



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Jocélia de Sousa Mendes

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE  
GLICEROL BRUTO USANDO *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Fortaleza-Ceará  
2010

Jocélia de Sousa Mendes

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE  
GLICEROL BRUTO USANDO *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira  
Co-orientador: Prof. Dr. Giovanilton Ferreira da Silva

Fortaleza – Ceará  
2010

JOCÉLIA DE SOUSA MENDES

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE  
GLICEROL BRUTO USANDO *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Dissertação submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof<sup>º</sup>. Dr. Giovanilton Ferreira da Silva (Co-orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Estela Aparecida Giro  
Faculdade Ateneu

---

Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes  
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico a Deus, aos meus pais José e Cecília, que sempre me deram apoio e coragem para nunca desistir de meus sonhos, a minha querida filha Maria Eduarda por ser a razão do meu viver e o meu avô Tarcisio (in memoriam) que sempre sonhou com este momento.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser o meu criador, ter sempre guiado meus passos e segurado na minha mão quando mais precisei.

Aos meus pais José e Cecília por terem me apoiado sempre nessa caminhada, por terem tido muita paciência, e como tiveram, e determinação para junto comigo superarem tudo e principalmente pelo apoio incondicional que eles sempre me deram em todos esses anos de minha vida, sempre dispostos a segurar minha barra nas horas mais complicadas e não foram poucas.

A minha linda Maria Eduarda por sempre me dar momentos de muita alegria, por ficar até tarde da noite me esperando sempre disposta a ficar conversando e sorrindo a meu lado, chorando às vezes, mas tudo bem. Por ter sido compreensiva em todas as vezes que a deixei em casa com meus pais, para viajar ou simplesmente dormi no laboratório em nome do trabalho, muito obrigada meu amor.

A minha avó Maria por seu apoio e dedicação.

A minha tia Filomena por ser sempre atenciosa e preocupada com meus trabalhos sempre me dando apoio quando precisei.

As minhas duas irmãs Jocilea e Ana Paula por me ajudarem sempre que precisei, por serem amigas e companheiras por serem simplesmente minhas irmãs.

A minha orientadora, professora Dra Andrea Lopes de Oliveira Ferreira, pelo apoio, dedicação, paciência, compreensão, carinho, amizade e conselhos. Por acreditar em mim. Por estar sempre presente na minha vida. Por sua orientação e dedicação admirável.

Ao professor Dr. Giovanilton Ferreira da Silva por sua atenção e sua disponibilidade sempre que precisei.

A professora Dra Luciana Rocha Barros Gonçalves, por ter me acolhido em seu laboratório desde meu primeiro ano de faculdade e por sempre me dar forças nas horas mais difíceis, sempre disposta e atenciosa.

A Maria Cristiane por ser minha super amiga, amiga desde o 3º ano do segundo grau, por ter me incentivado a cursar Engenharia Química, por sempre me dando apoio incondicional nas minhas loucuras, por nunca se esquecer de mim mesmo estando longe.

A Jouciane por sua amizade, carinho, paciência, atenção e força em todos os momentos de mestrado. Por ser essa pessoa tão especial que me ajudou sempre que precisei, por me atender tarde da noite, por estar presente em minha vida em diversos momentos fosse bom ou ruim, muito obrigada querida.

A Valderez pela sua amizade, carinho e atenção para comigo. Por sempre esta ao meu lado me ajudar em tudo que precisei tanto no laboratório como na minha vida pessoal.

As minhas amigas de graduação Germana, Iresângela (Diniz) e Carlayne por serem simplesmente ótimas amigas, por me ajudarem em todos os momentos fosse bons ou ruins, por passarem noites em claro comigo estudando para as disciplinas.

A todos meus professores do departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará.

Aos dois bolsistas de iniciação científica que tive o prazer de trabalhar Oleon e Regiane por serem dedicados e competentes.

Aos meus queridos amigos de laboratório que de uma forma ou outra, foram essenciais para minha formação, Darlane, Marylane, Marcio, Tigressa, Diego, Kamilly, Jeferson, Jessyca, Márcia, Wellington, Elizabete, Karine, Diogo, Samuel, Humberto, Ítalo, Estela, e em especial ao Álvaro por ser essa pessoa super engraçada que eu brigo muito, mas que adoro, a todos por terem me propiciado bons momentos e serem sempre prestativos e atenciosos comigo e acima de tudo porque são amigos verdadeiros.

Aos meus amigos que conquistei durante esses anos no departamento Lucas, Vinícius, Diôgo, Cezão, Milene, Antônio Anderson, Luciana, Vivian, Elaine, Rosana, Josy, Leonardo e meus amigos do “Sem nome” por me proporcionarem bons momentos de gargalhadas e descontração.

A agência nacional do petróleo pela bolsa fornecida.

A EMBRAPA pela realização da caracterização do glicerol.

Aos funcionários do departamento Luiz, Jorjão, Jorginho por sempre estarem dispostos a me ajudar.

A Maria, secretaria da pós-graduação, pela ajuda sempre que precisei.

“A força não provém da capacidade física,  
e sim de uma vontade indomável.”  
(Mahatma Gandhi)

## RESUMO

Devido à futura escassez dos recursos oriundos do petróleo e o aumento da poluição do ambiente, diversas universidades e empresas estão em busca de fontes renováveis de energia que possuam um baixo custo. O etanol é um bicomcombustível renovável em curto prazo e em alguns casos, para sua produção, são utilizados resíduos industriais, valorizando ainda mais as qualidades do etanol produzido. Devido as inúmeras vantagens que esse biocombustível pode apresentar frente aos combustíveis fósseis faz com que atualmente haja diversas pesquisas para encontrar novas formas baratas para sua produção, assim, a utilização de matérias primas não convencionais vem como um atrativo a mais na produção de etanol. Neste trabalho utilizou-se glicerol bruto, oriundo da produção de biodiesel, como fonte de carbono com o objetivo de dar valor agregado a este resíduo industrial. O glicerol é uma ótima fonte de carbono para fermentação alcoólica, ele possui alto grau de redução e um baixo custo, devido principalmente a crescente oferta no mercado mundial. O glicerol é um subproduto da reação de transesterificação de óleos vegetais. A cada 10 kg de biodiesel produzidos obtém-se 1 kg de glicerol. A produção de biodiesel esta em constante crescimento devido a crescente demanda por combustível, o que acarreta o crescimento da produção de glicerol. Para produção de etanol utilizando este glicerol, realizou-se um estudo com dois microrganismos. Os microrganismos estudados foram uma levedura e uma bactéria, *Saccharomyces sp.1201* e *Klebsiella pneumonia* ATCC 29665, respectivamente. Nesta dissertação, utilizou-se diferentes concentrações de inóculo para os cultivos utilizando *Saccharomyces sp.1201* e diferentes concentrações de glicerol para os cultivos que utilizaram *Klebsiella pneumonia* ATCC 29665. Os resultados com a levedura não foram satisfatórios, pois esta levedura não foi capaz de produzir etanol utilizando glicerol como substrato. Já a bactéria estudada teve uma boa produção de etanol e foi capaz de metabolizar o glicerol do meio fermentativo, chegando a produzir cerca de 1,4 g/L de etanol. Além da produção de etanol, nos ensaios usando a bactéria *Klebsiella pneumonia* ATCC 29665, foram obtidos outros dois produtos de valor agregado, 1,3 propanodiol e ácido acético. Além do trabalho experimental, foram realizadas simulações da fermentação utilizando *K. pneumonia*, para analisar o seu comportamento da fermentação baseado nas variações concentração de glicerol, concentração de inóculo, bypass e zona morta dentro de reator real. Estas simulações visavam analisar as condições de operação numa futura ampliação de escala do processo em escala de laboratório aqui estudado para implantação de uma biorrefinaria. O modelo foi ajustado usando valores ótimos de volume de reator de 1.500 L e bypass de 0.1.

## ABSTRACT

Due to shortage of energy sources and increasing environmental pollution, many universities and companies are in search to renewable energy. Ethanol can be a renewable biofuel in the short term. Besides the numerous advantages of ethanol over fossil fuels, it can be produced from industrial waste. In this work, it was used glycerol as carbon source in order to give value to this waste. Glycerol can be a good carbon source for fermentation, it has a high degree of reduction and a low cost. There is a large supply of glycerol in the world market, because it is a byproduct of the transesterification reaction of vegetable oils, 10 kg biodiesel produced have 1 kg of glycerol. It is known that the production of biodiesel is in constant growth which results in the growth of the production of glycerol. To produce ethanol using glycerol was carried out a study of two microorganisms. The microorganisms studied were a bacterium and a yeast, *Saccharomyces sp.1201* and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29,665 respectively. For this study, it was used different concentrations of inoculum for the runs using *Saccharomyces sp.1201* and different concentrations of glycerol for the runs using *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29,665. The results obtained with yeast have not been satisfactory, this yeast was not able to produce ethanol using glycerol as substrate, however, the bacteria studied presented good production of ethanol and was able to metabolize fermentation media with glycerol, up to produce about 1, 4 g / L of ethanol, also obtained as the reaction product of 1.3-propanediol and acetic acid. We also carried out a simulation of fermentation using *Klebsiella pneumoniae*, and analyzed the behavior of the fermentation process based on the following changes of glycerol concentration, inoculum concentration, bypass and the dead zone inside the reactor. With the simulations it was possible to see how the dead zone and very influential on the reactor performance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2.1	Reação de transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel.....	19
2.2	Fluxograma do processo de produção de biodiesel.....	20
2.3	Reação de síntese do propeno.....	21
2.4	Estrutura do glicerol.....	21
2.5	Setores industriais de utilização da glicerina.....	22
3.1	Ilustração esquemática da fermentação com <i>Saccharomyces sp.</i> 1201.....	32
3.2	Ilustração esquemática da fermentação com <i>Klebsiella p.</i> 396 (ATCC 29665).....	33
3.3	Minicentrífuga utilizada nos experimentos.....	35
3.4	Biorreator com zona morta e bypass.....	36
4.1	Perfil de crescimento e de consumo de glicerol para fermentação utilizando 1 % de glicerol (m/v): (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).....	40
4.2	Perfil de concentração de etanol para fermentação utilizando 1 % de glicerol (m/v): (■) etanol (mmol/L).....	41
4.3	Perfil de crescimento e de consumo de glicerol para fermentação utilizando 0,5 % de glicerol (m/v): (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).....	42
4.4	Perfil de concentração de etanol para fermentação utilizando 0,5 % de glicerol (m/v): (■) etanol (mmol/L).....	42
4.5	Perfil de concentração de glicerol para fermentação utilizando 1 % glicerol P.A (m/v): (▲) glicerol (mmol/L).....	43
4.6	Perfil de concentração de etanol para fermentação utilizando 1 % glicerol P.A (m/v): (■) etanol (mmol/L).....	44
4.7	Perfil de crescimento de biomassa e de concentração de etanol e glicose para fermentação utilizando glicose: (◆) biomassa (g/L); (●) glicose (g/L); (■) etanol (mmol/L).....	45
4.8	Perfil de crescimento e de consumo de glicerol para fermentação utilizando 1% de inóculo (v/v): (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).....	46
4.9	Perfil da concentração dos produtos da fermentação utilizando 1% de inóculo (v/v): (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (◆) 1,3 propanodiol (mmol/L).....	47
4.10	Perfil de crescimento e de consumo de glicerol para fermentação utilizando 10% de inóculo (v/v): (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).....	48
4.11	Perfil da concentração dos produtos da fermentação utilizando 10% de inóculo (v/v): (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (◆) 1,3 propanodiol (mmol/L).....	48

4.12	Perfil de crescimento e de consumo de glicerol para fermentação utilizando 1% de inóculo (v/v) e glicerol PA: (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).....	49
4.13	Perfil da concentração dos produtos da fermentação utilizando 1% de inóculo: (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (◆) ácido acético (mmol/L).....	50
4.14	Perfil de concentração para glicerol e biomassa da simulação com condições iniciais: $C_{S0}$ 600 mmol/L; $X_0$ 0,05 g/L; $\alpha$ 90% e $\beta$ 50%: (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).....	51
4.15	Perfil de concentração dos produtos da simulação com condições iniciais: $C_{S0}$ 600 mmol/L; $X_0$ 0,05 g/L; $\alpha$ 90% e $\beta$ 50%: (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (◆) ácido acético (mmol/L).....	52
4.16	Perfil da concentração de biomassa e glicerol da simulação com condições iniciais: $C_{S0}$ 600 mmol/L; $X_0$ 0,1 g/L; $\alpha$ 90% e $\beta$ 50%: (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).....	53
4.17	Perfil da concentração dos produtos da simulação com condições iniciais: $C_{S0}$ 600 mmol/L; $X_0$ 0,1 g/L; $\alpha$ 90% e $\beta$ 50%: (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (◆) ácido acético (mmol/L).....	53
4.18	Perfil da concentração dos produtos da simulação com condições iniciais: $C_{S0}$ 400 mmol/L; $X_0$ 0,05 g/L; $\alpha$ 10% e $\beta$ 50%: (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).	54
4.19	Perfil da concentração dos produtos da simulação com condições iniciais: $C_{S0}$ 600 mmol/L; $X_0$ 0,1 g/L; $\alpha$ 90% e $\beta$ 50%: (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (◆) ácido acético (mmol/L).....	54
4.20	Perfil da concentração dos produtos da simulação com condições iniciais: $C_{S0}$ 600 mmol/L; $X_0$ 0,1 g/L; $\alpha$ 10% e $\beta$ 50%: (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L)...	55
4.21	Perfil da concentração dos produtos da simulação com condições iniciais: $C_{S0}$ 600 mmol/L; $X_0$ 0,1 g/L; $\alpha$ 10% e $\beta$ 50%: (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (◆) ácido acético (mmol/L).....	56

## LISTA DE TABELAS

3.1	Condições experimentais para cada elemento analisado por espectrometria de absorção atômica.....	30
	Composição do inóculo para <i>Saccharomyces sp.</i> 1201.....	31
3.2	Composição do meio fermentativo para <i>Saccharomyces sp.</i> 1201.....	31
3.3	Componentes do meio de cultivo para <i>Klebsiella p</i> .....	32
3.4	Composição do meio fermentativo para cultivo da <i>Klebsiella p</i> .....	33
3.5	Parâmetros cinéticos utilizados no modelo para simulação.....	38
3.6	Parâmetros utilizados nas simulações da fermentação bactéria <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	38
4.1	Resultado da caracterização do glicerol de soja.....	39

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Biocombustíveis.....	17
2.2	Biodiesel .....	18
2.3	Glicerol.....	21
2.4	Etanol.....	24
2.5	1,3-propanodiol.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	Materiais.....	28
3.1.1	Equipamentos.....	28
3.2	Métodos.....	29
3.2.1	Caracterização do glicerol.....	29
3.2.1.1	Determinação de K e Na.....	29
3.2.1.2	Determinação de P e S.....	30
3.2.1.3	Determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn.....	30
3.2.2	Microorganismos.....	31
3.2.2.1	<i>Saccharomyces sp.</i> 1201.....	31
3.2.2.2	<i>Klebsiella pneumonia</i> 396 (ATCC 29666).....	33
3.2.3	Crescimento celular.....	35
3.3	Determinação da concentração dos produtos da fermentação.....	35
3.4	Modelagem da fermentação de glicerol usando <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
4.1	Caracterização do glicerol.....	41
4.2	Fermentação utilizando <i>Saccharomyces sp.</i> 1201.....	42
4.3	Fermentação utilizando <i>K. pneumoniae</i> 396 (ATCC 29665).....	47
4.4	Modelagem.....	53
5	CONCLUSÃO.....	59
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
	ANEXO A.....	65
	ANEXO B.....	

## INTRODUÇÃO

Devido ao crescimento populacional e industrial, há conseqüentemente um aumento no consumo de energia, principalmente a oriunda dos derivados de petróleo, por serem os mais utilizados há anos, porém os mesmos não são em curto prazo renováveis e são economicamente instáveis.

Esta alta instabilidade dos preços e a futura escassez do petróleo têm impulsionado muitas universidades e empresas privadas a desenvolverem pesquisas que buscam novas fontes de energias. Essas fontes devem ser de baixo custo, renováveis e atendam a grande demanda populacional. A produção de bicomcombustíveis, dentre eles álcool e biodiesel, vêm crescendo e se destacando cada vez mais no mercado mundial, por serem originados de fontes renováveis ou por reaproveitarem resíduos industriais, serem biodegradáveis e terem queima limpa (Vicente et al., 1998). Uma das formas mais promissoras para produção de bicomcombustíveis é a utilização de biomassa. O Brasil foi o pioneiro na utilização de tecnologias limpas (com respeito aos saldos CO<sub>2</sub>) utilizando fontes de energias limpas como o etanol de cana de açúcar (biocombustível). O Brasil é um dos maiores produtores de etanol para fins energéticos.

O etanol é um composto fundamental para a cadeia primária de diversos processos industriais e, nos últimos anos, vem crescendo seu uso como combustível automotivo, o que impulsiona a procura por novos métodos, rotas e microrganismos capazes de produzir etanol. No Brasil o uso de etanol em grande escala como combustível para veículos começou nos anos 70. Atualmente, no Brasil, existem cerca de 2,5 milhões de carros que funcionam com etanol como combustível e a gasolina que é vendida contém 25 % de etanol (anidro). O uso de biocombustíveis certamente continuará a crescer e é de conhecimento geral que a disponibilidade de petróleo é claramente limitada. Estudos para a produção de etanol a partir de biomassa e de resíduos industriais vêm crescendo nestes últimos anos, muitas universidades e empresas estão em busca de formas mais baratas para a produção de álcool, não só de etanol mais outros alcoóis como, por exemplo, butanol.

Um resíduo que está gerando um grande problema no mercado do biodiesel é o glicerol, pois o glicerol é um subproduto da reação de produção de biodiesel. O glicerol está saturando o mercado visto que a cada 10 kg de biodiesel produzido por transesterificação de óleos vegetais ou de gorduras animais são gerados 1 kg de glicerol bruto (González-Pajuelo et

al., 2004; Mu et al., 2006). Esse fato fez com que o preço do glicerol caísse bruscamente e, com o crescente aumento da produção de biodiesel, o excedente de glicerol também crescerá. O glicerol por sua vez é uma ótima fonte de carbono para fermentações anaeróbicas devido seu alto grau de redução (Silva GP, et al, 2008). Alguns microrganismos são capazes de produzir álcool utilizando glicerol como fonte de carbono tais como: *Clostridium butyricum*, *Citrobator*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae* (Zhao et al., 2006).

