

Glicerol é um produto gerado em grandes quantidades na síntese de biodiesel, uma indústria em constante crescimento no cenário atual. No entanto, a utilização ou descarte de glicerol é complexa e de alto custo, o que faz crescer o interesse na conversão biológica de glicerol, a qual auxilia a contornar as desvantagens apresentadas por processos puramente químicos. A principal aplicação biotecnológica do glicerol residual tem sido sua biotransformação a 1,3-propanodiol (1,3-PD), um glicol de importância às indústrias têxtil e química.

*K. pneumoniae* é uma bactéria metabolicamente versátil, que vem sendo investigada fortemente como produtora de 1,3-PD sob condições anaeróbicas. No entanto, outros produtos biotecnológicos de importância podem ser obtidos a partir da bioconversão do glicerol, destacando-se 2,3-butanodiol, etanol, além

de ácidos orgânicos como o ácido lático e o ácido acético.

Experimentos em batelada foram conduzidos a fim de obter os parâmetros cinéticos apresentados pela linhagem utilizada, visando possibilitar experimentos sob regime de batelada alimentada utilizando-se uma alimentação fundamentada no equacionamento matemático referente a este modo de operação. A concentração inicial de 15 g·L<sup>-1</sup> de glicerol levou a conversões de substrato a biomassa e a 1,3-PD superiores às aquelas obtidas para concentração de 65 g·L<sup>-1</sup>, além de demonstrar rápido consumo do substrato e formação baixa de ácidos orgânicos, sendo, desta forma, selecionada para a etapa posterior de experimentos em batelada alimentada.

**MICROORGANISMO**

*Klebsiella pneumoniae* BLh-1

**MEIO DE CULTIVO**

- 5 g·L<sup>-1</sup> de Extrato de Levedura
- 5 g·L<sup>-1</sup> de Peptona
- 7 g·L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 7 g·L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1 mL·L<sup>-1</sup> de uma solução de elementos traço:  
0,1 g·L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O  
0,06 g·L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
0,0037 g·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O  
0,2 g·L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  
0,025 g·L<sup>-1</sup> NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  
0,035 g·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O  
0,14 g·L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
0,9 mL·L<sup>-1</sup> HCl 37 %

**EXPERIMENTOS EM BATELADA (DUPLICATA)**

- Fermentadores de 2L (modelo Biostat B da B. Braun Biotech International, Alemanha), contendo:

Controle de pH (utilizando NaOH e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)  
Controle de temperatura  
Agitador de pás planas  
Aerador (utilização de N<sub>2</sub> para anaerobiose)

- Condições de cultivo:

Agitação: 300 rpm  
Temperatura: 37 °C  
pH = 7,0

- Inoculação:

