21,87% de conversão, valor parecido com o encontrado neste trabalho que foi de 20,76%, sob condições semelhantes de cultivo, quando foi utilizado 80g/L de glicerol, o dobro do usado no presente trabalho, foi obtido 13,2 g/L de 1,3-propanodiol 16,5% de conversão o qual comprova a teoria de que o excesso de substrato inibe as vias enzimáticas. Wong et al. (2011) também imobilizaram células bacterianas por 6 ciclos de cultivos tendo a produção de 6,71g/L de 1,3-propanodiol, inferior do que a obtida anteriormente, porém, é interessante observar que a imobilização de células é um processo que tornaria a produção simples e mais segura.

Um fator que parece variar bastante entre os micro-organismos é o consumo do glicerol, Oh et al. (2012) tiveram todas as 20 g/L de glicerol consumidas em menos de 24 horas de cultivo, Wu et al. (2011) conseguiram a exaustão de glicerol (50 g/L) em menos de 36 horas de cultivo porém Wong et al. (2011) notaram o consumo da mesma quantidade em menos de 30 horas. Entretanto quando no presente trabalho os primeiros 30 g/L de glicerol são consumidos em até 24 horas e o restante ainda continua presente no meio de cultivo após o final do experimento.

#### **4.3 Fermentação da glicerina bruta por *Klebsiella pneumoniae* isolada do rúmen bovino**

Nessa parte do trabalho foi utilizada a glicerina bruta vinda do processo da produção de biodiesel, sua quantidade foi ajustada para que a concentração de glicerol fosse a mesma do experimento anterior, isto é 40 g/L.

Na Figura 11 são mostrados os resultados obtidos.

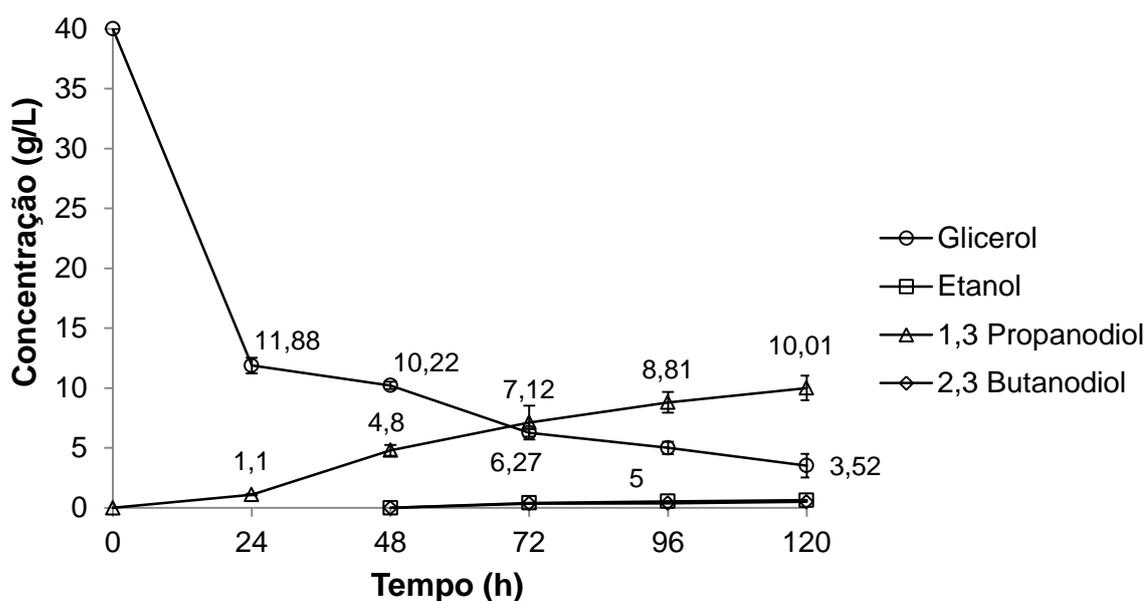


Figura 11 – Gráfico do experimento utilizando glicerina bruta, onde são representados os perfis do glicerol presente no meio reacional e dos produtos formados: etanol e 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol.

O consumo do glicerol foi quase linear havendo um grande consumo imediato do substrato. Houve a produção de 1,3-propanodiol já nas primeiras horas de cultivo, assim, mostrando sua presença na leitura de 24 horas do cultivo. É possível observar a produção de etanol e de 2,3-butanodiol após as 48 horas, suas concentrações estão descritas na Figura 12, em uma escala mais conveniente.

APARICIO-RODRÍGUEZ (2010) obteve em sua tese utilizando condições semelhantes de cultivo e uma *K. oxytoca* a concentração máxima de 11,44 g/L de 1,3-propanodiol tendo utilizado 75 g/L de glicerol no meio de cultivo, tendo uma eficiência de 33% na transformação do substrato o que se mostrou superior ao apresentado neste trabalho onde a eficiência chegou a 27,43% de conversão de glicerol em 1,3-propanodiol.