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo geral estudar a produção de álcool por via fermentativa utilizando como fonte de carbono o glicerol oriundo da indústria do biodiesel. Como objetivos específicos tiveram-se:

- Caracterização do glicerol;
- Seleção de microrganismos capazes de consumir glicerol para produzir álcool;
- Modelagem da fermentação;
- Produção de etanol, 1,3 propanodiol e ácido acético.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biocombustíveis

Atualmente vem crescendo muito a demanda por biocombustíveis. Cada vez mais o preço da gasolina, diesel e derivados de petróleo tendem a subir com o passar dos anos. A cada ano o consumo aumenta e as reservas diminuem. Além do problema físico, há o problema político: a cada ameaça de guerra ou crise internacional, o preço do barril de petróleo dispara a valores absurdos.

A depleção grave de recursos fósseis e um aumento na conscientização ecológica da sociedade levaram à busca de combustíveis a partir de fontes renováveis como a biomassa de plantas. Também há alternativas como: energia solar, da água, do vento e gravidade e de energia obtida por clivagem de radioisótopos têm sido intensamente estudadas. Todas estas fontes de energia renováveis não contribuem para o aumento das emissões de dióxido de carbono e são ambientalmente amigáveis (Antczak et al, 2009). Uma das formas mais promissoras para produção de biocombustíveis é a utilização de biomassa. O Brasil foi o pioneiro na utilização de tecnologias limpas (com respeito aos saldos CO<sub>2</sub>) utilizando fontes de energias limpas como o etanol de cana de açúcar (biocombustível), quando o governo decidiu substituir a gasolina pelo álcool combustível em 1973.

O Brasil, que sempre se destacou como produtor de açúcar, ocupa também um lugar de evidência como o primeiro país a produzir e fazer uso de um biocombustível na sua frota de automóveis (Andrietta et al. 2006). No entanto, o constante aumento da demanda por fontes de energia, as mudanças climáticas causadas pelo aquecimento da atmosfera e o esgotamento das reservas de petróleo de fácil extração, aliado a um desenvolvimento socioeconômico mais intenso, sobretudo nos países em desenvolvimento, têm incentivado a utilização de insumos renováveis, que possam substituir, ao menos parcialmente, os combustíveis de origem fóssil como petróleo, carvão e gás natural. O limite ao uso dos combustíveis fósseis não se dará somente pelo esgotamento das reservas, mas também pela redução da capacidade ambiental do planeta de absorver os gases oriundos de sua combustão (Mota et al., 2009).

O transporte é um dos maiores responsáveis pela emissão de poluentes atmosféricos, uma vez que dependem da combustão de derivados do petróleo como gasolina e

óleo diesel. De toda energia primária consumida no mundo em 1999, 43% veio do petróleo, e desta parcela, 58% destinou-se ao setor de transporte (Ribeiro, 2006).

Em meados de 1980, cerca de 95% dos automóveis produzidos no Brasil foram alterados a combustão de etanol. Veículos *flex fuel*, que foram projetados em 2003, representaram mais de 80% dos automóveis vendidos no Brasil. O uso de biocombustíveis certamente continuará a crescer, pois se sabe que a disponibilidade de petróleo é claramente limitada. As estimativas apontam para um declínio gradual na produção de petróleo e, segundo algumas projeções, acredita-se que as reservas se esgotem em 2050 (Campbell e Laherrère, 1998).

Culturas agrícolas têm sido recentemente submetidas para a transformação em produtos não-alimentares. Nesse contexto, a produção de combustíveis, tais como diéster produzidos a partir de óleo de cozinha ou pró-etanol produzido a partir de cereais, beterraba ou cana de açúcar, constitui um ramo importante. A síntese desses biocombustíveis gera um principal subproduto, a glicerina (glicerol), que tem de ser utilizada ou valorizada para aumentar a rentabilidade do ramo em geral. Este subproduto comum representa de 10 e 6% (m/m) do diéster e produções de etanol, respectivamente, assim podendo surgir um depósito importante de glicerol (Barbirato et al, 1998).

Os óleos vegetais apareceram como uma alternativa de combustível, mas o seu uso direto em motores de combustão interna não constitui uma inovação recente. Em 1900 Rudolf Diesel (1858-1913), inventor do motor do ciclo diesel, utilizou óleo vegetal de amendoim para demonstrar seu invento em Paris (Rabelo, 2001 e Demirbas, 2003).

Após a crise do petróleo iniciada em 1973, todos os países importadores do petróleo foram afetados, principalmente os em desenvolvimento, como o Brasil. Essa crise causou a necessidade de se obter fontes alternativas de energia. Nesse panorama surgiu o biodiesel como opção (Dantas, 2006).

## **2.2 Biodiesel**

O Biodiesel é uma alternativa aos combustíveis derivado do petróleo. Pode ser usado em carros e qualquer outro veículo com motor diesel. Fabricado a partir de fontes renováveis (girassol, soja, mamona, entre outros), é um combustível que emite menos poluente que o diesel.

O que tem sido denominado biodiesel é um combustível ambientalmente correto sucedâneo ao óleo diesel mineral, constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos e de ácidos graxos, obtidos da reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, metanol ou etanol respectivamente (Parente, 2003).

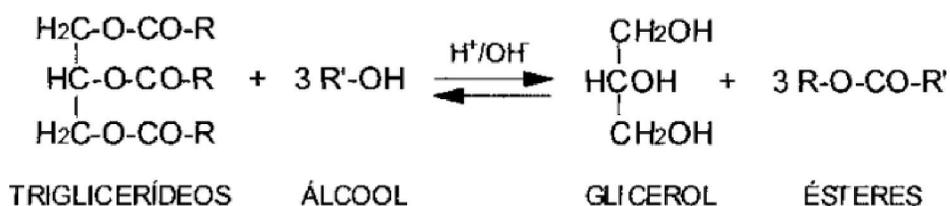
De um modo geral, biodiesel foi definido pela “National Biodiesel Board” dos Estados Unidos como o derivado mono alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores do ciclo Diesel) (National Biodiesel Board, 1998).

Enquanto produto, pode-se dizer que o biodiesel tem as seguintes características: (a) é virtualmente livre de enxofre e aromáticos; (b) tem alto número de cetano, (c) possui teor médio de oxigênio em torno de 11%; (d) possui maior viscosidade e maior ponto de fulgor que o diesel convencional; (e) possui nicho de mercado específico, diretamente associado a atividades agrícolas; (f) no caso do biodiesel de óleo de fritura, se caracteriza por um grande apelo ambiental; e, finalmente, (g) tem preço de mercado relativamente superior ao diesel comercial (Ramos, 1999).

A utilização do biodiesel traz uma série de vantagens ambientais, econômicas e sociais. Estudos demonstram que a substituição do óleo diesel mineral pelo biodiesel resulta em reduções de emissões de 20% de enxofre, 9,8% de anidro carbônico, 14,2% de hidro carbonetos não queimados, 26,8% de material particulado e 4,6% de óxido de nitrogênio (Dantas, 2006). Entretanto, se o processo de recuperação e aproveitamento dos subprodutos (glicerina e catalisador) for otimizado, a produção de biodiesel pode ser obtida a um custo competitivo com o preço comercial do óleo diesel, ou seja, aquele verificado nas bombas dos postos de abastecimento. Por outro lado, enquanto combustível, o biodiesel necessita de algumas características técnicas que podem ser consideradas imprescindíveis: a reação de transesterificação deve ser completa, acarretando ausência total de ácidos graxos remanescentes e, o biocombustível deve ser de alta pureza, não contendo senão traços de glicerina, de catalisador residual ou de álcool excedente da reação.

A utilização de biodiesel no transporte rodoviário pesado oferece grandes vantagens para o meio ambiente, principalmente em grandes centros urbanos, tendo em vista que a emissão de poluentes é menor que a do óleo diesel. Chang et al. ,1999, demonstraram que as emissões de monóxido e dióxido de carbono, enxofre e material particulado foram inferiores às do diesel convencional. No entanto, os níveis de emissões de gases nitrogenados foram maiores para diferentes tipos de biodiesel.

Um combustível originado a partir da biomassa é o biodiesel, produzido a partir de óleos vegetais e gorduras animais. Assim como o etanol pode substituir gasolina em ciclomotores, o biodiesel pode substituir o diesel em motores. A União Européia é a principal produtora de biodiesel com 82% da produção mundial em 2003 (Demirbas e Balat, 2006). De acordo com o European Biodiesel Board (EBB, 2006), a produção estimada de biodiesel em 2005 foi de 3,2 milhões de toneladas e a capacidade de produção em 2006 foi estimada em cerca de 6.069 milhões de toneladas. Os EUA são o segundo maior produtor mundial e produziram cerca de 250.000 toneladas de biodiesel em 2005 (EBB, 2006). A Figura 2.1 mostra a reação de formação do biodiesel pela transesterificação de triglicerídeos com álcool.



**Figura 2.1** – Reação de transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel (Ramos, 1999).

A cadeia produtiva do biodiesel gera como principais subprodutos a glicerina, a lecitina, o farelo e a torta da oleaginosa. Estes devem ser foco de análises detalhadas, pois podem constituir um fator determinante para a viabilidade econômica do biodiesel (Rathmann et al, 2006). O biodiesel é produzido, primariamente, por alcoólise de triglicerídeos com metanol ou etanol. As matérias primas para a produção de biodiesel são oleaginosas, tais como, algodão, amendoim, dendê, girassol, mamona, pinhão manso e soja, bem como, óleos de descarte, gorduras animais e óleos de fritura. Após período de decantação de 24 horas, obtém-se uma fase óleo, constituída por ésteres alquílicos (metílicos ou etílicos), e uma fase glicerínica, constituída por glicerol ou glicerina, principalmente, sabões, álcool (metanol ou etanol), hidróxidos, ácidos graxos e ésteres alquílicos, sendo a composição destes últimos função do tipo de oleaginosa utilizada (Ashby et al., 2006). A proporção entre esses componentes é dependente do processo de transesterificação e da eficiência da separação do biodiesel (Ashby et al., 2006). A Figura 2.2 apresenta um fluxograma deste processo.

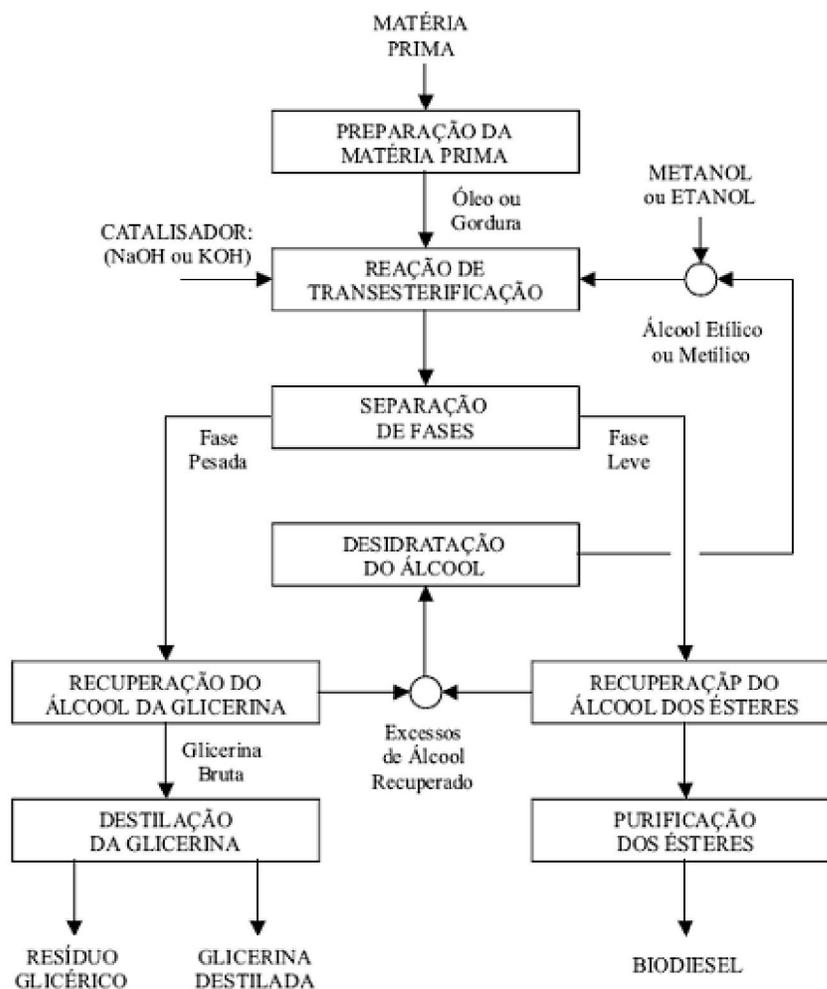


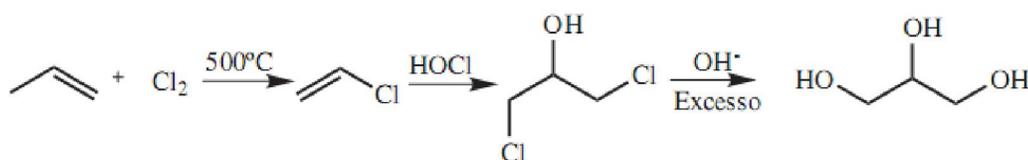
Figura 2.2 – Fluxograma do processo de produção de biodiesel (Parente 2003).

### 2.3 Glicerol

O glicerol (1,2,3-propanotriol ou glicerina) foi descoberto por Scheele em 1779 durante o processo de saponificação de azeite de oliva. Pasteur (1858) também observou sua formação como um subproduto da fermentação alcoólica, em concentrações de 2,5 - 3,6% do conteúdo de etanol (Rehm, 1998), podendo ser o glicerol o segundo maior produto formado durante a fermentação alcoólica (Tosetto e Andrietta, 2003).

O glicerol ocorre naturalmente em formas combinadas, como nos triglicerídeos, em todos os óleos animais e vegetais, sendo isolado quando estes óleos são saponificados com hidróxido de sódio ou potássio, no processo de manufatura de sabões.

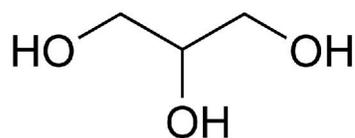
Desde 1949, o glicerol também tem sido produzido comercialmente pela síntese do propeno, conforme mostra a Figura 2.3. Esta rota representa atualmente 25% da capacidade de produção dos EUA e 12,5% da capacidade de produção mundial, mas muitas unidades estão sendo desativadas em virtude da grande oferta de glicerol oriundo da produção de biodiesel. Estima-se que em todo o mundo a produção de glicerol alcançará 1,2 milhões de toneladas por volta de 2012, devido ao aumento da produção de biodiesel (Mota et al., 2009).



**Figura 2.3** – Reação de síntese do propeno (Mota et al., 2009).

A queda do preço da glicerina devido ao aumento da sua oferta tem sido alvo de análises sobre o impacto nos mercados internacional e nacional. De acordo com estudo realizado por Tysson (2005), estima-se que o preço da glicerina pode cair de \$0,50/lb a \$0,35/lb até 2010. De acordo com algumas indústrias químicas nacionais, o preço médio da glicerina caiu de R\$ 3,00 o quilograma, em 2005, para R\$ 1,60 atualmente, atingindo valores de até R\$ 0,60 o quilograma em regiões onde usinas de biodiesel operam ([www.biodieselbr.com](http://www.biodieselbr.com)).

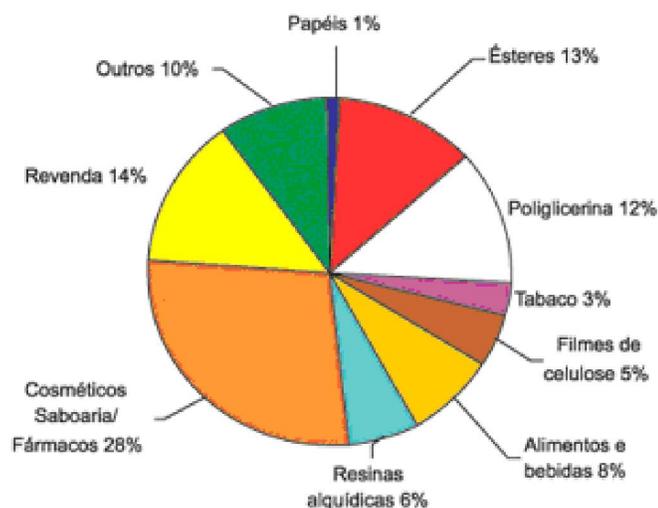
A sua produção microbiológica glicerol é conhecida há 150 anos, no entanto, a sua produção comercial só ocorreu através da síntese de propileno em 1949, devido ao baixo rendimento do processo microbiológico em relação ao processo químico e à dificuldade de sua extração e purificação dos caldos fermentados. O glicerol é um poliálcool de fórmula estrutural apresentada na Figura 2.4.



**Figura 2.4** – Estrutura do glicerol.

O termo glicerol aplica-se somente ao composto puro, 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se à purificação de compostos comerciais que contém normalmente quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol (Morrison, 1994). Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas (Knothe et al., 2006).

O glicerol tornou-se uma fonte de carbono barata e abundante, devido à sua inevitável geração como subproduto da produção de biodiesel. Em todo o mundo o excedente de glicerol pode levar ao encerramento das instalações dedicadas à sua produção ou refinação, além disso, a viabilidade econômica da indústria de biodiesel tem sido muito afetada (Yazdani e Gonzalez, 2007). Na Figura 2.5 são apresentados os principais setores de utilização da glicerina. Pode-se observar que o maior setor de utilização da glicerina está focado na mercado cosmético e farmacêutico.



**Figura 2.5** – setores industriais de utilização da glicerina. (Mota et al., 2009).

O glicerol é atualmente um dos ingredientes mais utilizados na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e anti-sépticos. Por ser não-tóxico, não-irritante, sem cheiro e sabor, o glicerol tem sido aplicado como emoliente e umectante em pastas de dente, cremes de pele, loções pós-barba, desodorantes, batons e maquiagens (emoliência é a sensação aveludada na pele com a aplicação do produto). O glicerol tem sido empregado no

processamento de tabaco a fim de tornar as fibras do fumo mais resistentes e evitar quebras. É empregado na composição dos filtros de cigarros e como veículo de aromas. Amaciar e aumentar a flexibilidade das fibras têxteis. Pode ainda ser empregado como lubrificante de máquinas processadoras de alimentos, fabricação de tintas e resinas, fabricação de dinamite etc. O glicerol pode ser usado como umectante e para conservar bebidas e alimentos tais como refrigerantes, balas, bolos, pastas de queijo e carne, ração animal seca. Todas estas aplicações utilizam hoje principalmente sorbitol. É possível que o glicerol venha a tomar parte dos mercados de sorbitol, se os preços caírem nos próximos anos em função da superprodução, com o biodiesel.