10% v/v com cultura de DO = 1,0 a 600 nm

**MÉTODOS ANALÍTICOS:**

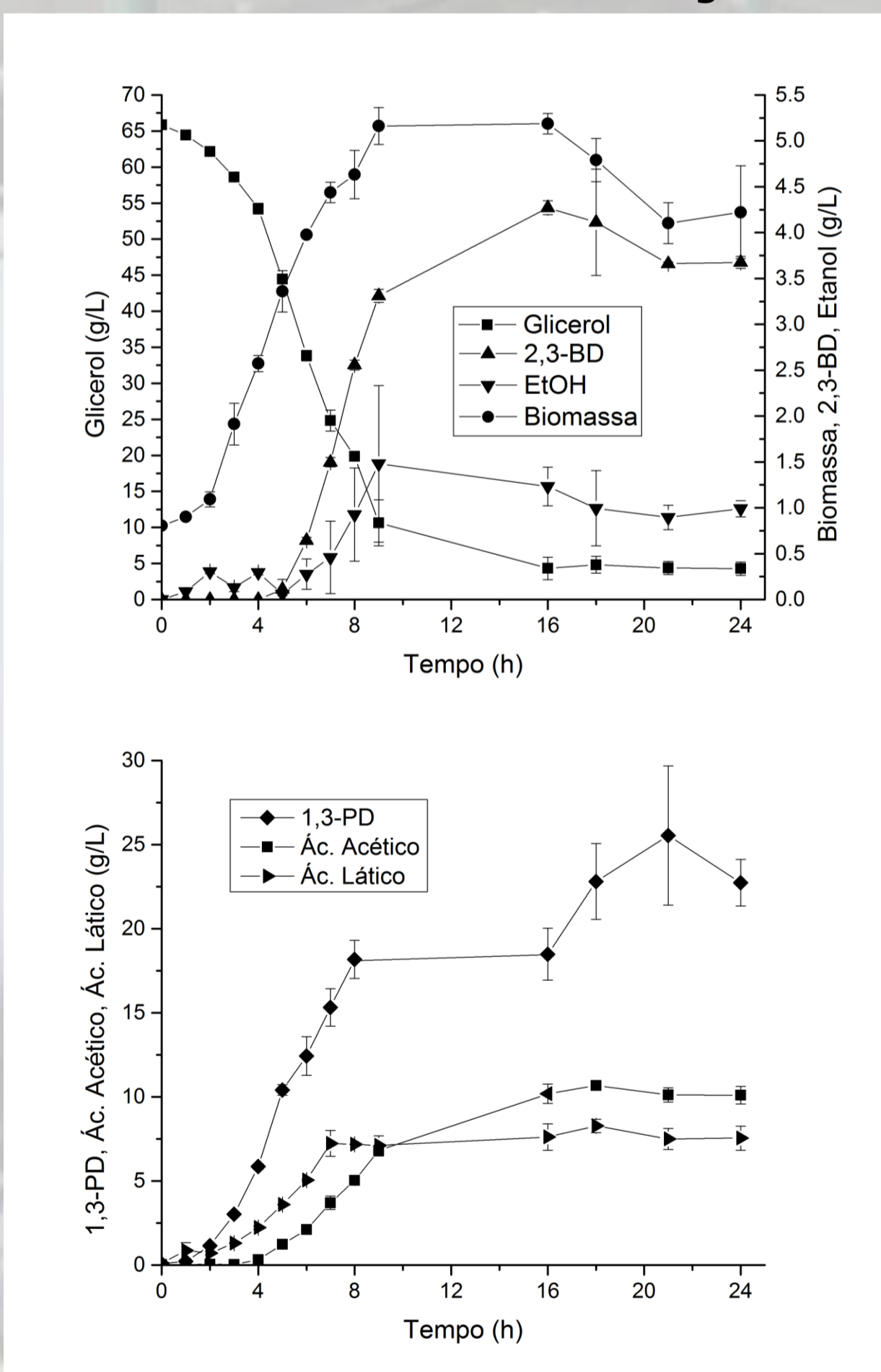
A composição do meio de cultivo foi analisada utilizando cromatografia líquida de alta precisão (HPLC). A fase móvel utilizada foi uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,005 mol·L<sup>-1</sup> alimentada a 0,8 mL·min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna foi mantida a 65 °C. As amostras de cultivo foram preparadas para cromatografia por centrifugação a 3000 g por 15 min, a fim de precipitar as células em suspensão, procedendo-se com filtração da porção sobrenadante utilizando membranas de acetato de celulose (0,22 µm).

A concentração de biomassa foi obtida através de método de peso seco com retirada de amostras em duplicata.

As cinéticas de consumo de glicerol de produção de metabólitos para experimentos com concentrações iniciais de glicerol de 65 e de 15 g·L<sup>-1</sup> são mostradas nas figuras 1 e 2, respectivamente.