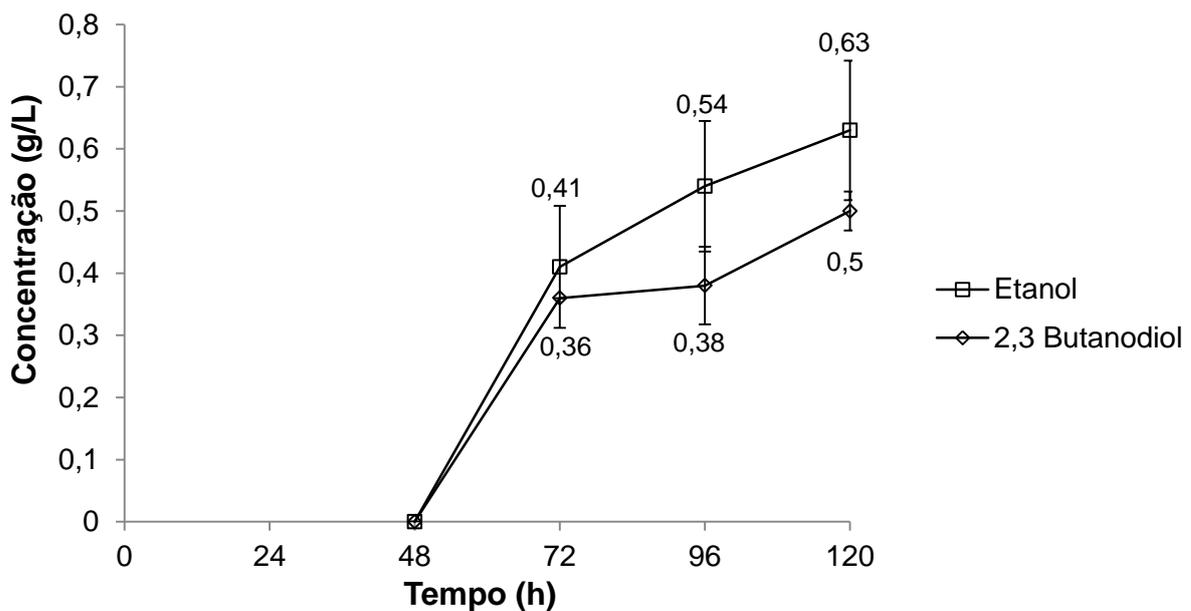


Figura 12 – Concentrações de etanol e 2,3-butanodiol do experimento onde foi utilizado glicerol bruto.

Ainda observando APARICIO-RODRÍGUEZ (2010) é possível notar que sua produção de 2,3-butanodiol foi de 4,24 g/L com a eficiência de 12,2% de conversão, superior à apresentada neste trabalho onde a eficiência foi de 1,37%.

#### 4.4 Fermentação da glicerina bruta por *Klebsiella pneumoniae* isolada do rúmen bovino sem a adição de tioglicolato de sódio

O presente experimento foi conduzido com a utilização de glicerina bruta obtida do processo da produção de biodiesel, como no tratamento anterior, porém não foi feita a adição do reagente tioglicolato de sódio. Os resultados são mostrados na Figura 13.

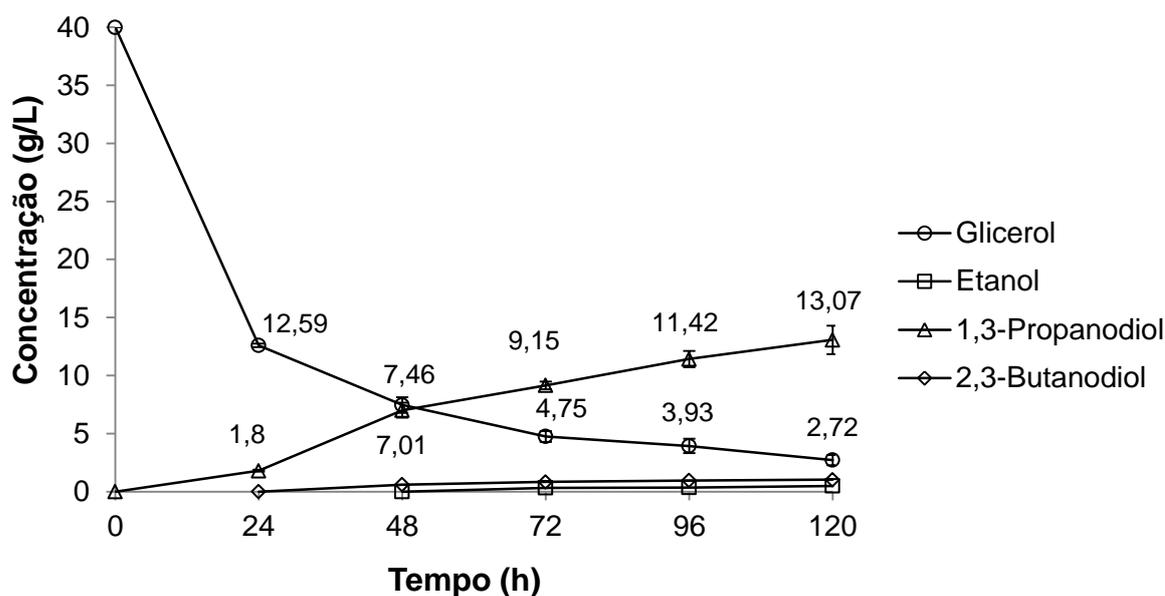


Figura 13 – Gráfico do experimento utilizando glicerina bruta sem a adição de tioglicolato de sódio, onde são representados os perfis do glicerol presente no meio reacional e dos produtos formados: etanol e 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol.

Pode-se observar na Figura 13 o rápido consumo do glicerol do meio de cultivo, com uma tendência de se formar uma curva após as 24 horas do cultivo. Nota-se também a produção do 1,3-propanodiol a partir do primeiro ponto de análise (24 horas). Houve também a produção de etanol e 2,3-butanodiol que foram destacados na Figura 14.