Aplicação exclusiva do glicerol: por ser um componente estrutural de lipídeos, o glicerol tem sido utilizado em preparações de molho para salada, coberturas de doces e sobremesas geladas. Outro mercado muito importante, e exclusivo, que provavelmente vai se desenvolver com a maior oferta de glicerol é a aplicação deste para a síntese de moléculas de alto valor agregado. Entre estas está o PDO (propanodiol), a partir de fermentação do glicerol, para uso em plásticos. Matéria prima do futuro para fermentações de: 1,3-propanodiol e dihidroxiacetona ([www.biodieselbr.com](http://www.biodieselbr.com)).

A família das enterobactérias possui a capacidade de realizar o metabolismo fermentativo de glicerol, essa propriedade é compartilhada por apenas alguns membros, tais como: *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae* (Booth, 2005; Bouvet *et al.*, 1995). É importante ressaltar ainda que o glicerol também é assimilado por algumas leveduras como do gênero *Candida* e *Saccharomyces* e pela bactéria *Clostridium pasteurianum*, resultando em diversos compostos como etanol, 1,3-propanotriol, butanol e butirato (Flores *et al.*, 2000 e Biebl, 2001).

## 2.4 Etanol

Etanol (álcool etílico, álcool de cereais,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$  ou EtOH) é um biocombustível líquido que pode ser produzido a partir de diferentes fontes de biomassa e tecnologias. O etanol é um combustível alternativo atraente porque é renovável e oxigenado, assim reduzindo a emissão de partículas nos motores de ignição (Hansen *et al.*, 2005).

Etanol é um dos mais importantes combustíveis renováveis, contribuindo para a redução dos impactos ambientais negativos gerados pela utilização mundial dos combustíveis fósseis (Cardona e Sánchez, 2007). Etanol tem uma maior octanagem, mais amplo limite de

inflamabilidade, maiores velocidades de chama e superior calor de vaporização do que a gasolina. Estas propriedades permitem uma maior taxa de compressão, menor tempo de queima, que levam às vantagens de eficiência teórica sobre a gasolina em um motor de combustão interna (Balat, 2007). As desvantagens do etanol inclui a sua baixa energia e densidade em relação a gasolina (etanol tem 66% da energia que a gasolina), a sua corrosividade, luminosidade fogo baixo, menor pressão de vapor (tornando difícil o arranque a frio, porém essa última dificuldade tecnológica já foi superada com a implantação dos motores *flex fuel*), miscibilidade com água e toxicidade para os ecossistemas (MacLean, 2003).

O etanol é um combustível oxigenado que contém 35% de oxigênio, o que reduz as emissões de partículas e de NO<sub>x</sub> durante a combustão. O etanol tem um maior número de octanos (108), mais limites de inflamabilidade, maiores velocidades de chama e superior calor de vaporização. Estas propriedades permitem uma maior taxa de compressão e tempo de gravação, que levam a uma eficiência teórica e ter vantagens sobre a gasolina em um motor interno de combustão MIC (Balat et al., 2008).

A crise do petróleo nos anos 70 motivou o governo a desenvolver uma forma alternativa de substituir a gasolina. Nasceu então o etanol, um combustível obtido a partir da fermentação do caldo da cana-de-açúcar, melaço ou ambos. Incentivos foram oferecidos aos investidores do setor. Novas unidades que produziam exclusivamente etanol foram implantadas. Nos anos 80, 85% dos carros eram movidos exclusivamente a álcool. A produção de etanol daquela década chegou a superar a produção de açúcar pelas usinas. As unidades instaladas atingiram, naquele período, capacidade para produzir 18 bilhões de litros de etanol por safra, volume este equivalente a 100 milhões de barris de gasolina. O Brasil, quando criou o Proálcool (Programa Nacional do Álcool) nos anos 70, não tinha a dimensão do impacto desse programa no século XXI. Assim, desde aquela época o Brasil já conta com uma matéria prima adequada para a produção de combustível, a cana-de-açúcar. O aumento da área de plantio e incentivos para instalações de destilarias autônomas foram fortemente estimulados, na forma de financiamento, pelos programas de governo, e desde então, o Brasil passou a contar com inúmeras novas destilarias produtoras de etanol. A frota de veículos leves passou a ser quase que exclusivamente movida a etanol (Andrietta et al, 2006).

Tudo começou com o uso do etanol no mercado interno, em motor de combustão interna (MCI) inventado por Otto de Nikolas 1897 (Rothman, 1983). Alcoóis têm sido utilizados como combustíveis desde o início do automóvel. Misturas de etanol combustível são utilizadas com sucesso em todos os tipos de veículos e motores que exigem a gasolina

(Balat, 2005). O etanol pode ser usado diretamente como combustível, mas na maioria das vezes é misturado com gasolina para melhorar a octanagem, substituir o aditivo tetraetila de chumbo e, além disso, diminuir a quantidade de enxofre contida em nossa gasolina (Staniszewski et al. 2007).

O Programa Nacional de Combustível, iniciado em 1975, estimulou a substituição da gasolina pelo etanol de cana-de-açúcar para o uso em automóvel, e intensificou o uso de uma mistura de etanol e gasolina como combustível para os carros comuns (Soccol et al., 2005). O etanol anidro é adicionado à gasolina na proporção 20-26% em volume (Cortez et al., 2003). Hoje, cerca de 3 milhões de automóveis funcionam em 100% de etanol, e cerca de 60% de todos os veículos novos produzidos no Brasil são "flex fuel", ou seja, eles podem ser usados em qualquer mistura de álcool/gasolina, bem como 100% de álcool (Grad, 2006).

O interesse mundial na utilização de etanol como fonte de energia tem estimulado diversos estudos sobre o custo e a eficácia dos processos industriais para produção de etanol. Intensas pesquisas têm sido realizadas para a obtenção eficiência nos organismos fermentativos, fermentações com substratos de menor custo e melhores condições ambientais (Cysewski e Wilke, 1978). Embora o processo de fermentação para produção de etanol seja bem conhecido e utilizado no Brasil, os custos de produção ainda podem ser reduzidos de modo que uma ampla utilização do etanol, como combustível, seja possível não só no Brasil, mais em todo o mundo. Portanto, o desenvolvimento de processos de fermentação que utilizam fontes de carbono econômicas é importante para a produção de etanol em escala comercial (Cazetta et al., 2007).

Alguns processos biológicos tornaram possíveis rotas para a produção de etanol em grandes volumes, utilizando substratos baratos (Gunasekaran e Raj, 1999). A produção mundial de etanol (todos os graus) atingiu cerca de 51 bilhões de litros em 2006, dos quais 17 milhões foram produzidos no Brasil a partir da cana-de-açúcar. Os Estados Unidos produziram cerca de 18 bilhões de litros de etanol a partir do milho (RFA, 2008). Atualmente, o uso de resíduos industriais para produção de etanol está em franca expansão, diversos estudos estão em desenvolvimento, já é possível produzir etanol de madeira, borra de café, fibras de diversa culturas, dentre elas milho, beterraba, caju, cana-de-açúcar e glicerol.

## 2.5 1,3-propanodiol

O 1,3-propanodiol (PDO) é uma molécula com inúmeras aplicações na indústria de polímeros, cosméticos, alimentos, lubrificantes e remédios. Quando é utilizado como monômero, sua molécula pode participar da síntese de vários poliésteres (PPT, Película de polipropileno). Na presença de outros produtos químicos, diversas propriedades mecânicas são fornecidas para a material final em comparação com os mais convencionais poliésteres (PET, polietileno tereftalato) (Elm et al., 1980).

1,3-propanodiol também pode ser usado como extensor de cadeia para a síntese do poliuretano, lubrificantes, solventes e precursor nas indústrias farmacêutica e química (Deckwer, 1993; Witt et al., 1994). A biodegradabilidade dos plásticos naturais que contêm 1,3-propanodiol é superior em comparação com aquelas de polímeros totalmente sintéticos (Deckwer et al., 1992; Witt et al., 1994).

A produção industrial (PDO) tem atraído a atenção como um importante monômero para sintetizar um novo tipo de poliéster, polytrimethylene tereftalato (PTT) (Biebl et al. 1999). A conversão química tradicional, acroleína em PDO é difícil, tem uma baixa seletividade e conseqüentemente, seu preço elevado tem dificultado o aproveitamento do PDO nas indústrias de polímeros. A conversão microbiana de glicerol a PDO é particularmente interessante neste processo é relativamente fácil e não gera subprodutos tóxicos. Esta conversão também poderia ajudar a reduzir os excedentes de glicerol no mercado.

A produção de 1,3-propanodiol por microrganismos já foi relatado pelos gêneros *Klebsiella* e *Citrobacter* (Homann et al., 1990), *Clostridium* (Forsberg, 1987) e pelo gênero *Enterobacter* (Barbirato et al., 1995). O glicerol pode ser convertido para PDO por vários microrganismos, incluindo *Clostridia*, *Citrobator*, *Lactobacillus* e também *Klebsiella* (Reimann et al. 1998, El-Ziney et al., 1998; Biebl et al., 1998). Entre estes, *Klebsiella pneumoniae* fermenta glicerol a PDO com alto rendimento e produtividade. No entanto, devido à inibição pelo produto (Zeng et al. 1994), é difícil obter uma concentração elevada PDO no caldo de fermentação.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

O glicerol utilizado nas fermentações desta dissertação foi produzido através de reação de transesterificação de óleos vegetais e animais, e gentilmente cedido pela Empresa Brasileira de Bioenergia (EBB). Os reagentes utilizados neste trabalho foram todos de grau analítico e de diferentes marcas comerciais. Os microrganismos utilizados neste estudo foram: a bactéria *Klebsiella pneumonia ATCC 29665* comprada da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos - UFPE e a levedura *Saccharomyces sp.* 1201 gentilmente cedida da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos – UFPE.

Utilizaram-se, durante o trabalho, os seguintes equipamentos: mesa rotatória (TECNAL modelo TE 420), espectrofotômetro (Espectronic instruments), balança analítica (TECNAL), capela de fluxo laminar (LABCONCO), autoclave (PHOENIX) e cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) ou High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Waters) composto por duas bombas (Waters modelo 1525) e dois detectores: índice de refração (Waters modelo 2414) e UV-Vis (Waters modelo 2487). A coluna cromatográfica analítica utilizada foi: supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm, e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm.

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Caracterização do glicerol

A caracterização do glicerol foi realizada gentilmente nos laboratórios do Departamento de Solos e Água da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Para a caracterização do glicerol foi necessário realizar a digestão da amostra utilizando os seguintes passos: adicionou-se 1,0 g de glicerol a tubos de digestão, seguidos de 8 mL da solução ácida (3:1), 600 mL de HNO<sub>3</sub> 65%, p.a. e 200 mL de HClO<sub>4</sub> 72%, deixando

os tubos a temperatura ambiente por 3 a 4 horas. Após este tempo, transferiram-se os tubos para o bloco digestor, elevando lentamente a temperatura até 120°C, permanecendo nesta temperatura até que houvesse todo o desprendimento de fumos castanhos. Após todo o desprendimento do vapor castanho, elevou-se a temperatura para 200°C, a mesma sendo mantida por 3 a 4 horas para que fosse eliminado todo vapor branco presente na amostra, o qual caracteriza o fim da digestão. Após o término da digestão, quando as amostras encontravam-se na temperatura ambiente, transferiram-se as amostras para balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume com água deionizada.

As amostras digeridas foram utilizadas para quantificação de P, K, Na, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn.

#### 3.2.1.1 Determinação de K e Na

Para determinação de K e Na, utilizou-se um fotômetro de chama Digimed modelo DM-61. Calibrou-se o fotômetro e fez-se a leitura da curva padrão com amostras de 10 e 20 mg/L. Após verificação da estabilidade do equipamento, realizou-se a leitura das amostras diluídas em água 1:10.

#### 3.2.1.2 Determinação de P e S

Para determinação de P e S, utilizou-se um Espectrofotômetro FEMTO modelo 600 Plus. Curvas de calibração foram preparadas por diluição de soluções padrão de concentração 1000 ppm. A curva padrão do fósforo foi preparada em erlenmeyers de 25 mL, transferindo-se 5 mL de cada um dos padrões, seguidos de 10 mL da solução diluída de molibdato de amônio e uma pequena quantidade de ácido ascórbico. As leituras foram realizadas após 30 minutos em comprimento de onda de 660 nm.

Para o enxofre, a curva padrão e amostras foram preparadas em tubos de ensaio de 40 mL, transferindo-se 10 mL de cada um dos padrões de S. Adicionando, em seguida, 1 mL da solução de HCl 6,0 N contendo 20 mg/L de S. Acrescentaram-se 500 mg de cloreto de bário, esperando um minuto para a estabilização da amostra. A amostra foi agitada por cerca

de 30 segundos até a completa dissolução do cloreto de bário. Realizaram-se leituras no comprimento de onda de 420 nm. As curvas padrões encontram-se no anexo A.

### 3.2.1.3 Determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn

Para determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn, utilizou-se um Espectrômetro de Absorção Atômica Perkin Elmer, modelo A Analyst 300, através do método de atomização por chama ( $C_2H_2$ /ar), utilizando as seguintes condições experimentais:

Tabela 3.1– Condições experimentais para cada elemento analisado por espectrometria de absorção atômica.

<b>Elementos</b>	<b>Fenda do monocromador (mA)</b>	<b>Comprimento de onda (<math>\lambda</math>) (nm)</b>	<b>Concentrações dos padrões (mg/L)</b>
Cálcio	0,7	422,7	0 e 5
Magnésio	0,7	485,2	0 e 0,5
Cobre	0,5	324,7	0 e 0,5
Ferro	0,2	248,3	0 e 5
Manganês	0,5	279,5	0 a 0,5
Zinco	0,7	213,9	0 e 5

As curvas de calibração foram preparadas por diluição de soluções padrão estoque de concentração 1000 ppm para cada metal.

### 3.2.2 Microrganismos

Utilizaram-se dois microrganismos nesta dissertação, uma levedura e uma bactéria, *Saccharomyces sp.* 1201 cedida pelo Departamento de Antibióticos – UFPE e *Klebsiella pneumonia 396 (ATCC 2966)* comprada do Departamento de Antibióticos – UFPE respectivamente, por serem citadas na literatura aberta como capazes de usar glicerol como fonte de carbono.

### 3.2.2.1 *Saccharomyces sp.* 1201

A levedura foi estocada em tubos e placas de petri com ágar dextrose sabouraud (AS), a mesma permaneceu a 4°C, com repique a cada 60 dias. A composição do meio utilizado para preparação do inóculo da levedura é mostrada na Tabela 3.2. O pH do meio foi ajustado em 5,0. Para preparação do inóculo foram retiradas 3 alçadas, de uma placa de petri contendo a levedura, a placa foi preparada 24 horas antes do início da fermentação, as 3 alçadas foram adicionadas num erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio. O inóculo com as células permaneceu durante 24 horas em mesa rotatória (TECNAL) a 30 °C e 150 rpm.

Tabela 3.2 – Composição do inóculo para *Saccharomyces sp.* 1201

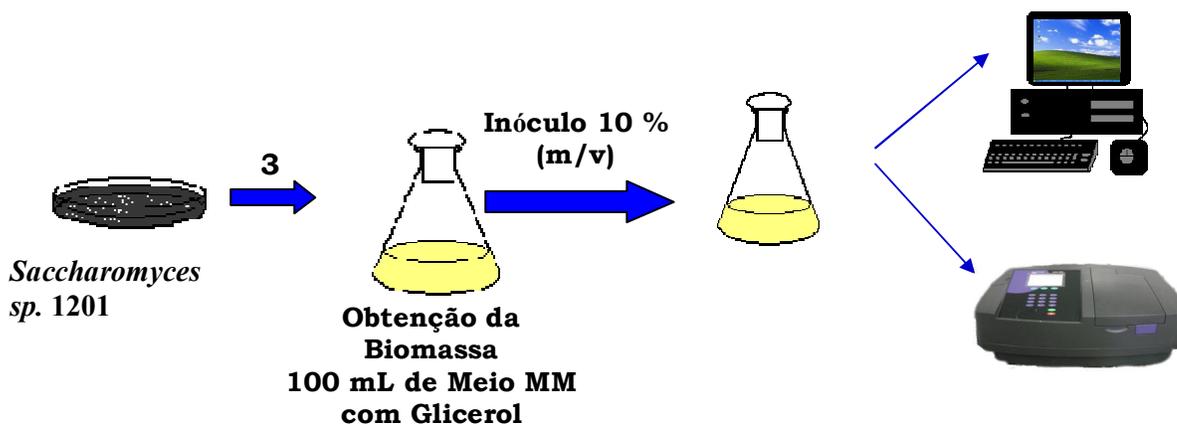
<b>Componentes</b>	<b>Concentrações</b>
Glicose	30 g/L
Extrato de levedura	10 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,65 g/L

Após as 24 horas, centrifugou-se o inóculo a 10.000 rpm para a obtenção da massa de *Saccharomyces sp.* 1201. Adicionou-se 1,2 g de massa de *Saccharomyces sp.* 1201 ao meio fermentativo. A composição dos reagentes utilizados para preparação do meio de cultivo usado na fermentação da *Saccharomyces sp.* 1201 está descrita na Tabela 3.3. Após a preparação do meio de cultivo, fez-se necessário a correção do pH para 5,0.

Tabela 3.3 – Composição do meio fermentativo para *Saccharomyces sp.* 1201

Componentes	Concentrações
Glicerol	1% v/v
Extrato de levedura	5 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,65 g/L

Após a preparação dos meios, estes foram autoclavados em 110 °C por 10 min. As fermentações foram conduzidas em mesa rotatória, utilizando erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo, na temperatura de 30 °C e na velocidade de agitação de 150 rpm. Para análise dos reagentes e produtos, amostras foram retiradas a cada hora para acompanhar o consumo de glicerol e produção de alcoóis. Na Figura 3.1, pode-se observar uma ilustração esquemática da fermentação do glicerol por *Saccharomyces sp.* 1201.

Figura 3.1 – Ilustração esquemática do processo fermentativo para *Saccharomyces sp.* 1201

### 3.2.2.2 *Klebsiella pneumonia* 396 (ATCC 29665)

A bactéria foi estocada a 4°C em placas de petri e tubos de ensaios contendo ágar nutriente (AN), seu repique ocorrendo a cada 60 dias. Os componentes do meio utilizado para o inóculo da bactéria estão descritos na Tabela 3.4.

