



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



THANMILY PIRES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO NA GERAÇÃO  
DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE GLICEROL  
RESIDUAL POR *Enterobacter sp.***

OURO PRETO  
2019

THANMILY PIRES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO NA GERAÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE GLICEROL RESIDUAL POR *Enterobacter sp.***

Monografia ou Dissertação apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dra. Silvana de Queiroz Silva  
Co-orientador: Me. Isabela Morato de Souza

OURO PRETO  
2019

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P436a Pereira, Thanmily Pires .

Avaliação de diferentes meios de cultivo na geração de bioprodutos a partir da fermentação de glicerol residual por *Enterobacter* sp.

[manuscrito] / Thanmily Pires Pereira. - 2019.

19 f.: il.: gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Silva.



Coorientadora: Ma. Isabela Souza.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas .

1. Glicerina. 2. Enterobactérias. 3. Fermentação. 4. Álcool. I. Silva, Silvana. II. Souza, Isabela. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 573:6

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6 - 1589

 <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO</p> <p>DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDADE, EVOLUÇÃO E MEIO AMBIENTE</p> <p>Campus Morro do Cruzeiro – ICEB – CEP – 35.400-000</p> <p>Fone: (031) 3559-1747</p> <p>E-mail: <a href="mailto:debio@iceb.ufop.br">debio@iceb.ufop.br</a></p> <p>Web: <a href="http://www.iceb.ufop.br/debio">www.iceb.ufop.br/debio</a></p>	
---	---	---

**Ata da sessão pública para julgamento da Monografia de Thanmily Pires Pereira,  
Curso de Bacharelado Ciências Biológicas, DEBIO/ICEB/UFOP**

Aos dezessete dias do mês de dezembro de 2019, às 13:30h, no Laboratório Didático da Educação, reuniu-se a Comissão Julgadora composta pelo Dr. José Augusto Zorel, MSc. Camila de Paula Dias e Dra. Silvana de Queiroz Silva para a avaliação da monografia da aluna Thanmily Pires Pereira na área de Biologia, intitulada “Avaliação de diferentes meios de cultivo na geração de bioprodutos a partir da fermentação de glicerol residual por *Enterobacter sp.*”. A sessão pública foi aberta pela Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva, presidente da Comissão Julgadora e orientadora, que após formalidades de praxe, passou a palavra à aluna para a apresentação oral e, a seguir, iniciou o período de arguição pelos membros da banca. Terminada a arguição, a Comissão reuniu-se em sessão secreta para elaborar o relatório individual de apreciação da Monografia e decidiu pela aprovação da aluna com nota 9,5. Nada havendo mais a tratar, foi encerrada a sessão da qual lavrou-se a presente ata que vai assinada pela Comissão Julgadora. Ouro Preto, 17 de dezembro de 2019.



\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**  
**Presidente**



\_\_\_\_\_  
**Dr. José Augusto Zorel**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**



\_\_\_\_\_  
**MSc. Camila de Paula Dias**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**

A presente monografia de conclusão de curso está formatada nas normas da revista *Process Biochemistry* para short communication e faz parte da linha de pesquisa do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos (LBTM) da Universidade Federal de Ouro Preto.

O tema central refere-se a ensaios de fermentação do glicerol residual por *Enterobacter sp. 9R*, em que são avaliados diferentes meios de cultivo com intuito de utilizar esse subproduto para geração de metabólitos de valor agregado através de processos fermentativos, que pode ser uma solução viável econômica e ecologicamente para evitar problemas futuros advindos da acumulação de glicerol e tornar a produção de biodiesel mais competitiva.