Rossi et al. (2012) realizaram experimentos com *K. pneumoniae* BLh-1 onde empregaram glicerina bruta da produção de biodiesel, nesse trabalho foi obtida a produção máxima de aproximadamente 10 g/L de 1,3-propanodiol utilizando 25 g/L de glicerol no meio, representando uma eficiência de conversão de 40% enquanto a do presente trabalho apresentou 35,06%.

Em um trabalho utilizando *K. oxytoca* FMCC-197, Metsoviti et al. (2012) obtiveram a produção de 12,6 g/L de 1,3-propanodiol utilizando as mesmas condições do presente trabalho com uma eficiência de 36% na conversão semelhante ao do presente trabalho.

Casali et al. (2011) utilizaram *Citrobacter freundii* na fermentação de glicerina bruta obtendo 56% de conversão para 1,3-propanodiol com 60 g/L de glicerol no meio de cultivo e utilizando a bactéria *Pantoea agglomerans* conseguiram

72% de conversão com 20 g/L de glicerol adicionado ao meio de cultivo respectivamente.

Utilizando toda a complexidade bacteriana do lodo Rossi et al. (2012) na fermentação de glicerina bruta na concentração de 70 g/L alcançaram a produção de aproximadamente 23 g/L de 1,3-propanodiol com a eficiência de 32,85%, coincidente alcançada no presente trabalho.

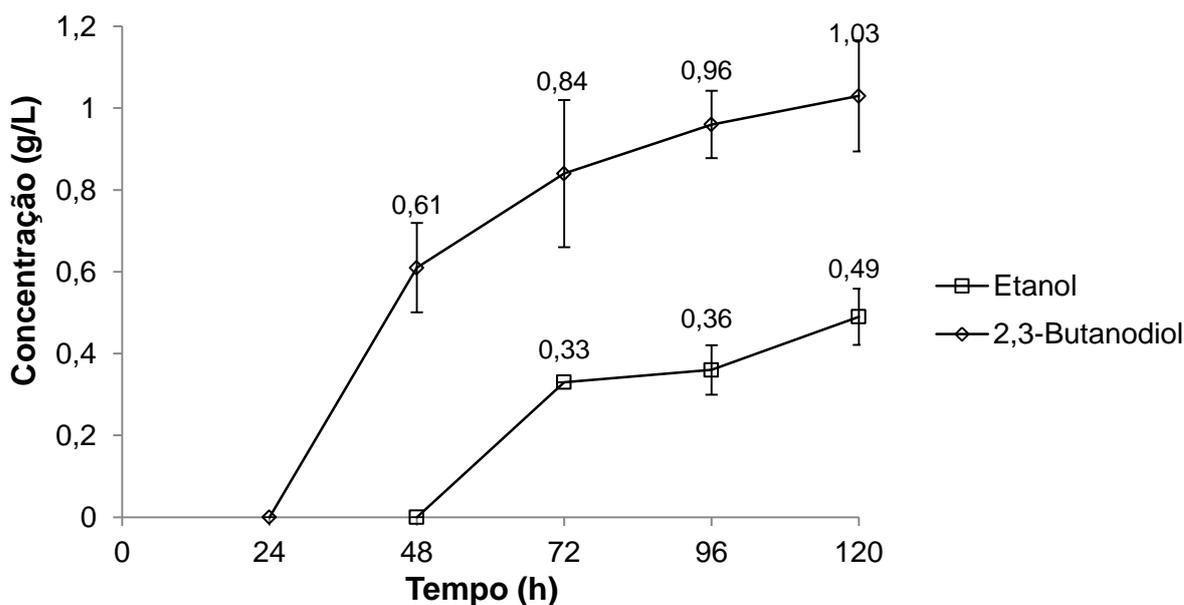


Figura 14 – Concentrações de etanol e 2,3-butanodiol do experimento onde foi utilizado glicerol bruto sem a adição de tioglicolato.

No presente tratamento foram produzidos 0,49 g/L de etanol, com eficiência de 1,31% , bem diferente dos resultados obtidos por Metsoviti et al. (2012) que alcançaram uma eficiência de 7,5% na conversão para etanol utilizando *K. oxytoca* FMCC-197, e que Rossi et al. (2012) onde a eficiência foi de 18% utilizando *K. pneumoniae* BLh-1.

Metsoviti et al. (2012) em experimento com *K. oxytoca* FMCC-197 onde o pH não foi controlado, conseguiram a produção de 4,8 g/L de 2,3-butanodiol e 12% de conversão maior que os 2,76% obtidos no presente trabalho.

#### 4.5 Comparação entre os experimentos.

Comparando os dados obtidos para o consumo de glicerol durante a fermentação por *Klebsiella pneumoniae* foi possível elaborar a Figura 15.