Tabelas 3.4 – Componentes do meio de cultivo para *Klebsiella p.* (Cheng et al, 2004)

<b>Componentes</b>	<b>Concentrações</b>
Glicerol	20 g/L
Extrato de levedura	1 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,026 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,036 g/L
Elemento traçador	1 mL/L

Para preparação do inóculo foram adicionadas 3 alçadas retiradas de placa de petri contendo *Klebsiella pneumonia* 396 (ATCC 29665), a placa foi repicada 24 horas antes da preparação do inóculo. O inóculo foi conduzido por 18 horas em mesa rotatória na temperatura de 40 °C e velocidade de agitação de 200 rpm. Após as 18 horas de incubação, retirou-se uma alíquota de 1 mL do inóculo e adicionou-se ao meio fermentativo, os componentes do meio fermentativo encontram-se descritos na Tabela 3.5.

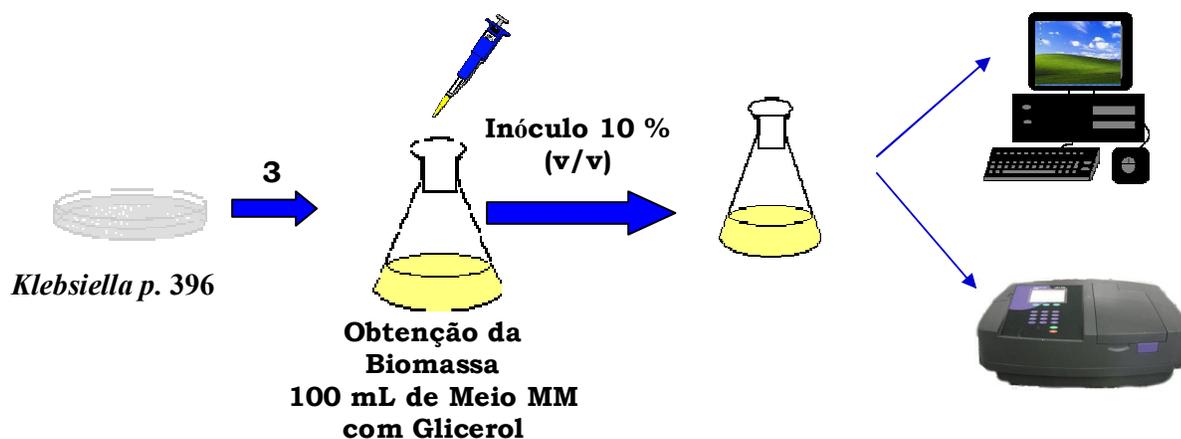
Tabela 3.5 – Composição do meio fermentativo para cultivo da *Klebsiella p.* (Cheng et al, 2004)

<b>Componentes</b>	<b>Concentrações</b>
Glicerol	20 g/L
Extrato de levedura	1 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,026 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,893 g/L
Elemento traçador	1 mL/L

Os pHs do inóculo e do meio fermentativo foram ajustados para 7,0 e, em seguida, autoclavados na temperatura de 110 °C por 10 min (Cheng et al., 2004). As fermentações foram conduzidas em mesa rotatória utilizando erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, na temperatura de 40 °C e velocidade de agitação de 200 rpm,

amostra foram retiradas a cada hora para análise do consumo de substrato e produção da fermentação (Ma et al., 2009).

A Figura 3.4 mostra o esquema ilustrativo da fermentação do glicerol utilizando *Klebsiella p.* para produção de etanol e 1,3-propanodiol.



**Figura 3.2** – Ilustração esquemática do processo fermentativo para *Klebsiella p. 396* (ATCC 29665)

### 3.2.3 Crescimento celular

O crescimento celular foi determinado através da medida da densidade ótica (DO), no comprimento de onda adequado para cada microrganismo, em espectrofotômetro (Genesys, série 20).

Retirou-se 1 mL dos erlenmeyer com o meio fermentativo, colocando-o em uma cubeta de vidro em seguida medindo sua densidade ótica em espectrofotômetro (Spectronic 20 Genesys). Para a *Saccharomyces sp. 1201*, o comprimento de onda utilizado nas medidas foram de 660 nm e para *Klebsiella pneumoniae* de 650 nm (Ma et al., 2009).

### 3.3 Determinação da concentração dos produtos da fermentação

Para determinação quantitativa dos produtos, utilizou-se CLAE para a análise das amostras de reagentes e produtos das fermentações. Para análise dos produtos, amostras de 1 mL foram retiradas dos erlenmeyer no período de uma em uma hora e transferidas para eppendorf de 1,5 mL e centrifugadas. Para a levedura, utilizou-se uma minicentrífuga (HT), sendo a amostra centrifugada por 15 minutos a 6000 rpm, para separação das células. Já para a bactéria, fez-se o uso de uma centrífuga de maior capacidade energética, uma potência de 10.000 g. Após a centrifugação, as amostras foram filtradas em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$ , garantindo que não havia nenhum microrganismo nas amostras que foram injetadas no CLAE.



**Figura 3.3** – Minicentrífuga utilizada nos experimentos com *Saccharomyces sp.* 1201

Os produtos obtidos durante a fermentação foram analisados por CLAE (Waters) equipado com detector índice de refração (modelo Waters 2414) e coluna supelcogel C - 610H, 30 cm  $\times$  7,8 mm (Supelco), a 30  $^{\circ}\text{C}$ , com volume de injeção das amostras de 10  $\mu\text{L}$ , com ácido fosfórico 0,1 M como fase móvel a uma vazão de 0,5 mL/min, no período de 30 minutos.

As concentrações de etanol, 1,3-propanodiol e ácido acético, produtos obtidos durante o cultivo e substrato da fermentação, foram calculadas com base nas áreas cromatográficas de cada substância.

Para cada composto, fez-se uma curva padrão de calibração, suas concentrações são calculadas com base nas áreas dos picos cromatográficos, as curvas para o substrato e os produtos da fermentação encontram-se no anexo B.

### 3.4 Modelagem da fermentação de glicerol usando *Klebsiella pneumoniae*

Com o intuito de analisar o efeito da concentração de glicerol, biomassa, influência da zona morta e bypass na fermentação do glicerol usando *Klebsiella pneumoniae*, desenvolveu-se modelo para um biorreator real mostrado na Figura 3.4. Para isto modelou-se uma combinação de um CSTR ideal de volume  $V_s$ , uma zona morta de volume  $V_d$  e desvio (*bypass*) com vazão volumétrica  $Q_b$ . A vazão real do reator é  $Q_0$  e corrente afluyente no reator é  $Q_s$ . A corrente de desvio e a corrente do efluente do volume de reação são misturados no ponto 2 (ver Figura 3.4).

Na primeira condição assumida pelo modelo, uma parte da corrente de alimentação do reator deixa o biorreator imediatamente e retorna a corrente de saída. Na segunda condição há presença de uma zona de estagnação, em que parte do fluido presente no reator não sofre mistura alguma. Os parâmetros do modelo são  $\beta$ , que representa a fração da vazão total que sofre desvio e  $\alpha$ , que representa a fração de volume total  $V$  ocupada pela região não estagnada. As equações utilizadas para modelar estão listadas a seguir, as equações de balanço de massa foram obtidas segundo Fogler, 1999.

$$Q_s = (1 - \beta) \cdot Q_0 \quad (3.1)$$

$$Q_b = \beta \cdot Q_0 \quad (3.2)$$

$$V_s = \alpha \cdot V \quad (3.3)$$

$$V_d = (1 - \alpha) \cdot V \quad (3.4)$$

$$C_{TG} = \frac{Q_0 - Q_s}{Q_0} C_{TG_0} + \frac{Q_s}{Q_0} C_{TG_s} \quad (3.5)$$

A taxa de diluição do biorreator é definida pela seguinte equação:

$$D = \frac{V}{Q_0} \quad (3.6)$$

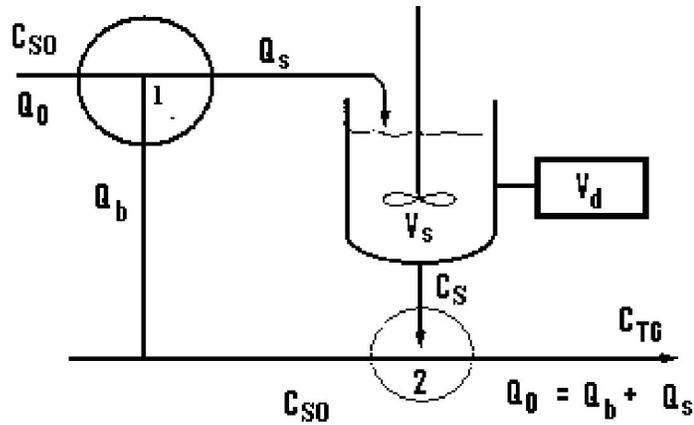


Figura 3.4 – Biorreator com zona morta e bypass (Fogler).

As equações que governam balanço de massa da fermentação que ocorre no biorreator real para os produtos, substrato e biomassa para são apresentadas a seguir nas equações 3.7-3.11 (Xiu et al, 2004).

$$\frac{dC_b}{dt} = C_b(\mu - D) \quad (3.7)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = D(C_{S0} - C_S) - C_b \cdot \zeta_S \quad (3.8)$$

$$\frac{dC_{Pd}}{dt} = D \cdot C_{Pd} + C_b \cdot \chi_{Pd} \quad (3.9)$$

$$\frac{dC_{Ac}}{dt} = -D \cdot C_{Ac} + C_b \cdot \chi_{Ac} \quad (3.10)$$

$$\frac{dC_{Et}}{dt} = -D \cdot C_{Et} + C_b \cdot \chi_{Et} \quad (3.11)$$

Em que  $\mu$  é taxa de crescimento de biomassa,  $\zeta$  é taxa específica de consumo de substrato e  $\chi_{Pd}$ ,  $\chi_{Ac}$  e  $\chi_{Et}$  são as taxas de formação de produtos, 1,3-propanodiol, ácido acético e etanol, respectivamente: e são expressas pelas equações 3.12-3.17 (Xiu et al, 2004).

$$\mu = \mu_m \left( \frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \left( 1 - \frac{C_S}{C_S^*} \right) \left( 1 - \frac{C_{Pd}}{C_{Pd}^*} \right) \left( 1 - \frac{C_{Ac}}{C_{Ac}^*} \right) \left( 1 - \frac{C_{Et}}{C_{Et}^*} \right) \quad (3.12)$$

$$\zeta = m_s + \frac{\mu}{\gamma_s^m} + \Delta\eta_s^m \frac{C_s}{C_s + K_s^*} \quad (3.13)$$

$$\chi_{Pd} = m_{Pd} + \mu\gamma_{Pd}^m + \Delta\eta_{Pd}^* \frac{C_s}{C_s + K_{Pd}^*} \quad (3.14)$$

$$\chi_{Ac} = m_{Ac} + \mu\gamma_{Ac}^m + \Delta\eta_{Ac}^* \frac{C_s}{C_s + K_{Ac}^*} \quad (3.15)$$

$$\chi_{Et} = \zeta\gamma_{Et}^m \quad (3.16)$$

$$\gamma_{Et}^m = \frac{b_1}{(c_1 + D \cdot C_s)} + \frac{b_2}{(c_2 + D \cdot C_s)} \quad (3.17)$$

Para *Klebsiella pneumoniae* cultivada sobre condições anaeróbica de pH 7,0 e temperatura de 37°C, a taxa de crescimento de biomassa ( $\mu$ ) e a constante de saturação para o glicerol  $K_s$  são 0,67 h<sup>-1</sup> e 0,28 mmol/L, respectivamente. As concentrações críticas de glicerol, 1,3-propanodiol, ácido acético e etanol para a taxa de crescimento da biomassa foram 2039, 934.3, 1026 e 360.9 mmol/L, respectivamente. Os parâmetros  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  na Eq 3.17 são 0,025, 5.18, 0,06 e 50,45 mmol/Lh, respectivamente. Os outros parâmetros cinéticos são apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Parâmetros cinéticos utilizados no modelo para simulação (Xiu et al, 2004).

Reagentes/Produtos	Parâmetros cinéticos			
	M	$\gamma^m$	$\Delta\eta^m$	$K^*$
Glicerol	2,20	0,0082	28,58	11,43
13-Propanodiol	-2,69	67.69	26,59	15,50
Ácido acético	-0,97	33,07	5,74	85,71

Foram realizadas modelagens e simulação da fermentação no software MATLAB versão 7.0, variaram-se as condições iniciais de glicerol ( $C_{S0}$ ), biomassa ( $X_0$ ), volume real do reator ( $\alpha$ ) e bypass ( $\beta$ ) apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Parâmetros utilizados nas simulações da fermentação bactéria *Klebsiella pneumoniae*.

Parâmetros	Concentrações
Glicerol	400 – 600
Biomassa	0,05 – 0,1
Volume real do reator	0,1 – 0,9
Bypass	0,5 – 0.9

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Caracterização do glicerol

A Tabela 4.1 apresenta o resultado obtido da caracterização do glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel usado em todo este trabalho. Esta caracterização foi realizada conforme descrita na seção 3.2.1. Pode-se observar a presença de diferentes micronutrientes os quais poderiam participar do metabolismo dos microrganismos usados nesta dissertação.

Tabela 4.1 – Resultado da caracterização do glicerol de soja

<b>Substâncias</b>	<b>Concentração (mg/kg)</b>
Cálcio	4,2
Magnésio	1,2
Potássio	2312,5
Enxofre	160
Sódio	4987,5
Ferro	6,6
Cobre	-
Zinco	-
Fósforo	193,3
Manganês	-

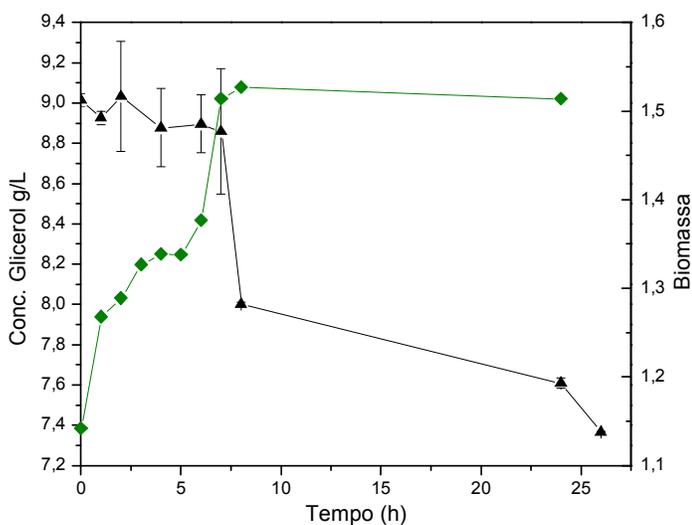
Esta caracterização foi realizada com o objetivo de verificar a presença ou ausência de micro elementos que pudessem inibir ou ativar a produção de etanol, uma vez que os microrganismos necessitam de minerais para desenvolver seu metabolismo. Portanto, a partir desse resultado optou-se por não se acrescentar minerais ao meio de cultivo nos ensaios aqui realizados.

## 4.2. Fermentação utilizando *Saccharomyces sp.* 1201

Realizaram-se fermentações com o microrganismo *Saccharomyces sp.* 1201 em diferentes condições experimentais objetivando a produção de etanol a partir da utilização de glicerol oriundo da indústria de biodiesel como fonte de carbono. As fermentações foram conduzidas nas condições de cultivo anteriormente descritas na seção (3.2.2.1).

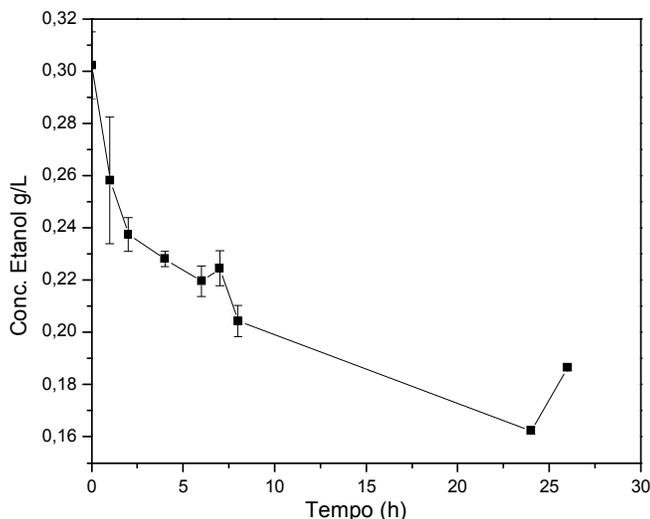
Para as fermentações iniciais usando a levedura *Saccharomyces sp.* 1201, variou-se a concentração de glicerol no meio de 0,5% a 1% (m/v) e se fixou a concentração de inóculo em 1% (v/v). Essa concentração de inóculo foi investigada e se encontrou que é a usualmente utilizada na literatura aberta. As fermentações foram acompanhadas retirando-se amostras em intervalos de 1 em 1 hora até o período de 8 horas de fermentação. Após 8 horas de fermentação, o erlenmeyer continuou na mesa rotatória nas condições adequadas para retirada do ponto de 24 horas, para análise da produção de etanol e consumo de glicerol, pois esses ensaios iniciais foram exploratórios. Portanto, desejava-se verificar o intervalo de tempo no qual a velocidade de produção de etanol iria modificar-se.

As Figuras 4.1 e 4.2 mostram os resultados obtidos para a fermentação utilizando 1% m/v de glicerol como fonte de carbono. Pode-se observar que até 5 horas de cultivo praticamente não se observou consumo de glicerol (Figura 4.1), além disso, houve consumo do etanol residual proveniente do inóculo (Figura 4.2).