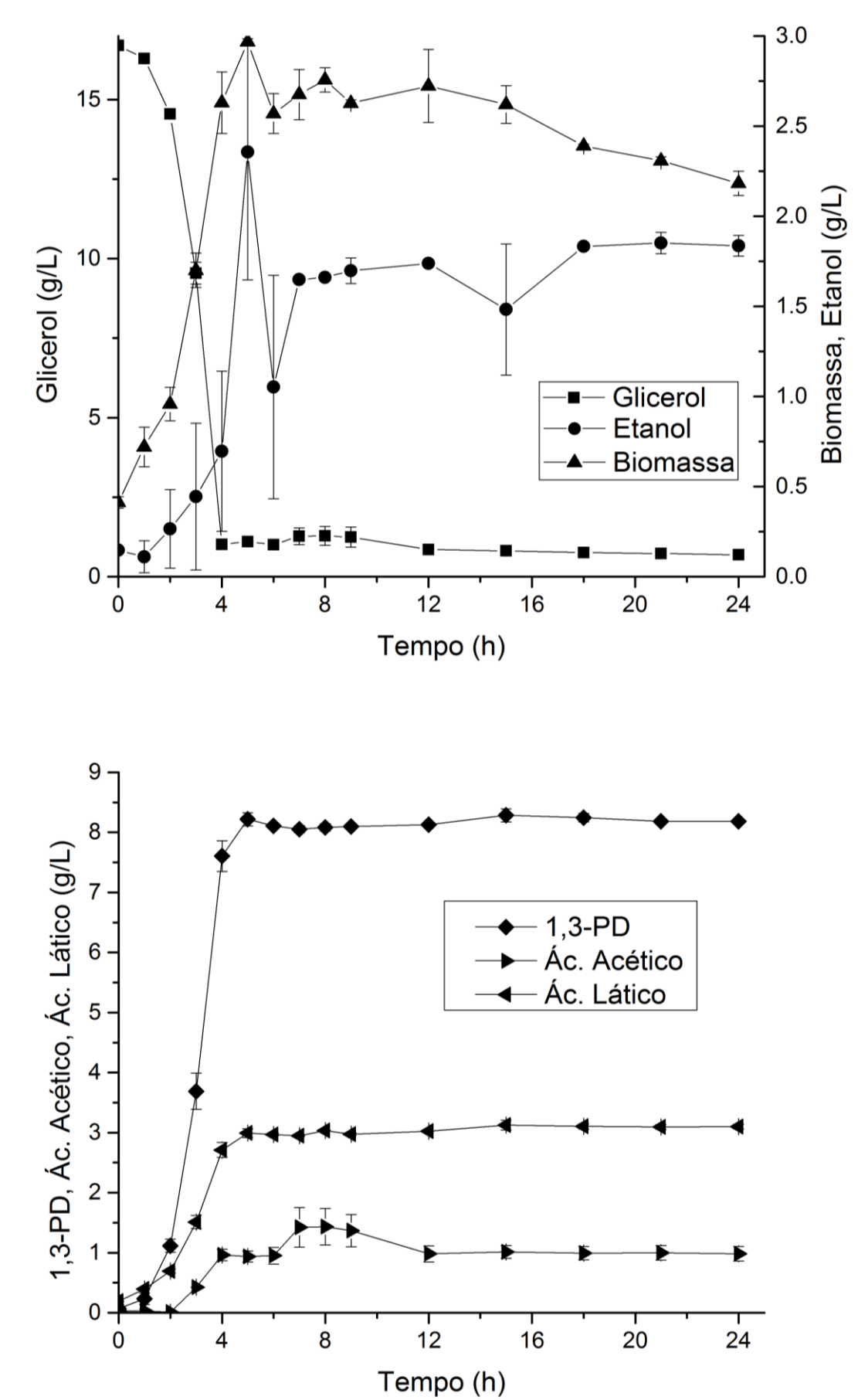
A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) foi calculada para todos os cultivos e seu valor é de 0,35 h<sup>-1</sup>. Quando uma concentração inicial de glicerol de 65g·L<sup>-1</sup> foi utilizada, obteve-se concentrações finais de 1,3-PD, de 2,3-BD e de etanol de 22,7 g·L<sup>-1</sup>, de 3,7 g·L<sup>-1</sup> e de 1,0 g·L<sup>-1</sup>, respectivamente, já nos cultivos em que se utilizou uma concentração inicial de glicerol de 15 g·L<sup>-1</sup>, obteve-se uma concentração final de 1,3-PD de 8,2 g·L<sup>-1</sup> e uma concentração final de etanol de 1,8 g·L<sup>-1</sup>. Notadamente, não ocorreu formação de 2,3-BD para essa concentração inicial de substrato. Em adição, a formação de ácidos orgânicos foi consideravelmente inferior quando se utilizou a concentração de 15 g·L<sup>-1</sup> de glicerol.

**RESULTADOS OBTIDOS COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICEROL DE 65g·L<sup>-1</sup>**



**FIGURA 1.** Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada com concentração inicial de substrato de 65g·L<sup>-1</sup>.

**RESULTADOS OBTIDOS COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICEROL DE 15g·L<sup>-1</sup>**



**FIGURA 2.** Consumo de glicerol e produção de biomassa e metabólitos para cultivo em batelada com concentração inicial de substrato de 15 g·L<sup>-1</sup>.

Através da regressão linear dos dados experimentais, foi possível obter os parâmetros cinéticos desejados para as diferentes concentrações, os quais são apresentados na Tabela 1.

**TABELA 1.** Rendimentos de biomassa e 1,3-PD obtidos experimentalmente.

Concentração (g·L <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/S</sub> (g·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>1,3-PD</sub> (g·g <sup>-1</sup> )
65	0,073	0,38
15	0,13	0,51

A linhagem de *K. pneumoniae* utilizada provou ser uma produtora eficiente de 1,3-PD sob condições anaeróbicas em cultivos sob regime de batelada para ambas as concentrações de substrato iniciais testadas.

Levando-se em consideração as condições gerais desejadas para a operação de cultivos em batelada alimentada, selecionou-se a concentração de glicerol de 15 g·L<sup>-1</sup>, uma vez que esta condição levou a rendimentos superiores de biomassa e de 1,3-PD, aliados a um consumo rápido do substrato inicial e a formação mais baixa dos ácidos orgânicos (ácido acético e ácido lático), os quais

são conhecidos inibidores de bioprocessos. A análise dos dados experimentais para essa condição leva a crer que ao longo de todo o processo, o substrato consumido foi destinado a uma rota metabólica específica que o converte a 1,3-PD.

O final do consumo de substrato (t = 4h) será tomado como tempo para o início dos cultivos em batelada alimentada. a equação que definirá tal alimentação utilizará os parâmetros cinéticos até então obtidos ( $\mu_{m\acute{a}x} = 0,35$  h<sup>-1</sup>, Y<sub>X/S</sub> = 0,13).