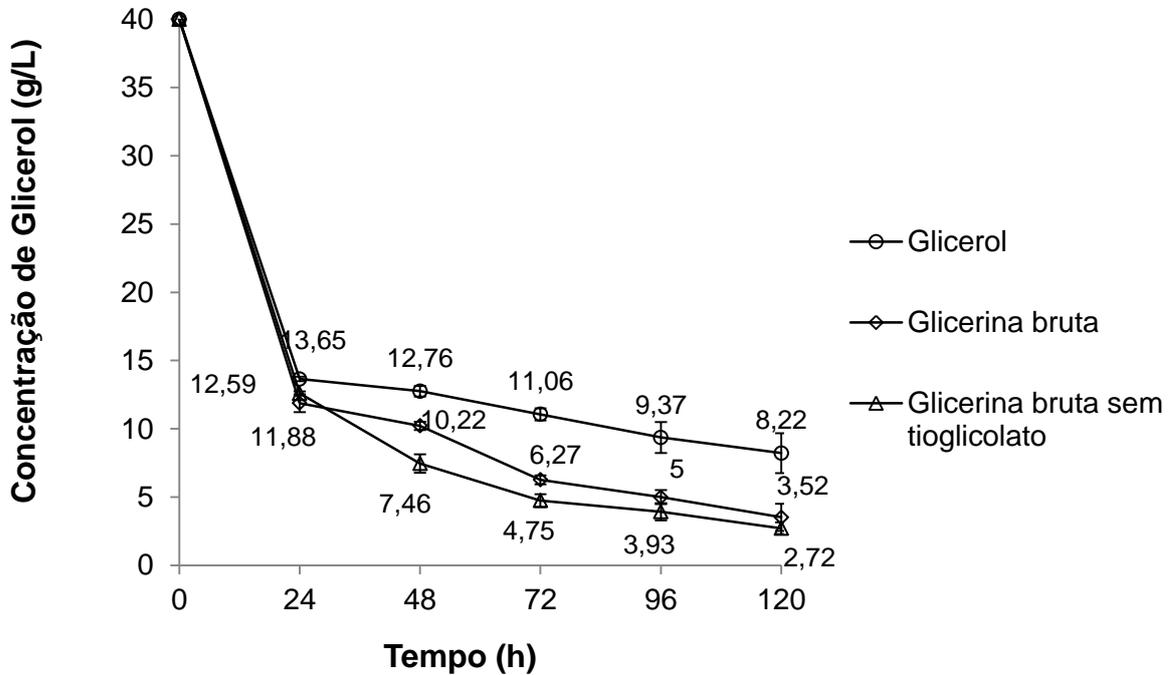


Figura 15 – Comparação entre o consumo de glicerol dos experimentos. Glicerol – meio onde foi adicionado glicerol P.A.; Glicerina – meio onde foi adicionada a glicerina bruta; Glicerina sem tioglicolato – meio onde foi adicionada a glicerina bruta e não foi adicionado tioglicolato.

Observando a Figura 15, pode-se notar o rápido consumo do substrato já nas primeiras horas, cerca de 60 a 70% foi consumido até 24 horas. Ainda observa-se que o consumo do glicerol foi uniforme nos experimentos utilizando a glicerina bruta, sendo um pouco mais consumida no meio sem a adição do tioglicolato.

Na Figura 16 compara-se a produção de 1,3-propanodiol; na Figura 17 mostra-se a produção de etanol e na Figura 18 a produção de 2,3-butanodiol.

Para o 1,3-propanodiol foi elaborada a Figura 16, em que o substrato consistia de glicerina bruta sem a adição de tioglicolato. Esse meio foi melhor para todos os tempos analisados, tendo mais do que o dobro do que o tratamento utilizando glicerol P.A. após 120 horas de cultivo, e foi 30% mais eficiente do que o tratamento com glicerina bruta com adição do tioglicolato.