**Figura 4.1** - Perfil de crescimento e de consumo de glicerol para fermentação utilizando 1% de glicerol (m/v):

(◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (g/L)



**Figura 4.2** – Perfil de concentração de etanol para fermentação utilizando 1% de glicerol (m/v): (■) etanol (mmol/L).

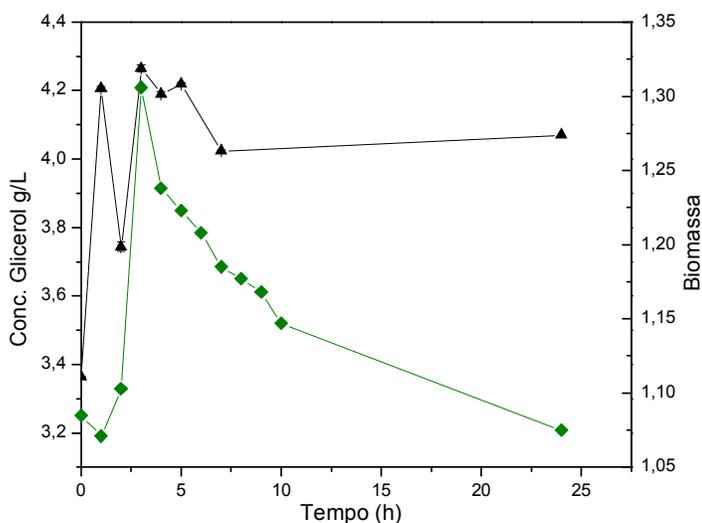
Analisando a Figura 4.1, pode-se observar que o consumo de glicerol foi baixo, cerca de 25% do total inicial adicionado ao meio de cultivo. No início da fermentação havia cerca de 9 g/L de glicerol, entretanto, após 26 horas de cultivo ainda era possível observar cerca de 7,4 g/L de glicerol no meio de cultivo, ou seja, o microrganismo não foi capaz de metabolizar o glicerol para produção de etanol, apenas usou o glicerol para fazer sua manutenção.

Analisando a Figura 4.2, observa-se que não houve formação de etanol. No início da fermentação havia uma pequena quantidade de etanol presente no meio. Este etanol é oriundo do inóculo, como um contaminante do glicerol oriundo da indústria do biodiesel. O etanol presente no decorrer da reação foi completamente consumido. Este consumo de etanol aconteceu devido ao etanol também ser uma fonte de carbono para a *Saccharomyces sp.* 1201 muito mais acessível que o glicerol (molécula muito maior), assim ficando claro que não houve produção de etanol nesta fermentação. O consumo das fontes de carbono nesse ensaio aconteceu somente para manutenção do microrganismo, uma vez que o etanol é uma fonte de carbono mais assimilável que o glicerol.

Com o objetivo de verificar a falta de produção de etanol nesta fermentação, já que era esperado que essa linhagem de *Saccharomyces sp.* 1201 fosse capaz de metabolizar glicerol, realizou-se outra fermentação, agora utilizando 0,5% de glicerol. Este novo ensaio

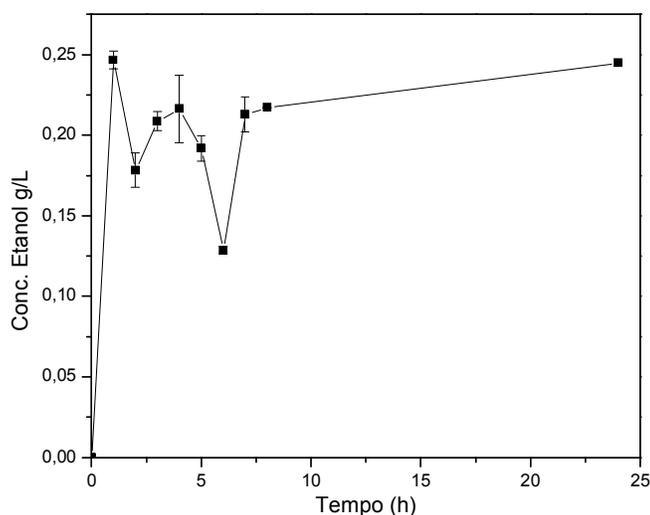
foi uma tentativa para verificar se na fermentação inicial teria ocorrido a falta de produção de etanol devido a uma inibição pelo substrato. Assim, a redução da concentração da fonte de carbono facilitaria seu consumo pelo microrganismo e seria observada a produção de etanol. A Figura 4.3 mostra o consumo de glicerol e a produção de biomassa e a Figura 4.4 mostra a produção de etanol no ensaio fermentativo utilizando 0,5% de glicerol bruto como fonte de carbono para produção de etanol por *Saccharomyces sp.* 1201.

Analisando a Figura 4.3, pode-se ver que não houve variação significativa no consumo de glicerol pelo microrganismo em estudo. Apesar de a concentração de glicerol no meio de cultivo ter diminuído para 0,5% m/v não foi possível novamente observar seu consumo de modo significativo. O glicerol adicionado ao meio permaneceu praticamente intacto durante 24 horas de fermentação. O resultado obtido neste ensaio mostrou que mesmo com a redução na concentração da fonte de carbono, o glicerol não se mostrou uma fonte de carbono assimilável para este microrganismo. Na Figura 4.4 é possível confirmar que mesmo diminuindo a concentração de glicerol não se obteve uma quantidade de etanol significativa para o estudo. Ao final de 24 horas de cultivo, somente 0,25 g/L de etanol foi medido, concentração dentro da faixa do desvio padrão da concentração medida para este ensaio, por isso, essa quantidade de etanol observada não se caracterizou como uma produção deste cultivo usando como microrganismo a *Saccharomyces sp.* 1201.



**Figura 4.3** – Perfil de crescimento e de consumo de glicerol para fermentação utilizando 0,5% de glicerol (m/v):

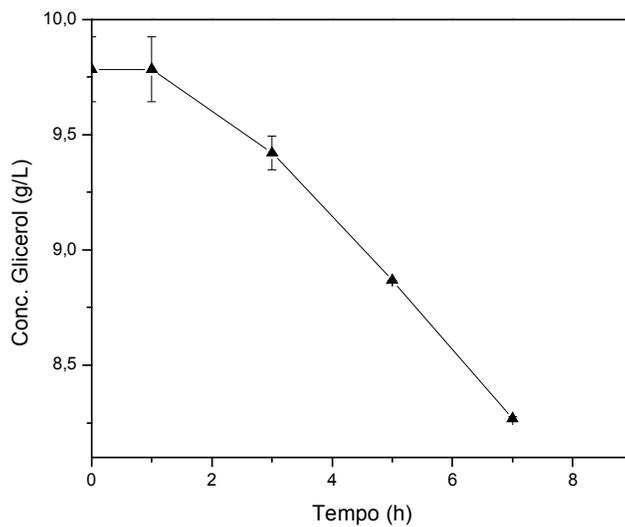
(♦) biomassa (g/L); (▲) glicerol (g/L)



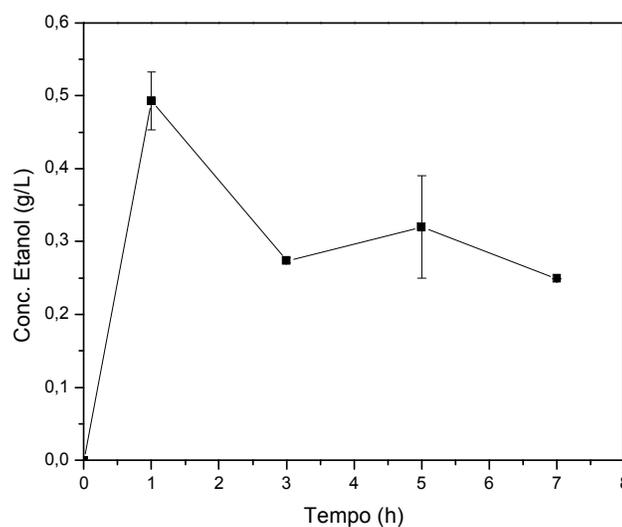
**Figura 4.4** – Perfil de concentração de etanol para fermentação utilizando 0,5% de glicerol (m/v): (■) etanol (g/L).

Uma vez que o glicerol oriundo da indústria de biodiesel apresenta diferentes resíduos, supõe-se que a não produção de etanol poderia ser causada por algum material presente nesse resíduo industrial. Assim, realizou-se uma fermentação nas mesmas condições de cultivo anterior, entretanto, desta vez usando glicerol padrão de grau analítico (P.A), para verificar se a presença dos diferentes resíduos presentes no glicerol bruto estaria influenciando a não produção de etanol. Além disso, pretendeu-se observar também se o não consumo efetivo do glicerol bruto era devido a este substrato utilizado nas fermentações ser oriundo da reação de produção do biodiesel, pois a linhagem de *Saccharomyces sp.* 1201 utilizada nas fermentação não estava conseguindo metabolizar esta fonte de carbono mesmo para sua manutenção.

A Figura 4.5 mostra o consumo de glicerol grau analítico e a Figura 4.6 mostra o gráfico de produção de etanol para um cultivo de *Saccharomyces sp.* 1201 usando 1% de glicerol P.A (m/v).



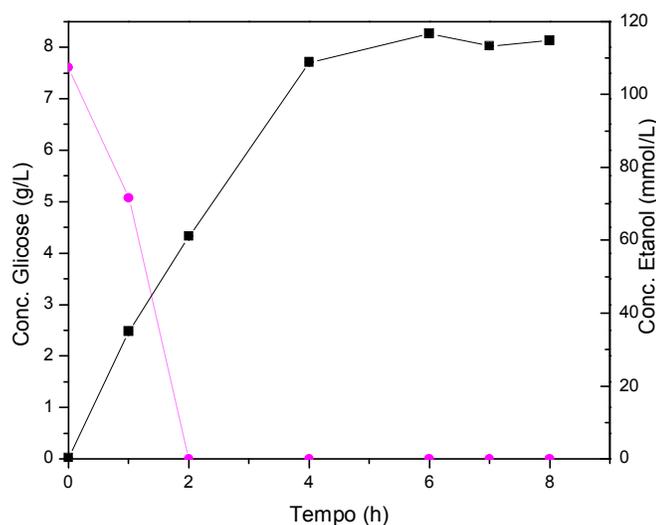
**Figura 4.5** – Perfil de concentração de glicerol para fermentação utilizando 1% glicerol P.A (m/v): (▲) glicerol (g/L)



**Figura 4.6** – Perfil de concentração de etanol para fermentação utilizando 1 % glicerol P.A (m/v): (■) etanol (g/L).

Como pode ser observado nas Figuras 4.6 e 4.7, nesta fermentação não houve produção de etanol a partir de glicerol P.A, muito menos o consumo de glicerol pela levedura

*Saccharomyces sp.* 1201. Este resultado seria um indicativo de que o microrganismo em estudo não seria capaz de consumir glicerol como fonte de carbono para produção de etanol. Assim, com o objetivo de verificar se a cepa deste microrganismo estaria viável ou ela não metabolizava o glicerol como fonte de carbono, realizou-se fermentação utilizando glicose como fonte de carbono no lugar do glicerol, uma vez que é conhecido que as leveduras do gênero *Saccharomyces* são amplamente conhecidas como boas produtoras de alcoóis a partir de glicose, uma fonte de carbono de rápida assimilação. Nesta fermentação utilizaram-se 10 g/L de glicose P.A. e 1% (v/v) de inóculo como nos ensaios anteriores. A Figura 4.7 mostra o resultado obtido para o consumo de glicose e produção de etanol.



**Figura 4.7** – Perfil de crescimento e concentração de etanol e glicose para fermentação utilizando glicose: (◆) biomassa (g/L); (●) glicose (g/L); (■) etanol (mmol/L);

Como pode ser observado pelo gráfico da Figura 4.7, a levedura em estudo foi capaz de produzir etanol utilizando glicose como fonte de carbono. Rapidamente a glicose foi consumida e a produção de etanol foi observada, aproximadamente 115 g/L em 6 horas de cultivo. Assim, pôde-se confirmar que a não produção de etanol deveu-se ao metabolismo do microrganismo e não devido ao glicerol ser residual da indústria do biodiesel. Apesar dos artigos de Flores et al., 2000 e Biebl, 2001 afirmarem que este microrganismo seria capaz de assimilar glicerol. Acredita-se que durante a modificação desta cepa de *Saccharomyces sp.*

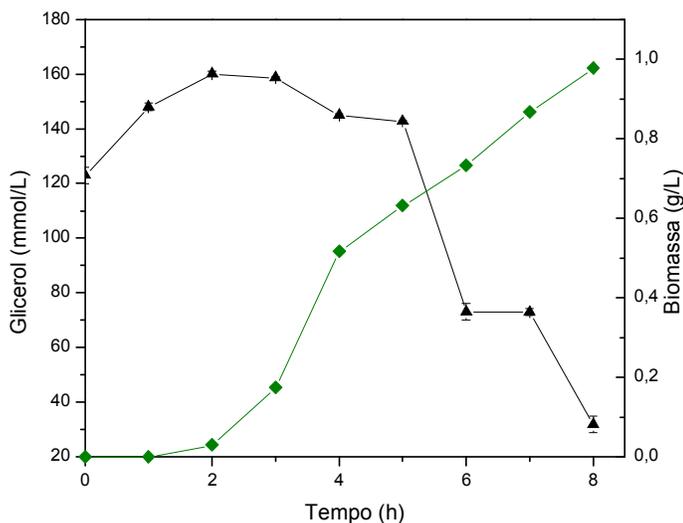
1201 aqui utilizada, ocorreu alguma modificação que não mais permitiu que a levedura conseguisse metabolizar glicerol, assim metabolizando sua fonte habitual, a glicose.

### **4.3. Fermentação utilizando *K. pneumoniae* 396 (ATCC 29665)**

Com os resultados obtidos anteriormente (seção 4.2), constatou-se que a cepa da levedura *Saccharomyces sp.* 1201 não seria viável para assimilar o glicerol oriundo da indústria do biodiesel para produção de etanol ou mesmo qualquer outro produto. Assim, em seguida aos ensaios realizados com *Saccharomyces sp.* 1201, utilizou-se outro microrganismo na tentativa de produzir etanol a partir de glicerol bruto. Assim, realizaram-se fermentações utilizando a bactéria *K. pneumoniae* 396 (ATCC 29665) com objetivo que este microrganismo pudesse absorver o resíduo da indústria do biodiesel e ao mesmo tempo produzir etanol. As fermentações foram conduzidas nas condições anteriormente descritas nos materiais e métodos (seção 3.2.2.2).

Inicialmente, para o estudo da produção de etanol usando *K. pneumoniae* 396 (ATCC 29665), realizaram-se fermentações fixando a quantidade de fonte de carbono em 20 g/L e variou-se a concentração de inóculo em 1% e 10 % (v/v) (CHENG, 2004). Pois devido a uma falta de consenso na literatura acerca da concentração ideal de inóculo, testou-se o efeito de sua variação no meio fermentativo. As concentrações de inóculo de 1% e 10% são concentrações bastante utilizadas por diversos autores, assim, com o intuito de verificar se haveria uma grande mudança na produção de etanol com a variação de concentração inicial de inóculo, utilizaram-se as concentrações de 1% e 10% de inóculo nos cultivos seguintes.

A Figura 4.8 mostra o perfil de concentração do glicerol bruto e produção de biomassa ao longo do tempo na fermentação utilizando 1% de inóculo. A Figura 4.9 mostra o perfil de concentração para os produtos obtidos na fermentação utilizando 1% de inóculo ao longo de 8 horas de cultivo.

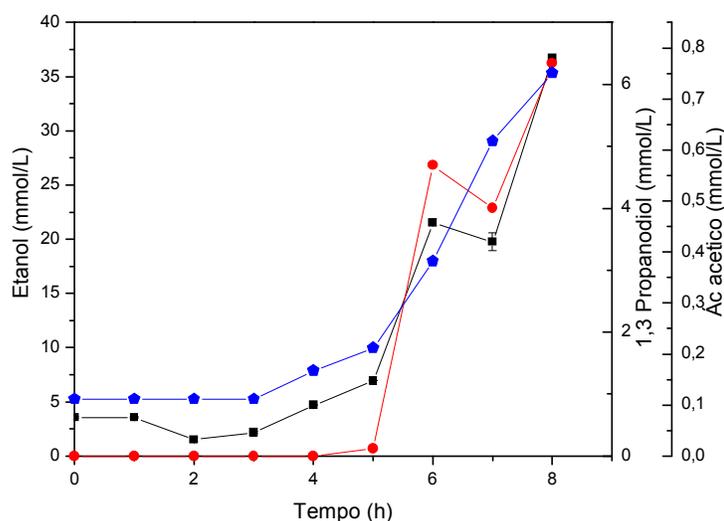


**Figura 4.8** – Perfil de crescimento e de consumo de glicerol para fermentação utilizando 1% de inóculo (v/v):  
 (♦) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L)

Através do gráfico da Figura 4.8 pode-se observar que o crescimento da bactéria, em 8 horas de cultivo, encontrava-se em sua fase exponencial e que o glicerol foi completamente consumido em apenas 24 horas de fermentação. Portanto, em 8 horas de fermentação, quase não se podia observar a presença de glicerol no meio fermentativo. Mostrando o alto grau de redução do glicerol bruto pela *K. pneumoniae* (ATCC 29665). A produção de biomassa, nas 8 horas de fermentação, apresentou uma velocidade de crescimento praticamente constante, como pode ser observado pela inclinação da curva na Figura 4.8.

No gráfico da Figura 4.9, pode-se observar os perfis de concentração dos produtos obtidos na fermentação utilizando 1% de inóculo. A bactéria *K. pneumoniae* 396 (ATCC 29665) é capaz de produzir três diferentes produtos utilizando glicerol como substrato, são eles: ácido acético, 1,3-propanodiol e etanol. A Figura 4.9 mostra os perfis de concentração desses três produtos ao longo do tempo de cultivo. Pode-se ver que a produção máxima de etanol foi de 37 mmol/L aproximadamente, em apenas 8 horas de fermentação. A produção máxima de 1,3-propanodiol foi cerca de 6 mmol/L em 8 horas de fermentação e a produção de ácido acético foi de 0,75 mmol/L em 8 horas de fermentação. Sabendo-se que o etanol é um intermediário neste cultivo. Uma vez que a bactéria *K. pneumoniae* 396 (ATCC 29665), na ausência de outra fonte de carbono, usa o etanol para completar seu metabolismo e produzir

1,3-propanodiol. Pode-se observar que nas primeiras quatro horas de cultivo, praticamente não há formação de 1,3-propanodiol, a concentração de ácido acético é alta e há a formação de etanol. Depois deste período de ajuste ao meio, a produção de etanol e 1,3-propanodiol superam a produção de ácido acético.

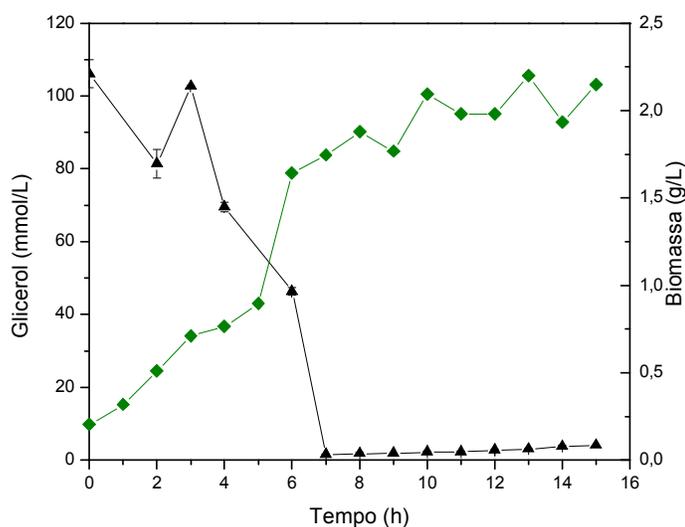


**Figura 4.9** – Perfil da concentração dos produtos da fermentação utilizando 1% de inóculo (v/v): (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (●) ácido acético (mmol/L).

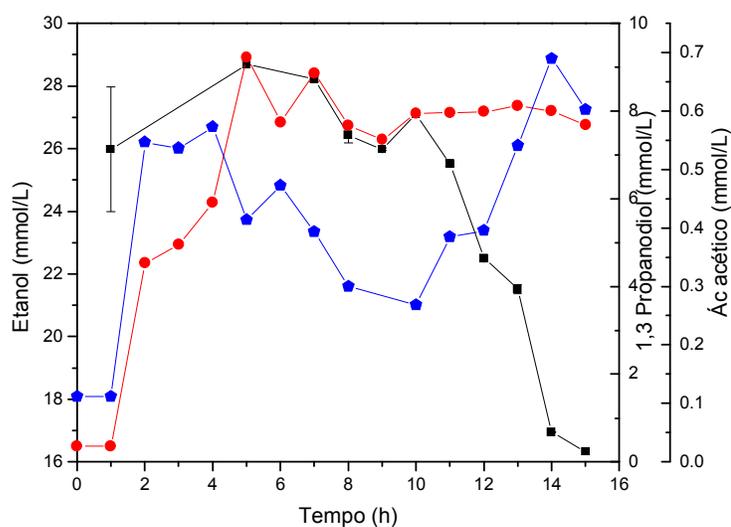
As Figuras 4.10 e 4.11 apresentam os resultados obtidos no cultivo usando 10% de inóculo no meio. A Figura 4.10 mostra o consumo de glicerol e a produção de biomassa ao longo do tempo, enquanto que a Figura 4.11 apresenta as concentrações dos produtos nesta fermentação. Devido ao não consenso na literatura acerca da concentração de inóculo, decidiu-se avaliar o efeito que uma concentração maior no meio fermentativo usando *K. pneumoniae* 396 (ATCC 29665). Como era de se esperar, o aumento da quantidade de inóculo no meio fermentativo acelerou o consumo de glicerol, além do crescimento da biomassa mostrar-se bem promissor. Já que a produção de etanol está associada ao crescimento da biomassa.

Analisando as primeiras 5 horas de cultivo, pode-se observar que praticamente não havia glicerol presente no meio. Fato não observado no cultivo mostrado na Figura 4.8. Quando 1% de inóculo foi utilizado, o consumo de glicerol foi mais lento. Já no cultivo realizado usando-se 10% de inóculo, o glicerol foi consumido numa velocidade constante, resultado promissor já que estes ensaios visavam um futuro cultivo em biorreator contínuo

para produção de etanol. Nas 3 horas seguintes, praticamente não havia glicerol para ser consumido. O crescimento da biomassa mostrou o mesmo comportamento, apresentou uma velocidade de crescimento constante nas primeiras 5 horas de cultivo e uma velocidade de crescimento menor no restante da fermentação.



**Figura 4.10** – Perfil de crescimento e de consumo de glicerol para fermentação utilizando 10% de inóculo (v/v):  
 (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L)



**Figura 4.11** – Perfil da concentração dos produtos da fermentação utilizando 10% de inóculo (v/v): (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (◆) ácido acético (mmol/L).

Devido não haver mais uma quantidade significativa de glicerol, a biomassa começou a consumir a fonte mais acessível de carbono no meio, o etanol, como pode ser observado na Figura 4.11. Analisando-se a Figura 4.11, pode-se ver que a concentração total de etanol no meio fermentativo apresentou um valor máximo próximo de 5 horas de cultivo (29 mmol/L) e em seguida começou a cair. Ou seja, o aumento da quantidade de inóculo, acelerou todo o processo, entretanto esse aumento da velocidade não foi proporcional ao aumento de inóculo, aproximadamente 15mmol/L usando 1% de inóculo e 29mmol/L usando 10% de inóculo em 5 horas de fermentação. Em 8 horas de cultivo, a concentração de etanol era de aproximadamente 35 mmol/L quando se usou 1% de inóculo e, aproximadamente 27mmol/L quando se usou 10% de inóculo. Essa queda na concentração de etanol se deve ao fato de não haver mais glicerol suficiente no meio, o que modificou a fonte de carbono utilizada pela *K. pneumoniae* 396 (ATCC 29665). Esse resultado mostrou-se promissor, uma vez que em um cultivo contínuo em escala, poder-se-ia esperar um aumento na concentração de etanol, pois sua velocidade de produção ficaria constante como nas primeiras 5 horas de cultivo.

Já para a produção de 1,3-propanodiol houve um pequeno aumento na produção, quando se utilizou 1% obtiveram-se 6 mmol/L enquanto que quando se utilizou 10% de inóculo obtiveram-se 8 mmol/L de 1,3-propanodiol, o que mostrou que para o 1,3-propanodiol, o aumento da quantidade de inóculo no meio não causou um grande impacto no rendimento da fermentação. Fato que deve ser analisado quando o objetivo for a produção de 1,3-propanodiol. Ou seja, quando se desejar uma produção de etanol, deve-se usar uma concentração maior de inóculo. Quando se desejar direcionar a fermentação para a produção de 1,3-propanodiol, deve-se diminuir a concentração de inóculo para que a velocidade de cultivo ser menor e o microrganismo adaptar seu metabolismo e consumir o intermediário etanol do meio fermentativo.

Analisando-se o outro produto da fermentação, o ácido acético, pode-se ver que houve uma modificação em seu perfil de produção: na Figura 4.9 (1% de inóculo) sua produção manteve-se com velocidade praticamente constante, chegando a uma concentração de 0,6 mmol/L em 8 horas de cultivo. Já na fermentação mostrada na Figura 4.11 (10% de inóculo), a produção de ácido acético manteve o mesmo comportamento da Figura 4.9 nas primeiras 5 horas de fermentação, depois desse período a produção de ácido acético caiu, mostrando que a bactéria *K. pneumoniae* 396 (ATCC 29665) estava direcionando todo seu metabolismo para consumir as diversas fontes de carbono no meio e produzir 1,3-

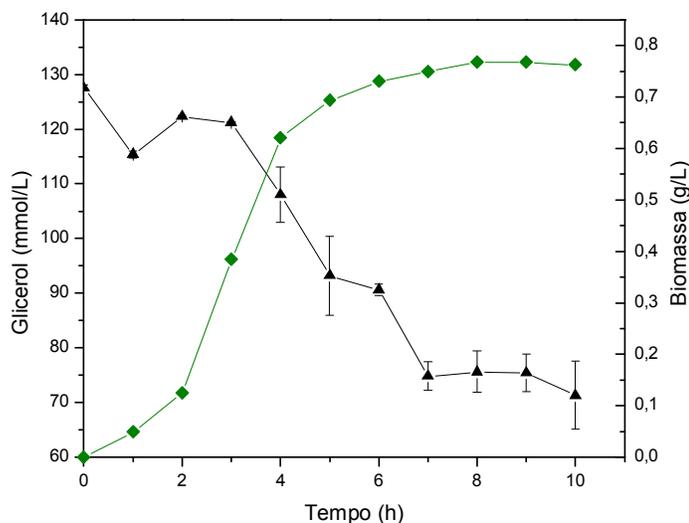
propanodiol. Após 8 horas de fermentação, a concentração de ácido acético voltou a crescer, nesta etapa, o etanol estava sendo consumido a uma velocidade constante para produzir o 1,3-propanodiol e o ácido acético apresentava uma concentração de aproximadamente 0,3 mmol/L no meio. Mesmo com um comportamento de produção diferente, a concentração de ácido acético medida foi praticamente a mesma do cultivo com 1% de inóculo, 0,7 mmol/L.

Para efeito comparativo, uma vez que os resultados com a levedura não se mostraram promissores, realizou-se uma fermentação utilizando glicerol P.A para o experimento onde se utilizou 1% de inóculo, e assim, avaliar-se a influência dos produtos da fermentação usando a bactéria *K. pneumoniae* 396 (ATCC 29665). As Figuras 4.12 e 4.13 mostram os resultados obtidos de concentração de glicerol, biomassa e produtos nesta fermentação utilizando glicerol P.A com 1% de inóculo (v/v) no meio.

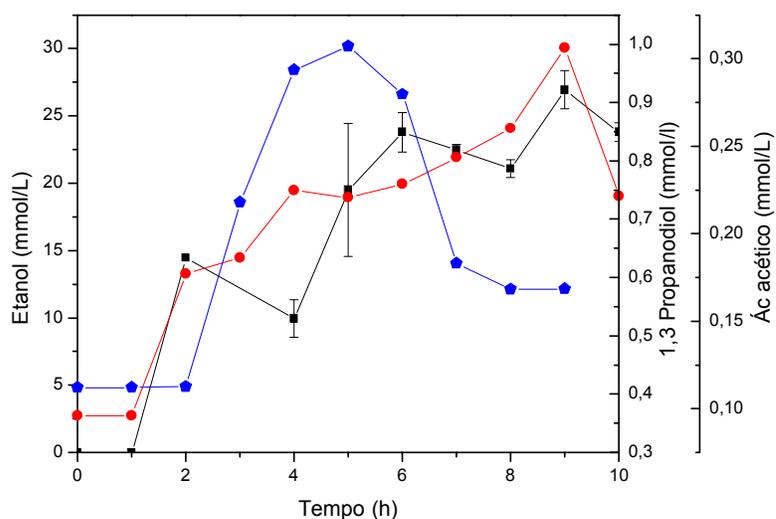
Na Figura 4.12 pode-se ver a concentração de glicerol em função do tempo. Com a utilização de glicerol P.A., a velocidade de consumo do glicerol foi menor do que quando se utilizou glicerol bruto. Em 24 de fermentação ainda havia metade do glicerol no meio. Este comportamento não foi observado no cultivo usando glicerol bruto (Figura 4.8), praticamente todo o glicerol havia sido consumido em 8 horas de fermentação. Outra característica observada nos dois diferentes cultivos: o glicerol P.A. apresentou um perfil de velocidade constante de consumo. Já no experimento com as mesmas condições utilizando glicerol bruto, este perfil apresentou-se muito diferente. A *K. pneumoniae* apresentou um período de não consumo de glicerol bruto, ou seja, neste intervalo, outros resíduos presentes no glicerol bruto foram consumidos no lugar do glicerol. Em seguida, a *K. pneumoniae* voltou a consumir o glicerol bruto do meio a uma velocidade bem maior que o consumo do glicerol P.A. Já a produção de biomassa apresentou uma concentração menor quando se utilizou o glicerol P.A. Em 5 horas de cultivo, a concentração de biomassa era de aproximadamente 0,7 g/L e manteve-se praticamente constante na horas seguintes de fermentação.

A Figura 4.13 mostra o perfil de concentração dos produtos. Pode-se ver que a produção máxima de etanol alcançada foi de 26 mmol/L, a concentração máxima de 1,3 propanodiol foi de 1 mmol/L e a concentração de ácido acético foi de 0,30 mmol/L. A produção tanto de etanol quanto de 1,3-propanodiol apresentou uma velocidade de produção bem próxima e constante ao longo de todo o cultivo. Já a produção de ácido acético apresentou um máximo e depois começou a cair, mas sempre com uma concentração baixa. Quando se compara as concentrações alcançadas usando glicerol bruto, elas foram de 35; 6; 0,75 mmol/L para etanol, 1,3 propanodiol e ácido acético respectivamente. Este resultado mostrou-se muito promissor, visto que o glicerol oriundo da indústria do biodiesel foi mais

eficiente que o glicerol com grau analítico. Assim, pode-se afirmar que a presença de resíduos, macro e microelementos no glicerol bruto, ou seja, glicerol sem receber qualquer tratamento prévio, ajudou a produtividade e rendimento da fermentação. Mostrando-se como um grande incentivo para a busca por um maior rendimento da fermentação e deixando claro que é possível a utilização deste glicerol como fonte de carbono para fermentações alcoólicas.



**Figura 4.12** – Perfil de crescimento e de consumo de glicerol para fermentação utilizando 1% de inóculo (v/v) e glicerol PA: (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L)

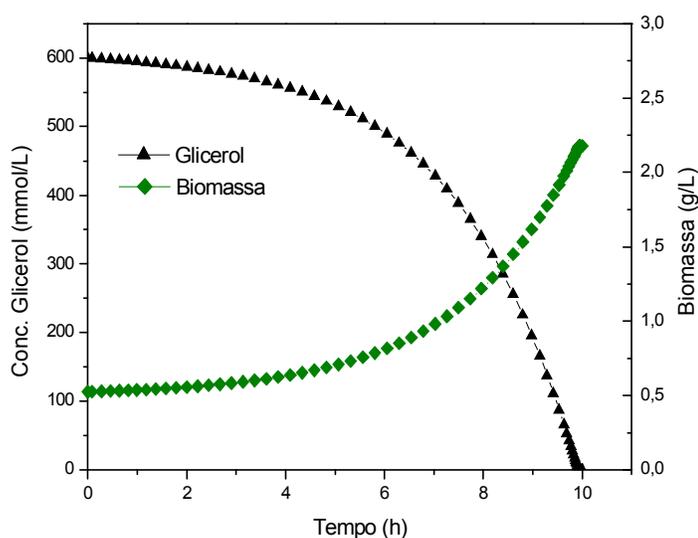


**Figura 4.13** – Perfil da concentração dos produtos da fermentação utilizando 1% de inóculo: (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (●) ácido acético (mmol/L).

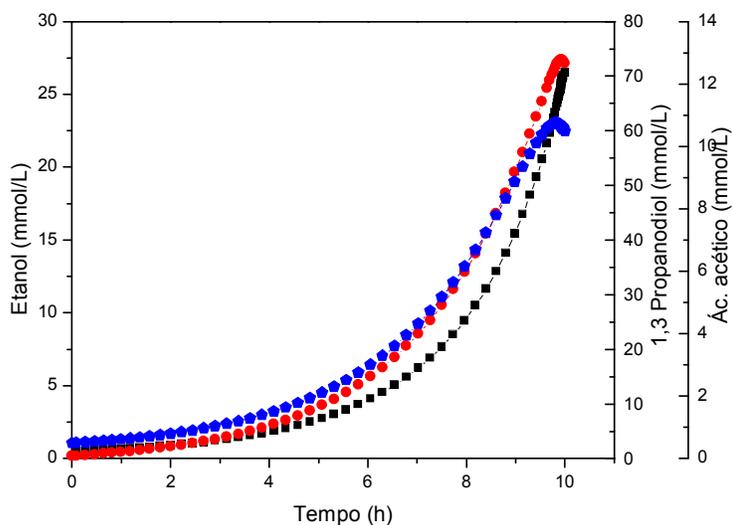
#### 4.4. Modelagem

Com o objetivo de analisar uma utilização do glicerol bruto em um biorreator real e contínuo, prevendo uma futura ampliação de escala dos experiemntos realizados anteriormente em batelada, realizaram-se modelagens da fermentação com *K. pneumoniae* 396 (ATCC 29665). Utilizou-se como ferramenta computacional o MATLAB, e assim, obter estimativas de diferentes condições operacionais de fermentação. Os parâmetros analisados nas simulações foram quantidade de inóculo, já que este se mostrou um parâmetro importante experimentalmente. Também se analisou a concentração de glicerol no meio e finalmente, zona morta e “bypass” no biorreator contínuo real.

A Figura 4.14, mostra o perfil de concentração do glicerol e a concentração de biomassa ao longo do tempo para a simulação do biorreator utilizando as seguintes condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,05 g/L;  $\alpha$  90% e  $\beta$  50%. A Figura 4.15, apresenta o perfil de concentração dos produtos desta simulação. A modelagem e as características deste biorreator foram apresentadas na seção 3.4 deste trabalho. Ou seja, o biorreator foi modelado como uma combinação de um CSTR ideal de volume  $V_s$ , uma zona morta de volume  $V_d$  e desvio (*bypass*) com vazão volumétrica  $Q_b$ . A vazão real do reator é  $Q_0$  e corrente afluyente no reator é  $Q_s$ .



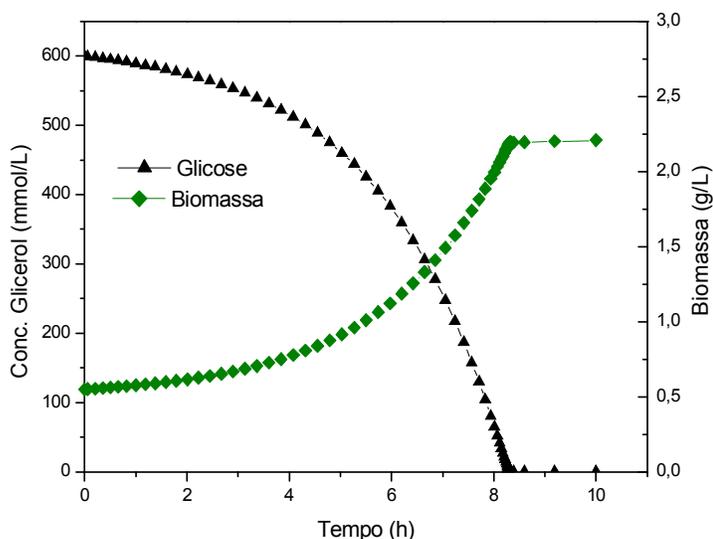
**Figura 4.14** – Perfil de concentração para glicerol e biomassa da simulação com condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,05 g/L;  $\alpha$  90% e  $\beta$  50%: (♦) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).