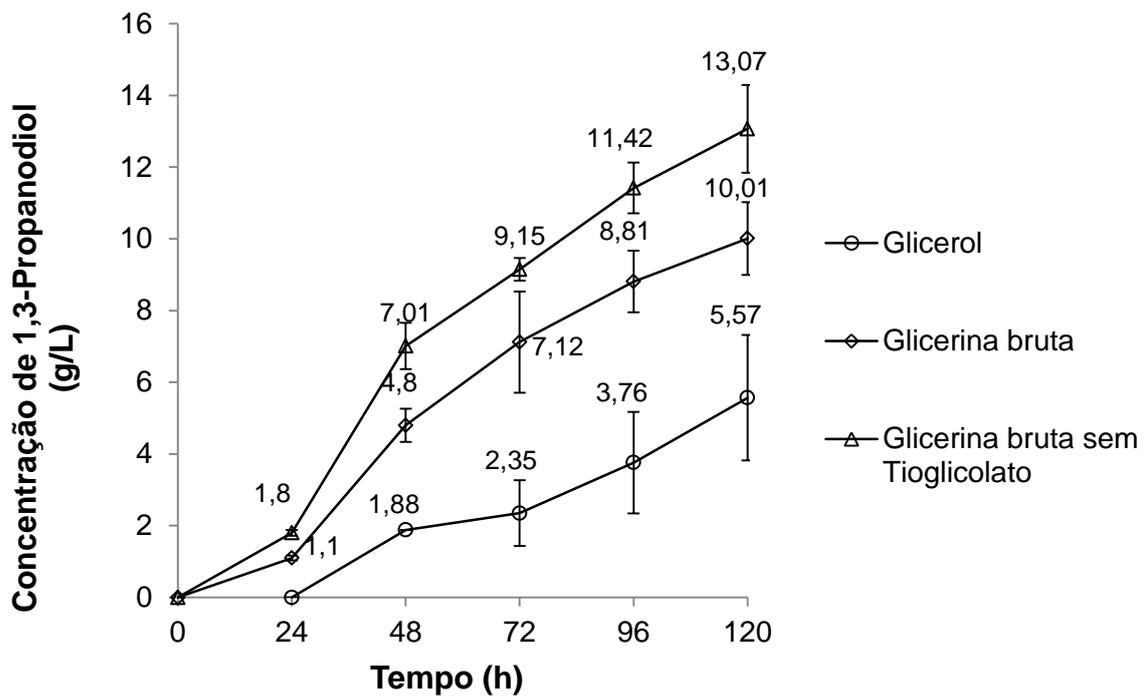


Figura 16 – Comparação da produção de 1,3-propanodiol dos experimentos. Glicerol – meio onde foi adicionado glicerol P.A.; Glicerina – meio onde foi adicionada a glicerina bruta; Glicerina sem tioglicolato – meio onde foi adicionada a glicerina bruta e não foi adicionado tioglicolato.

Observando a Figura 17 onde se mostram os perfis de fermentação para etanol nota-se que os meios onde houve a adição de tioglicolato, produto que é usado para diminuir a concentração de  $O_2$  no meio, houve a produção uniforme de etanol e 30% maior do que onde não foi adicionado do reagente.

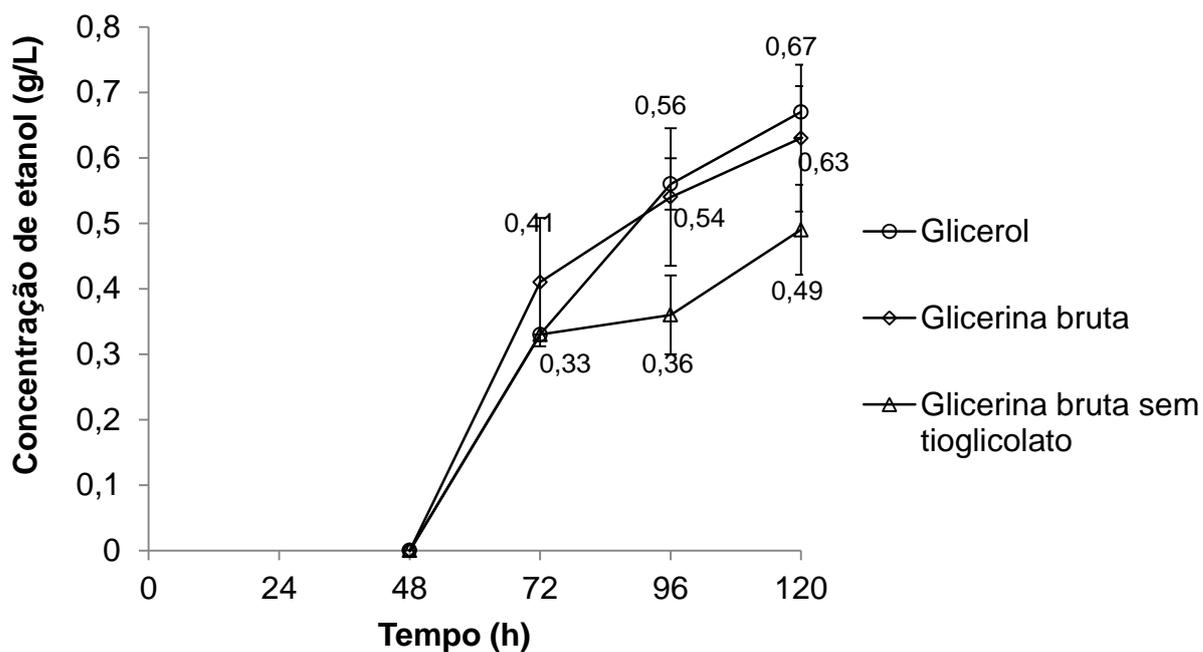


Figura 17 – Comparação da produção de etanol dos experimentos. Glicerol – meio onde foi adicionado glicerol P.A.; Glicerina – meio onde foi adicionada a glicerina bruta; Glicerina sem tioglicolato – meio onde foi adicionada a glicerina bruta e não foi adicionado tioglicolato.

Na figura 18 compare-se a produção de 2,3-butanodiol quando se empregou a glicerina bruta e a glicerina sem a adição de tioglicolato de sódio.