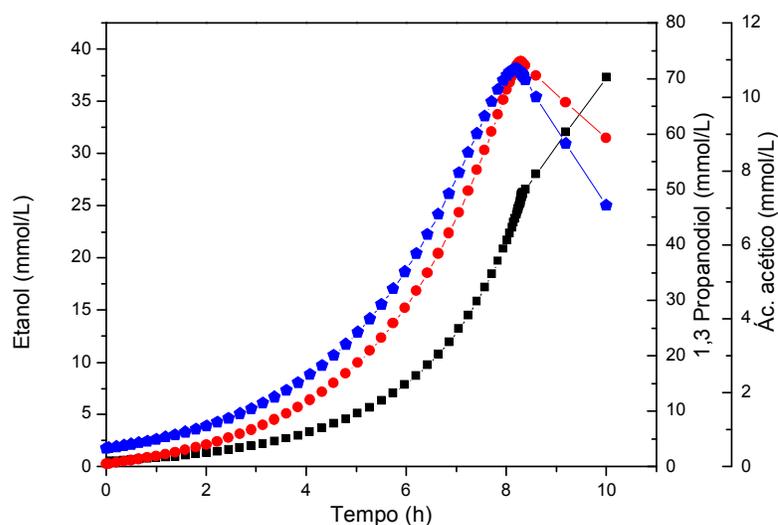
**Figura 4.15** – Perfil de concentração dos produtos da simulação com condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,05 g/L;  $\alpha$  90% e  $\beta$  50%: (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (●) ácido acético (mmol/L).

A Figura 4.14 mostra que a diminuição da concentração de glicerol foi constante ao longo do tempo, indicando que sua velocidade era alta, uma vez que substrato era alimentado no biorreator. A velocidade de crescimento da biomassa mostrou uma curva crescente, mostrando uma boa eficiência do biorreator. Observando-se a Figura 4.15, curvas de produção de etanol, 1,3-propanodiol e ácido acético, pode-se ver que nesta simulação a produção de 1,3-propanodiol nessas condições testadas mostrou-se satisfatória tendo uma produção máxima de 72 mmol/L em aproximadamente 10 horas de fermentação, sendo todo o glicerol consumido, utilizando apenas 0,05 g/L de biomassa e 600 mmol/L de glicerol.

A Figura 4.16 apresenta o gráfico obtido na simulação utilizando as condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,1 g/L;  $\alpha$  90% e  $\beta$  50%, para a curva de crescimento de biomassa e consumo de glicerol, nesta simulação a concentração inicial de biomassa foi aumentada de 0,05 para 0,1 g/L. A Figura 4.17 mostra o perfil obtido nas simulações para os produtos desta fermentação.



**Figura 4.16** – Perfil da concentração de biomassa e glicerol da simulação com condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,1 g/L;  $\alpha$  90% e  $\beta$  50%: (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).

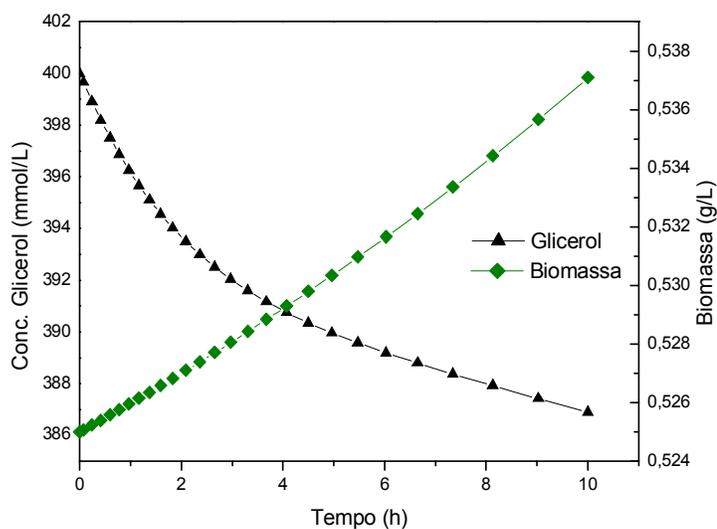


**Figura 4.17** – Perfil da concentração dos produtos da simulação com condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,1 g/L;  $\alpha$  90% e  $\beta$  50%: (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (◆) ácido acético (mmol/L).

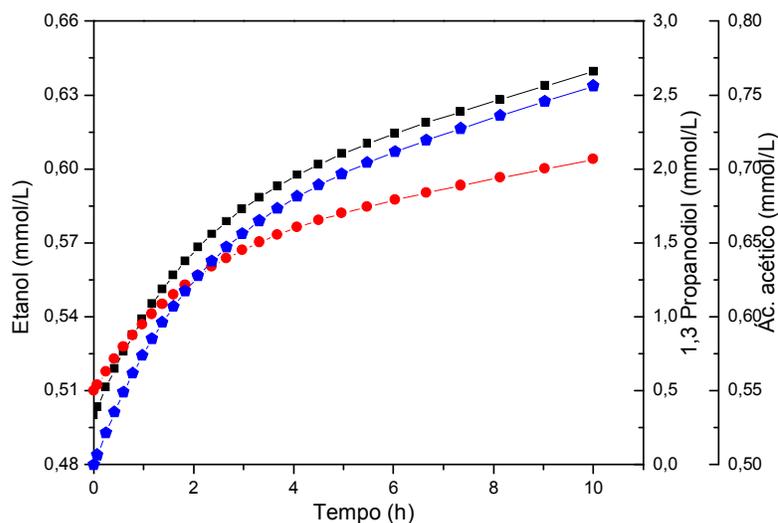
A Figura 4.16 mostra a diminuição da concentração de glicerol, indicando seu consumo e o crescimento da biomassa. Após 8 horas de cultivo, a concentração de biomassa permanece constante devido a todo glicerol ter sido consumido. Na figura 4.17 observa-se que após 8h de fermentação há uma ligeira queda na produção do 1,3-propanodiol, onde sua concentração cai de 73 para 59 mmol/L, este fato deve-se a inibição pelo substrato que ocorre nesta fermentação, assim o microrganismo consome os álcool pois estes são uma fonte de

carbono de fácil assimilação para sua manutenção. A produção de etanol continua após 8 h com velocidade menor, mostrando que o microrganismo está usando outra fonte de carbono para produzir o etanol.

A Figura 4.18 apresenta o gráfico da simulação obtida utilizando as condições iniciais:  $C_{S0}$  400 mmol/L;  $X_0$  0,05 g/L;  $\alpha$  10% e  $\beta$  50% para o perfil de concentração de glicerol e biomassa. A Figura 4.19 apresenta os perfis de concentração dos produtos desta simulação. Nesta simulação avaliou-se a mudança de concentração inicial de substrato de 600 para 400 mmol/L. A velocidade de consumo de glicerol mudou para um perfil de velocidade bem menor, com 10 horas de cultivo ainda havia quase todo o glicerol inicial no bioreator. Como esperado, a concentração de biomassa aumentou ao longo do tempo, porém com uma velocidade mínima, concentrações de biomassa que alcançaram quase 3 g/L nas fermentações anteriores, nesta simulação com uma diminuição em 50% de substrato inicial, só alcançou aproximadamente 0,5 g/L.



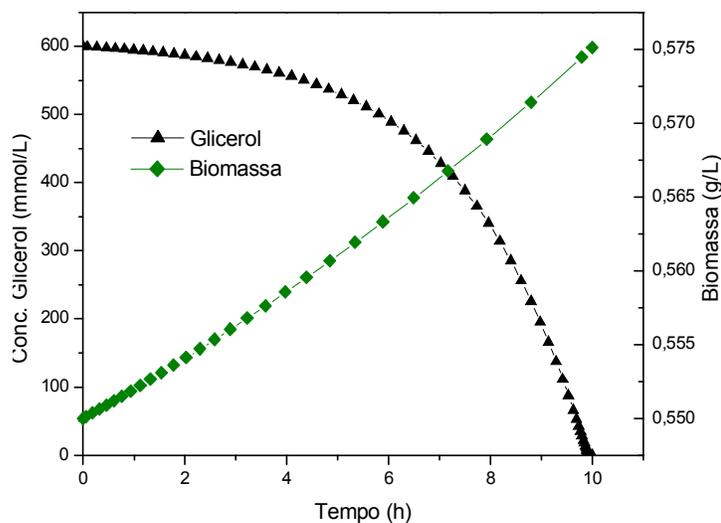
**Figura 4.18** – Perfil da concentração dos produtos da simulação com condições iniciais:  $C_{S0}$  400 mmol/L;  $X_0$  0,05 g/L;  $\alpha$  10% e  $\beta$  50%: (◆) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).



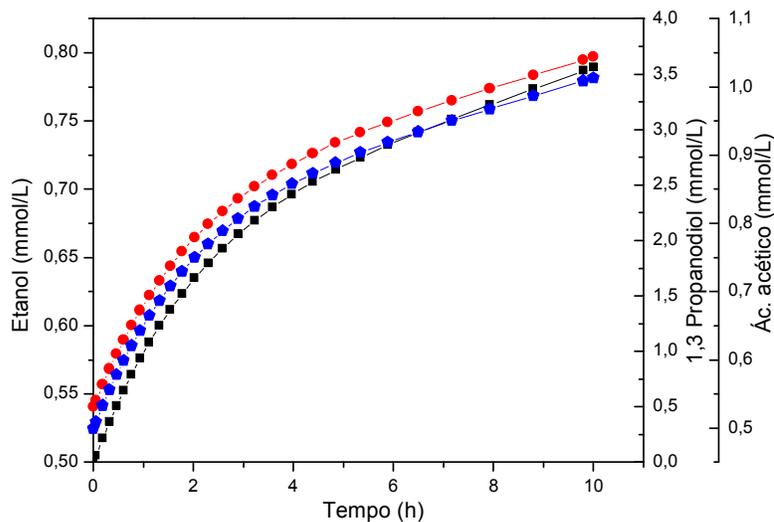
**Figura 4.19**– Perfil da concentração dos produtos da simulação com condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,1 g/L;  $\alpha$  90% e  $\beta$  50%: (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (●) ácido acético (mmol/L).

Nestas condições de fermentação usadas, o perfil de concentração ao longo do tempo dos produtos mostram-se diferentes. Agora a produção de etanol superou a concentração dos outros produtos em quase todo o cultivo. Na Figura 4.19, a produção de 1,3-propanodiol é de aproximadamente 2 mmol/L, a concentração de etanol é de 0,8 mmol/L e a concentração de ácido acético é de 0,6 mmol/L. Valores baixo comparados com os das Figuras 4.15 e 4.17. Esses valores se devem ao fato de que apenas 10% do volume do reator esta reagindo e 50% do que entra no biorreator passa sem reagir, o que diminui o rendimento da reação bruscamente. Para um melhor rendimento da fermentação, deve-se aumentar o tamanho do reator, para que o contato entre microrganismo e substrato possa ser aumentado. Nesta simulação, a hidrodinâmica do biorreator também não favoreceu a fermentação, assim, a produção de etanol foi baixa quando comparada com as simulações anteriores.

Na Figura 4.20 pode-se observar o gráfico da simulação utilizando as seguintes condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,1 g/L;  $\alpha$  10% e  $\beta$  50% para os perfis de glicerol e biomassa. A Figura 4.21 apresenta o perfil de concentração ao longo do tempo dos produtos da simulação. Nesta simulação, as concentrações iniciais de substrato e biomassa foram mantidas e testaram-se  $\alpha$  10% e  $\beta$  50%.



**Figura 4.20** – Perfil da concentração dos produtos da simulação com condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,1 g/L;  $\alpha$  10% e  $\beta$  50%: (♦) biomassa (g/L); (▲) glicerol (mmol/L).



**Figura 4.21**– Perfil da concentração dos produtos da simulação com condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,1 g/L;  $\alpha$  10% e  $\beta$  50%: (■) etanol (mmol/L); (●) 1,3 propanodiol (mmol/L); (◆) ácido acético (mmol/L).

Na Figura 4.20 observa-se através do perfil de concentração que o glicerol foi completamente consumido, e que aproximadamente nas 6 primeiras horas de fermentação houve uma inibição pelo substrato. Contudo o crescimento microbiano não foi suficiente para uma boa geração dos produtos desejados. Pode-se verificar através da Figura 4.21 que as produções de 1,3-propanodiol, etanol e ácido acético foram baixas, cerca de 3,5 mmol/L de

1,3 propanodiol e 0,7 mmol/L de etanol. Resultado inferior ao esperado, visto que nas simulações das Figuras 4.15 e 4.17, a produção tanto de etanol quanto de 1,3-propanodiol foi bem superior a produção obtida nesta simulação. Através das simulações conclui-se que a melhor condição para trabalho com esse microrganismo são as seguintes:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,05 g/L;  $\alpha$  90% e  $\beta$  50%, ou seja, uma concentração de biomassa inicial mais baixa e que menos substrato seja bypassado pelo biorreator, pois este teve um efeito negativo na produção tanto de etanol quanto de 1,3-propanodiol. As simulações aqui realizadas, mostraram-se boa ferramenta, pois pôde-se variar diversas condições operacionais de cultivo, sem a necessidade de laboriosos experimentos com gasto de reagentes caros.

## CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível concluir com os experimentos realizados no laboratório que a levedura *Saccharomyces sp.* 1201 não se mostraram promissoras para produção de etanol através do consumo de glicerol como fonte de carbono, devido a mesma não ser capaz de metabolizar glicerol para esta finalidade. O microrganismo não conseguiu metabolizar também o glicerol P.A., o que mostrou que este microrganismo realmente não conseguiu metabolizar o glicerol, ou seja, o microrganismo estava viável, só não foi capaz de assimilar glicerol. A levedura estudada mostrou-se boa produtora de etanol, somente quando se utilizou glicose como fonte de carbono, o que fugia do escopo deste trabalho.

As fermentações com a bactéria *Klebsiella pneumoniae* 396 (ATCC 29665), mostrou bons resultados. Com este microrganismo, variou-se a concentração de inóculo adicionado ao meio, para avaliação da influência do mesmo frente à concentração dos produtos, o resultado deste estudo mostrou que a variação de inóculo interferiu significativamente na produção de etanol, ácido acético e 1,3-propanodiol, modificando tanto o perfil de velocidade de produção dos produtos quanto a concentração alcançada por eles. Concluindo assim que é interessante utilizar apenas 1% de inóculo no meio fermentativo quando se deseja a produção de 1,3-propanodiol e 10% de inóculo quando se deseja produzir etanol. Os resultados obtidos em batelada para o etanol mostraram que uma futura produção contínua em escala de etanol apresentariam maior produtividade e rendimento usando 10% de inóculo no meio fermentativo.

Nas fermentações utilizando glicerol P.A, pôde-se observar que o glicerol bruto sempre apresentou melhor rendimento frente ao glicerol PA, outro resultado interessante quando se deseja uma produção em escala industrial usando o glicerol oriundo da indústria do biodiesel. Não foi necessário qualquer tratamento prévio para utilizar-se esse resíduo. Acredita-se que os micronutrientes presentes no glicerol bruto estimularam o crescimento do microrganismo de forma positiva o que o levou a ter uma maior produção tanto de etanol quanto de 1,3-propanodiol nas condições específicas aqui estudadas.

As simulações realizadas com o modelo de biorreator contínuo e real mostraram que a produção de etanol pode ser otimizada com a utilização de uma maior quantidade inicial de substrato e um menor bypass no biorreator real. As concentrações de inóculo testadas mostraram que o etanol atingiria maior rendimento quando 0,05 mmol/L de biomassa iniciava o

cultivo. A simulação utilizando as condições iniciais:  $C_{S0}$  600 mmol/L;  $X_0$  0,05 g/L;  $\alpha$  90% e  $\beta$  50%, mostrou o melhor resultado para produção de etanol, 1,3 propanodiol e ácido acético.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIETTA, M. G. S., STECKELBERG, C., ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. Campinas 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/>. Acesso em: 02 de setembro de 2009.

ANTCZAK, M. S., KUBIAK, A., ANTCZAK, T., BIELECKI, S.1. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

BALAT, M. **Global bio-fuel processing and production trends**. Energy Explor Exploit. v. 25, 195–218. 2007.

BALAT, M., BALAT, H., OZ, C., Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 34, p. 551–573, 2008.

BARBIRATO, F., HIMMI, E. H., CONTE, T., BORIES A., 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**. v. 7, p. 281–289, 1998.

BIEBL, H. Fermentation of Glycerol by *Clostridium pasteurianum* – Batch and Continuous Culture Studies. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.27, pp. 18-26, 2001.

BIEBL H, MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD. Microbial production of 1,3-propanediol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 52, p. 289-297, 1999.

BIEBL H, ZENG AP, MENZEL K, DECKWER WD. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 50, p. 24-29, 1998.

BOOTH, I.R., **Glycerol and methylglyoxal metabolism**. In: Curtis, III, R., et al. (Eds.), EcoSal—*Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, DC (Chapter 3). <http://www.ecosal.org>, 2005.

BOUVET, O.M., LENORMAND, P., AGERON, E., GRIMONT, P.A., Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the Enterobacteriaceae. **Res. Microbiol.** v. 146, p. 279-290, 1995.

- CAMPBELL, C. J.; LAHERRÈRE, J. H. The end of cheap oil. **Sci Am**, v. 3, p. 78-83, 1998.
- CARDONA, C.A., SÁNCHEZ, O.J., Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Biores. Technol.** v. 98, p. 2415-2457, 2007.
- CAZETTA, M.L., CELLIGOI, M.A., BUZATO, J.B., SCARMINO, I.S. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Biores. Technol.** v. 98, p. 2824-2828, 2007.
- CHENG, K. K., LIU, D. H., SUN, Y., & LIU, W. B. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. **Biotechnology Letters.** v. 26, p. 911-915, 2004.
- CYSEWSKI, G.R., WILKE, C.R. Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnol. Bioeng.** v. 20, p.1421-1427, 1978.
- CORTEZ, L.A.B., GRIFfIN, M.W., SCARAMUCCI, J.A., SCANDIFfIO, M.I.G., BRAUNBECK, O.A.,. Considerations on the worldwide use of bio-ethanol as a contribution for sustainability. **Manage. Environ. Qual.** v. 14, p. 508-519, 2003.
- DANTAS, M. B. Obtenção, caracterização e estudo termoanalítico de biodiesel de milho. 205 f. Dissertação (mestrado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2006.
- DECKWER, W.D., Glycerol conversion to 1,3-propanediol – a microbial route to a versatile chemical. Presented at the International Congress on Chemicals from Biotechnology, October 18–20, Hannover, Germany. 1993
- DERMIBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Program Energy Combustion. Sci.** v. 31(5-6). p. 466-487. 2003.
- DEMIRBAS, M. F., BALAT, M. Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: a global perspective. **Energy Convers Mgmt.** v. 47, p. 2371-81, 2006.
- EBB — European Biodiesel Board. Press release. EU biodiesel production growth hits record high in 2005. EBB publishes annual biodiesel production statistics; 2006. Available in <http://www.ebb-eu.org/>

EL-ZINEY MG, ARNEBORG N, UYTTENDAELE M, DEBEVERE J, JAKOBSEN M. Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. **Biotechnol. Lett.** v. 20, p. 913–916, 1998.

ELM, R., FALBE, J., HAHN, H.D., GELBKE, H.P., Propandiol. In: Bartholome', E., Biekert, E., Hellmann, H., Ley, H., Weigert, H., Weise, E. (Eds.), *Ullmanns Encyklopaedie der Technischen Chemie*, v. 19. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. 1980.

FLORES, CL; RODRÍGUEZ, C; PETIT, T; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 507-529, 2000.

FOGLER, H. S. *Elementos de Engenharia das Reações Químicas*. 3ª ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2002.

Glicerina de biodiesel inunda mercado no país e derruba preços. 02 de Maio de 2007. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com>. Acesso em: 15 de julho de 2009.

GONZÁLEZ-PAJUELO M., ANDRADE J.C., VASCONCELOS I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. **J Ind Microbiol Biotech.** v. 31, p. 442-446, 2004.

GRAD, P., Biofuelling Brazil: an overview of the bioethanol success story in Brazil. **Refocus** v. 7 (3), p. 56-59, 2006.

GUNASEKARAN, P., RAJ, K.C. Ethanol fermentation technology – *Zymomonas mobilis*. **Curr. Sci.** v. 77, p. 56-68, 1999.

HANSEN AC, ZHANG Q, LYNE PWL. Ethanol–diesel fuel blends – a review. **Bioresource Technol**; v. 96: p. 85-277, 2005.

HOMANN, T., TAG, C., BIEBL, H., DECKWER, W.D., SCHINK, B. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 33, p. 121-126, 1990.

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P.; **Manual do Biodiesel**, Edgard Blücher: São Paulo, cap. 11, 2006.

MA, B. B.; XU, X. L.; ZHANG, G. L.; WANG, L. W.; WU, M.; LI, C. Microbial Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li under Different Aeration Strategies. **Appl Biochem Biotechnol**, v.152, p. 127-134, 2009.

MORRISON, L. R. Glycerol. **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: Wiley, p. 921-932, 1994.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da Glicerina de produção de biodiesel. *Quim. Nova*, v. 32, No. 3, p. 639-648, 2009.

NATIONAL BIODIESEL BOARD; Anais do Congresso Internacional de Biocombustíveis Líquidos; Instituto de Tecnologia do Paraná; Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior; Curitiba, PR, 19 a 22 de julho, 1998; p. 42

PARENTE, E. J. S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Ceará. 2003.

RABELO, I. D. Estudo de desempenho de combustíveis convencionais associados a biodiesel obtido pela transesterificação de óleo usado em fritura. Dissertação (mestrado em tecnologia), Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Curitiba, 99 f. 2001.

RAMOS, L. P.; Anais do Congresso Brasileiro de Soja; Centro Nacional de Pesquisa de Soja; Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária; Londrina, PR, 17 a 20 de maio, p. 233, 1999.

RFA – Renewable Fuels Association (online). <http://www.ethanolrfa.org/>

REHM, H. Microbial production of glycerol and other polyols. **Biotechnology**, Special microbial process. Weinheim: VCH, v. 6B, p. 52-64, 1988.

REIMANN A, BIEBL H, DECKWER WD. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 49, p. 359-363, 1998.

RIBEIRO, S. K.; **Scientific American Brasil**, edição 53. 2006.

STANISZEWSKI, M., KUJAWSKI, W., LEWANDOWSKA, M. Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – kinetic model predictions. **J. Food Eng.** v.82, p.618-625, 2007.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**. 2008, doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.006.

SOCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.S., COSTA, B., WOICIECHOWSKI, A.L., CARVALHO, J.C., MEDEIROS, A.B.P., FRANCISCO, A.M., BONOMI, L.J., Brazilian biofuel program: an overview. **J. Sci. Ind. Res.** v. 64, p.897-904, 2005.

TOSETTO, M. G.; ANDRIETTA, S. R. Cinética de produção de glicerol em processo de fermentação alcoólica utilizando diferentes matérias primas industriais. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Florianópolis. Anais do 14º SINAIFERM, Florianópolis, 2003.

VICENTE, G.; COLTERON, A.; MARTINEZ, J.; ARACIL, J. Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production. **Industrial Crops and Products**. n. 8, p. 28-35, 1998.

WITT, U., MULLER, R.J., AUGUSTA, J., WIDDECKE, H., DECKWER, W.D., Synthesis, properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol. **Macromol. Chem. Phys.** v. 195, p. 793-802, 1994.

XIU, Z. L.; SONG, B. H.; WANG, Z. T.; SUN, L. H.; FENG, E. M.; ZENG, A. P. Optimization of dissimilation of glycerol to 1,3-propanediol by *klebsiella pneumoniae* in one- and two-stage anaerobic cultures. **Biochemical Engineering Journal**. v 19, p. 189-197, 2004.

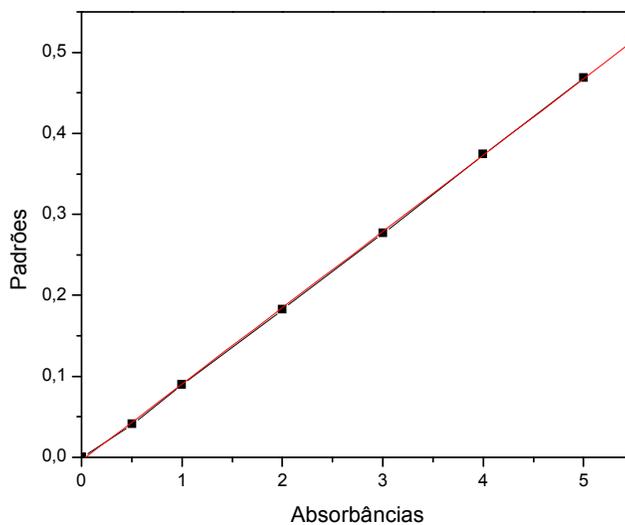
YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Curr. Opin. Biotechnol**, v. 18, p. 213-219, 2007.

ZENG AP, ROSS A, BIEBLE H, TAG C. Multiple Product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** v. 44, p. 902-911, 1994.

ZHAO, Y. N., CHEN, G., & YAO, S. J. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 32, p. 93-99, 2006.

## ANEXO A

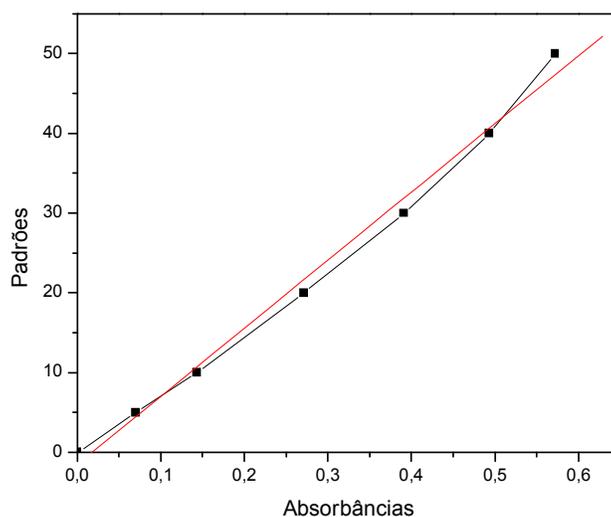
## Curva padrão do fósforo

**Figura 1A:** Curva de calibração de Fósforo

Uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 6.0, foi feita, cuja equação é expressa na Equação 1A.

$$\text{Concentração}(\text{mg} / \text{kg}) = 0,040185 + 10,60464 * \text{absorbância} \quad (1A)$$

### Curva padrão do enxofre



**Figura 2A:** Curva de calibração de enxofre

Uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 6.0 foi realizada para obtenção da equação da curva. Cuja equação é expressa na Equação 2A.

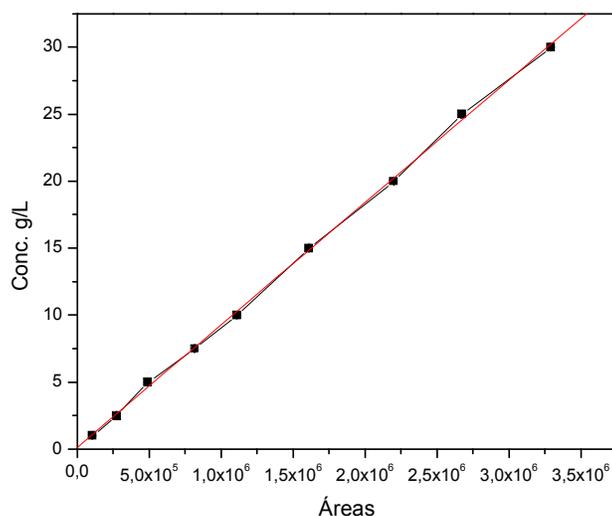
$$\text{Concentração(mg / kg)} = -1,54286 + 85,46394 * \text{absorbância} \quad (2A)$$

## ANEXO B

### Curva de calibração do Glicerol

A curva de calibração do glicerol foi constituída através das soluções padrões de glicerol nas seguintes concentrações: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30 g/L, todas as concentrações estavam em duplicata, possibilitando o cálculo da média e do desvio padrão. As soluções-padrão foram preparadas por diluição de uma “solução mãe” de concentração 30 g/L. As soluções padrões foram solubilizadas em água deionizada. As análises foram

realizadas por IR em CLAE. As condições cromatográficas que se utilizaram nas análises das soluções padrões foram: solução de fase móvel ácido fosfórico 0,1 M a uma vazão de 0,5 mL/min, durante 30 min, com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm (Supelco), a 30 °C, com volume de injeção das amostras de 10 µL e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm. A Figura 3A apresenta o gráfico da curva de calibração do glicerol.



**Figura 3A** – Curva padrão de glicerol

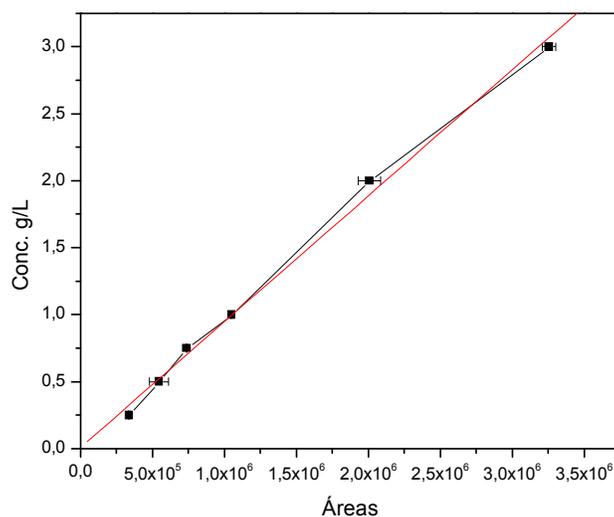
Fazendo-se uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 6.0, verifica-se através do  $R^2$  que os pontos estão bem ajustados, conforme se observa na Figura 3A, cuja equação é expressa na Equação 3A.

$$\text{Concentração}(g/L) = 0,10767 + 9,15E - 6 * \text{Área} \quad (3A)$$

### Construção da curva de calibração do Ácido Acético

A curva de calibração do ácido acético foi constituída através das soluções padrões de ácido acético nas seguintes concentrações: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0 g/L, todas as concentrações estavam em duplicata, possibilitando o cálculo da média e do desvio padrão.

As soluções-padrão foram preparadas por diluição de uma “solução mãe” de concentração 3 g/L. As soluções padrões foram solubilizadas em água deionizada. As análises foram realizadas por IR em CLAE. As condições cromatográficas que se utilizaram nas análises das soluções padrões foram: solução de fase móvel ácido fosfórico 0,1 M a uma vazão de 0,5 mL/min, durante 30 min, com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm (Supelco), a 30 °C, com volume de injeção das amostras de 10 µL e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm. A Figura 4A mostra o gráfico da curva de calibração do ácido acético.



**Figura 4A** – Curva padrão de Ácido acético

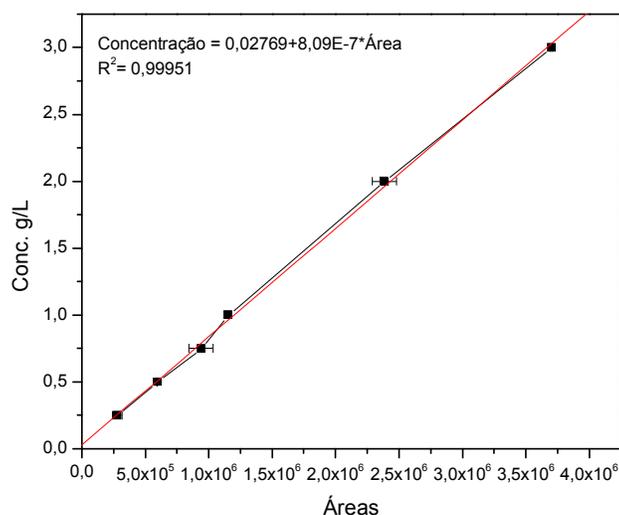
Fazendo-se uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 6.0, verifica-se através do  $R^2$  que os pontos estão bem ajustados, conforme se observa na Figura 4A, cuja equação é expressa na equação 4A.

$$\text{Concentração}(g / L) = 0,00674 + 9,40E - 7 * \text{Área} \quad (4A)$$

### **Construção da curva de calibração do 1,3-Propanodiol**

A curva de calibração do 1,3-Propanodiol foi constituída através das soluções padrões de 1,3 propanodiol, nas seguintes concentrações: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0 g/L,

todas as concentrações estavam em duplicata, possibilitando o cálculo da média e do desvio padrão. As soluções padrões foram solubilizadas em água deionizada. As soluções-padrão foram preparadas por diluição de uma “solução mãe” de concentração 3 g/L. As análises foram realizadas por IR em CLAE. As condições cromatográficas que se utilizaram nas análises das soluções padrões foram: solução de fase móvel ácido fosfórico 0,1 M a uma vazão de 0,5 mL/min, durante 30 min, com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm (Supelco), a 30 °C, com volume de injeção das amostras de 10 µL e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm. A Figura 5A mostra o gráfico da curva padrão do 1,3-propanodiol.



**Figura 5A** – Curva padrão de 1,3 propanodiol

Fazendo-se uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 6.0, verifica-se através do  $R^2$  que os pontos estão bem ajustados, conforme se observa na Figura 5A, cuja equação é expressa na equação 5A.

$$\text{Concentração}(g/L) = 0,02769 + 8,09E - 7 * \text{Área} \quad (5A)$$

### Construção da curva de calibração do Etanol

A curva de calibração do Etanol foi constituída através das soluções padrões de etanol, nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 g/L, todas as concentrações estavam em duplicata, possibilitando o cálculo da média e do desvio padrão. As soluções padrões foram solubilizadas em água deionizada. As soluções-padrão foram preparadas por diluição de uma “solução mãe” de concentração 35 g/L. As análises foram realizadas por IR em CLAE. As condições cromatográficas que se utilizaram nas análises das soluções padrões foram: solução de fase móvel ácido fosfórico 0,1 M a uma vazão de 0,5 mL/min, durante 30 min, com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm (Supelco), a 30 °C, com volume de injeção das amostras de 10 µL e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm. A Figura 6A apresenta o gráfico da curva padrão do etanol.

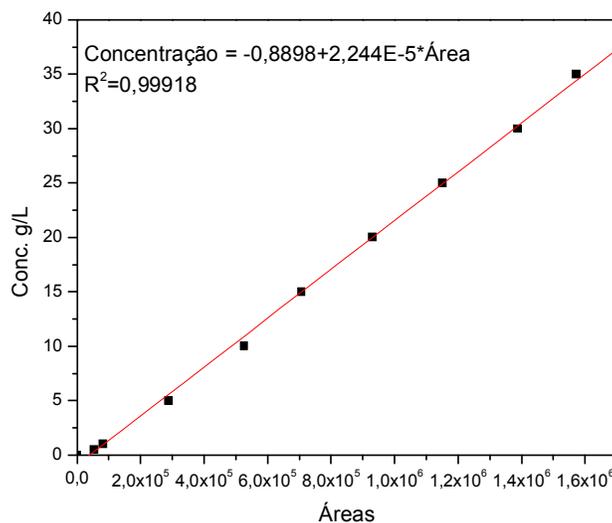


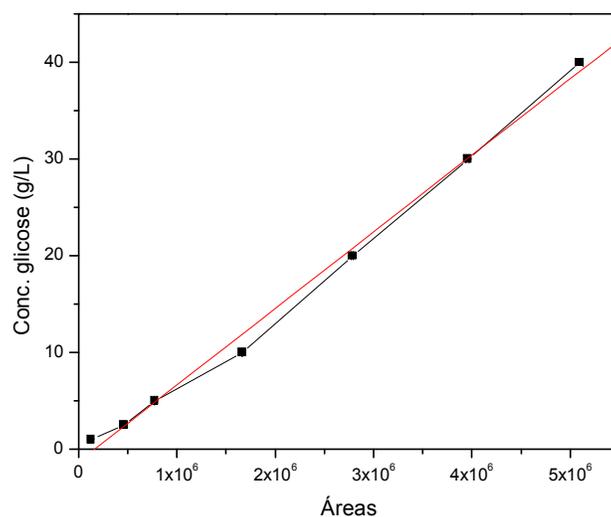
Figura 6A – Curva padrão de etanol

Fazendo-se uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 6.0, verifica-se através do  $R^2$  que os pontos estão bem ajustados, conforme se observa na Figura 6A, cuja equação é expressa na equação 6A.

$$Concentração(g/L) = -0,88984 + 2,24E - 7 * Área \quad (6A)$$

### Construção da curva de calibração da glicose

A curva de calibração de glicose foi constituída através das soluções padrões de etanol, nas seguintes concentrações: 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20; 30; 40 g/L, todas as concentrações estavam em duplicata, possibilitando o cálculo da média e do desvio padrão. As soluções padrões foram solubilizadas em água deionizada. As soluções-padrão foram preparadas por diluição de uma “solução mãe” de concentração 40 g/L. As análises foram realizadas por IR em CLAE. As condições cromatográficas que se utilizaram nas análises das soluções padrões foram: solução de fase móvel ácido fosfórico 0,1 M a uma vazão de 0,5 mL/min, durante 30 min, com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm (Supelco), a 30 °C, com volume de injeção das amostras de 10 µL e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm. Na Figura 7A pode-se observar o gráfico da curva padrão de glicose.



**Figura 7A** – Curva padrão de glicose

Fazendo-se uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 6.0, verifica-se através do  $R^2$  que os pontos estão bem ajustados, conforme se observa na Figura 7A, cuja equação é expressa na equação 7A.

$$\text{Concentração}(g / L) = -1,254 + 7,916E - 6 * \text{Área} \quad (7A)$$