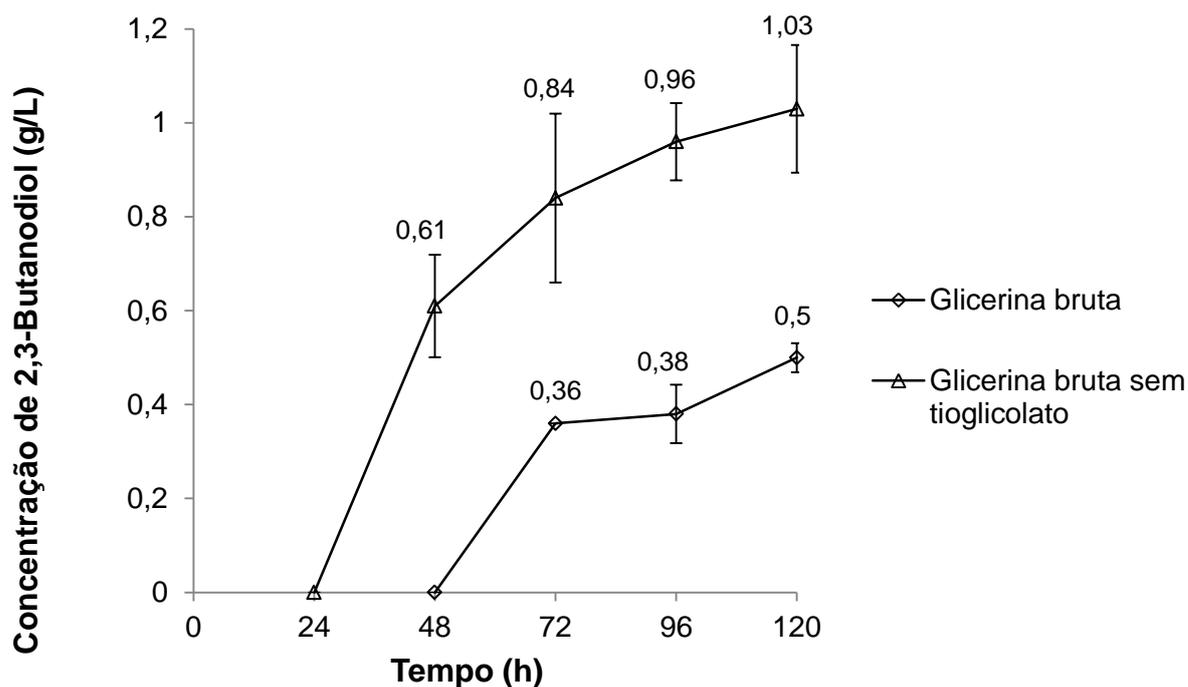


Figura 18 – Comparação da produção de 2,3-butanodiol dos experimentos. Glicerina – meio onde foi adicionada a glicerina bruta; Glicerina sem tioglicolato – meio onde foi adicionada a glicerina bruta e não foi adicionado tioglicolato.

Observa-se na Figura 18 que a produção de 2,3-butanodiol foi maior no tratamento utilizando a glicerina bruta sem a adição de tioglicolato, tendo a eficiência de conversão de 2,76% enquanto o de glicerina com a adição foi de 1,37%.

Esse fato ocorre devido à falta de oxigênio no meio, o que causa a necessidade de converter o piruvato a etanol de forma fermentativa, ao invés de ser convertido a acetoína e depois 2,3-butanodiol.

Na Tabela 4 apresenta-se um comparativo dos resultados obtidos no presente trabalho, com alguns resultados encontrados na literatura.

Tabela 4 – Comparação entre consumo e produção de metabólitos

	Concentração de glicerol (g/L)		Concentração de 1,3-propanodiol		Concentração de etanol		Concentração de 2,3-butanodiol	
	Inicial	Final	g/L	Eficiência	g/L	Eficiência	g/L	Eficiência
Glicerol <sup>a</sup>	40	6,58	6,94	20,76%	0,67	2,0%	-	-

Glicerina <sup>b</sup>	40	3,52	10,01	27,44%	0,63	1,73%	0,5	1,37%
Glicerina sem tioglicolato <sup>b</sup>	40	2,72	13,07	35,06%	0,49	1,31%	1,03	2,76%
Wu et al. (2011) <sup>a</sup>	50	-	12,5	25%	12,12	24,2%	3,3	6,8%
Wong et al. (2011) <sup>a</sup>	20	~5	~8	54%	-	-	-	-
Mesoviti et al. (2012) <sup>b</sup>	60	32,2	10,10	36,3%	5,50	19,8%	4,8	17,3%
Rossi et al. (2011) <sup>b</sup>	~26	~2	~9	37,5%	~5	20,1%	-	-

a – trabalhos realizados com glicerina P.A., b – trabalhos realizados com glicerol bruto

Os tratamentos que utilizaram glicerina bruta foram os melhores nesse trabalho e mostraram-se melhores que alguns encontrados na literatura que utilizam glicerina P.A. Isto pode ser devido à complexidade do substrato, já que ele apresente uma porcentagem de sabões que são fontes de carbono, como mono-, di-, ou triglicerídeos, e também ao fato de uma pequena porção de sais que proveem tanto do substrato, de onde foi extraído o óleo, quanto do processamento e transformação no biocombustível, sendo esses fatores difíceis de serem avaliados.

Vários trabalhos estão sendo produzidos utilizando suplementação dos meios de cultivo. Oh et al.(2012) utilizaram amido e xylose e obtiveram um aumento na produção de 1,3-propanodiol na ordem de 30%. Jin et al. (2011) empregaram o sobrenadante de um hidrolisado de palha de milho em *K. pneumoniae* e conseguiram um aumento de 10% na produção de 1,3-propanodiol.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Foi possível isolar a partir do líquido ruminal bovino e identificar, por meio de cultura, coloração de GRAM e provas bioquímicas, a bactéria *Klebsiella pneumoniae*.

Os metabólitos produzidos e identificados no experimento foram; 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol e etanol.

A *K. pneumoniae* isolada mostrou-se superior na produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol com o meio de cultivo onde havia glicerina bruta e não foi adicionado tioglicolato de sódio. A produção de etanol foi superior no meio onde havia glicerol puro e adição de tioglicolato de sódio.

Com as conclusões obtidas nesse trabalho os autores sugerem:

- Estudo de melhores condições de pH e temperatura para o cultivo da *Klebsiella pneumoniae* em função da produção dos compostos de interesse.
- A continuidade dos estudos com o uso de outras técnicas fermentativas como por exemplo com o uso de agitação e/ou cultivo contínuo.
- A escala ampliação da escala de cultivo.
- Uso de glicerina bruta de outras fontes e/ou com pureza diferente.

## 6 REFERÊNCIAS

ANP, disponível em: <http://www.anp.gov.br/?dw=62234>. Acesso em: 18/10/2012.

APARICIO-RODRÍGUEZ, M. A.; **Biotransformação do glicerol – subproduto da produção de biodiesel**. Tese – Universidade Estadual de Maringá – PEQ, 120p, 2010.

BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ, K. **Global warming and renewable energy sources for sustainable development: A case study in Turkey.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2006.

CASALI, S.; GUNGORMUSLER, M.; BERTIN, L.; FAVA, F.; AZBAR, N. **Development of a biofilm technology for the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) from crude glycerol.** Biochemical Engineering Journal, 2011.

CNTBio, disponível em:  
[http://www.ctnbio.gov.br/index.php?action=/content/view&cod\\_objeto=135](http://www.ctnbio.gov.br/index.php?action=/content/view&cod_objeto=135). Acesso em: 17/06/13.

CHENG, K-K.; ZHANG, J-A.; LIU, D-H.; SUN, Y.; LIU, H-J.; YANG, M-D.; XU J-M. **Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*.** Process Biochemistry. v.42, p.740-744, 2007.

DA SILVA, G. P.; MARCK. M.; CONTIERO. J. **Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology.** Biotechnology Advances v27, 30–39, 2009.

DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. **Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol.** Applied Catalysis a-General, 281: 225-231, 2005.

DHARMADI Y.; MURARKA A.; GONZALEZ R. **Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering.** Biotechnol Bioeng. 5, v-94, 821-9, 2006

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRIGUEZ, J. J.; TEJEDOR, A. **Biodiesel Fuels from Vegetable Oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. Oils with Ethanol.** Energy and Fuels, 16, 443-450, 2002.

FUKUDA, H.; KONDO A.; NODA H. **Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils**. Journal of Bioscience and Bioengineering, 92, 5, p. 405-416, 2001.

GANCEDO, C., GANCEDO, J. M., SOLS, A. **Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production**. European Journal Biochem. 5(2):165–172. 1968.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. **Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process**. Journal of Bioscience and Bioengineering, 100: 260-265, 2005.

JIN, P.; LI, S.; LU, S-G.; ZHU, J-G.; HUANG, H. **Improved 1,3-propanediol production with hemicellulosic hydrolysates (corn straw) as cosubstrate: Impact of degradation products on *Klebsiella pneumoniae* growth and 1,3-propanediol fermentation**. Bioresource Technology, 102, 1815–1821, 2011.

Krieg, N. R.; Holt, J. G.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, Williams & Wilkins, Baltimore, Md, USA, 9th edition, 1994.

MA, F.; HANNA, M. A. **Biodiesel production: a review**. Bioresource Technology, 70, 1-15, 1999.

METSOVITI, M.; PARASKEVAIDI, K.; KOUTINAS, A.; ZENG, A-P.; PAPANIKOLAOU, S. **Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media**. Process Biochemistry 47, 1872–1882, 2012.

OECD SIDS. **Glycerol**. CAS oN: 56-81-5. SIDS Initial Assessment Report. UNEP Publications, Paris, France, 2002.

OH, B-R.; SEO, J-W.; HEO, S-Y.; HONG, W-K.; LUO, L. H.; • SON, J. H.; PARK, D-H.; KIM, C-H. **Fermentation strategies for 1,3-propanediol production from**

**glycerol using a genetically engineered *Klebsiella pneumoniae* strain to eliminate by-product formation.** *Bioprocess Biosyst Eng*, 35:159–165, 2012.

OLIVEIRA, L. B.; MUYLAERT, M. S.; ROSA, L. P.; BARATA, M.; ROVERE, E. **Analysis of the sustainability of using wastes in the Brazilian power industry.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12: 883–890, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. ***Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol.** *J. Appl. Microbiol.*, 92 (4), 737-744, 2002.

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. da. **Glicerol de biodiesel; estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel.** *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 10(37): 44-51, 2008.

ROSSI, D. M.; J. B. C.; DE SOUZA, E. A.; PERALBA, M. C. R.; AYUB, M. A. Z. **Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia** *Renewable Energy*. 39, 223 – 227, 2012.

THOMPSON, J.C.; HE, B. **Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks.** *Applied Engineering and Agriculture*, v.22, p.261-265, 2006.

WANG, Z. X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. **Glycerol production by microbial fermentation: a review.** *Biotechnology Advances*. 19: 201-223, 2001.

WILKE T.; VORLOP KD. **Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry.** *Appl Microbiol Biotechnol*. 66:131–142, 2004

WONG, C-L.; HUANG, C-C.; CHEN, W-M.; CHANG, J-S. **Converting crude glycerol to 1,3-propanediol using resting and immobilized *Klebsiella* sp. HE-2 cells.** Biochemical Engineering Journal. 58– 59,177 – 183, 2011.

WU, K-J.; LIN, Y-H.; LO, Y-C.; CHEN C-Y.; CHEN, W-M.; CHANG, J-S. **Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42, 20 - 25, 2011.

YONG, K. C.; OOI, T. L.; DZULKEFLY, K.; WAN YUNUS, W. M. Z.; HAZIMAH, A. H. **Characterization of glycerol residue from a palm kernel oil methyl ester plant.** Journal of Oil Palm Research, 13,2: 1-6, 2001.

**ANEXOS**





## LAUDO DE ANÁLISES

**Cliente:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**Cidade/Estado:** Maringá-PR

**Produto:** Glicerina

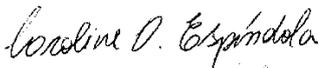
**Tipo:** Glicerina Loira

**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

Nome do Paciente: Pesquisa - UEM ID do Paciente: Pesquisa UEM  
Data de Nascimento: Sexo do Paciente: Não especific.  
Médico que fez o Pedido: Não especificado  
N° de Acesso: AMOSTRA 3B GOMOSA  
Tipo de Amostra: Não Especificado  
Serviço Hospitalar: Não especificado  
Data de Colheita: 11/05/2012 18:13:02  
Comentários sobre a Amostra:

<u>Nome do Teste</u>	<u>N° Isol.</u>	<u>Resultado</u>
NMIC/ID-121	1	Concluído

<u>Nome do Microrganismo</u>	<u>Comentários</u>
1 KPNEUMONIAE Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	

**Notas Taxonômicas**

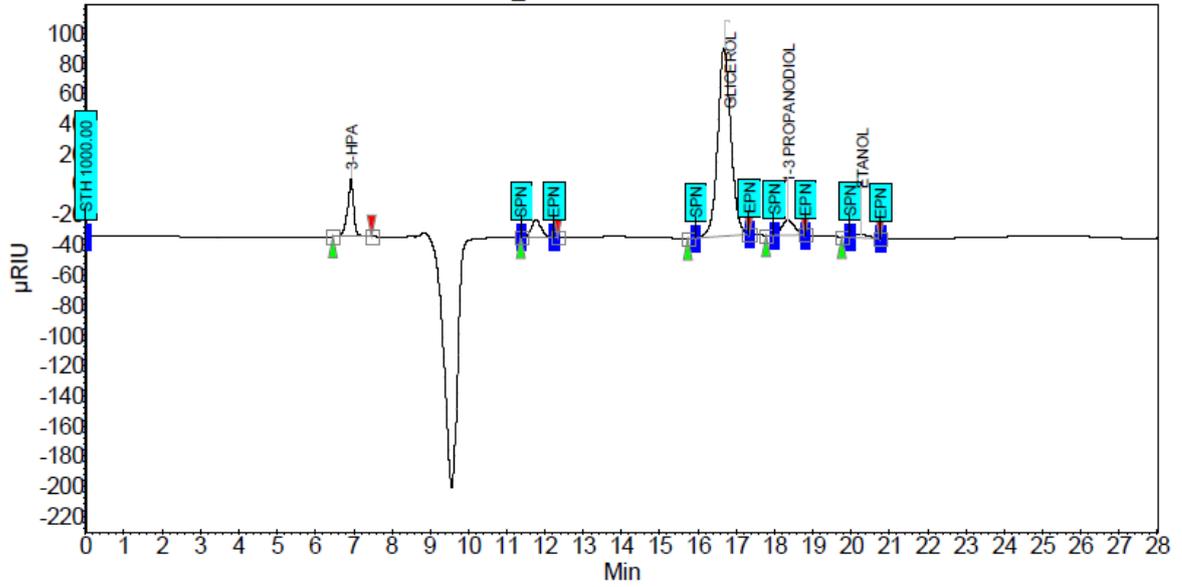
- 1 Anteriormente designado por:  
Klebsiella pneumoniae, Aerobacter aerogenes, bacilo de Friedlander  
Causa importante de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. Associada a pneumonia lobar, infecções urinárias e da árvore biliar, feridas e bacteriemias. Praticamente limitado a indivíduos imunocomprometidos.

Fármaco	PNEUMONIA	
	CIM/Conc	SIR
Amicacina	<=8	S
Amoxicilina-Clavulanato	<=4/2	S
Ampicilina	>16	R
Cefazolina	<=2	S
Cefepima	<=1	S
Cefotaxime	<=4	S
Cefoxitina	<=4	S
Ceftriaxona	<=2	S
Ciprofloxacina	<=0,5	S
Ertapenem	<=0,5	S
Gentamicina	<=2	S
Imipenem	<=1	S
Levofloxacina	<=1	S
Meropenem	<=1	S
Piperacilina-Tazobactam	4/4	S
Tobramicina	<=2	S
Trimetoprim-Sulfametoxazol	<=0,5/9,5	S

Assinatura: \_\_\_\_\_

Teste realizado por equipamento automatizado BD Phoenix através de critérios de interpretação CLSI 2010 e Nota Técnica ANVISA 01/2010. Quando testado tigeciclina são utilizados critérios segundo FDA e Jones et al. (2007).

Amostra Clerio 11\_18.DATA - RI detector Channel



Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [µRIU]	Area [µRIU.Min]	Area % [%]
1	3-HPA	6.94	10.96	38.6	7.2	10.962
2	UNKNOWN	11.77	5.23	11.5	3.4	5.229
3	GLICEROL	16.69	76.30	124.3	49.8	76.300
4	1-3 PROPANODIOL	18.35	6.06	10.1	4.0	6.064
5	ETANOL	20.27	1.45	2.3	0.9	1.446
Total			100.00	186.8	65.2	100.000

CHROMATOGRAM METHOD REPORT :

Control method :

*Varian 900-LC Series HPLC*

*Varian 900-LC Series HPLC Pump(s)*