## RESUMO

A produção de biodiesel vem aumentando globalmente por ser uma fonte renovável de energia, pela disponibilidade de recursos de biomassa e por ter um papel fundamental na redução do efeito estufa. Em razão desse aumento, há um conseqüente acúmulo de resíduos, dentre eles o glicerol bruto, que é um subproduto gerado durante o processo de produção de biodiesel, e esse crescimento levou a uma drástica diminuição do preço do glicerol nos últimos anos. Devido à natureza reduzida da molécula de glicerol, diferentes micro-organismos são capazes de convertê-lo em uma série de metabólitos. No entanto, o processo de fermentação deste substrato ainda é dificultado pela presença de impurezas e pelas altas concentrações necessárias para conferir aplicabilidade ao processo. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade fermentativa de uma cultura de *Enterobacter sp.*, em resposta a três meios de cultivo, visando compreender os efeitos de alterações na sua composição sobre a produção de metabólitos orgânicos, utilizando glicerol residual a 95 g/L como substrato. Os resultados indicaram que a melhor produção acumulada de 1,3-propanodiol ocorreu utilizando meio mínimo com levedura comercial (18,33 g/L) e que o meio de cultivo contendo água tamponada e extrato de levedura preparado promoveu uma produção de 13,57g/L de etanol e 5,9 g/L de ácido láctico, com rendimentos de 0,66 e 0,14, respectivamente. Sendo assim, devido à busca por um meio de cultivo mais simplificado e de baixo custo o meio contendo água tamponada e levedura residual se mostrou promissor.

Palavras chave: Glicerol, *Enterobacter sp.*, fermentação, etanol, 1,3-propanodiol, ácido láctico

## ABSTRACT

Biodiesel production has been increasing globally because it is a renewable source of energy, the availability of biomass resources and playing a key role in reducing the greenhouse effect. In reason to this increase, there is a consequent accumulation of residues, including crude glycerol, which is a byproduct generated during the biodiesel production process, and this growth has led to a drastic decrease in the price of glycerol in recent years. Due to the reduced nature of the glycerol molecule, different microorganisms are able to convert it into a series of metabolites. However, the fermentation process of this substrate is still hampered by the presence of impurities and the high concentrations necessary to confer applicability to the process. Thus, the present work aimed to evaluate the fermentative capacity of a *Enterobacter* sp. Culture in response to three culture media, aiming to understand the effects of their composition on the production of organic metabolites, using residual glycerol at 95 g / L as substrate. The results indicated that the best accumulated production of 1,3-propanediol occurred using minimum media with commercial yeast (18.33 g / L) and that the culture media containing buffered water and prepared yeast extract promoted a production of 13.57g. / L ethanol and 5.9 g / l lactic acid, with yields of 0.66 and 0.14, respectively. Thus, due to the search for a more simplified and low cost culture medium, the media containing buffered water and residual yeast becomes promising.

Keywords: Glycerol, *Enterobacter* sp, fermentation, ethanol, lactic acid, 1,3-propaneodiol

## 1 INTRODUÇÃO

A estrutura da sociedade moderna é fundamentada no uso de combustíveis fósseis, principalmente carvão mineral e petróleo, para a geração da energia e de compostos químicos necessários às atividades cotidianas. Entretanto, além da incerteza sobre a disponibilidade das reservas desses combustíveis, diversos problemas ambientais estão associados à sua produção e consumo (LI et al., 2013). A liberação de altas quantidades de CO<sub>2</sub> na atmosfera é alvo de intensas discussões e é correlacionada a situações como o efeito estufa e aquecimento global. Por isso, o desenvolvimento sustentável é uma abordagem que tenta satisfazer as necessidades humanas de uma maneira viável (BILGEN et al., 2008).

Entre os principais recursos energéticos renováveis em uso, estão a energia eólica, solar, hidroelétrica, biomassa (a qual inclui produtos e resíduos agroindustriais) e os biocombustíveis (bioetanol e biodiesel). O biodiesel, produzido principalmente a partir de óleos vegetais e gordura animal, é uma alternativa bastante vantajosa, principalmente no Brasil, devido à disponibilidade de matéria-prima, extensão territorial, condições climáticas e de solo propícias para a agricultura (PRATES et al, 2007). Em nosso país, desde 2005 o biodiesel vem sendo misturado ao diesel convencional vendido em postos varejistas, sendo que a partir de 2008 a adição de 2% de biodiesel ao diesel tornou-se obrigatória. Tal situação acarretou no aumento da demanda nacional de biodiesel, tornando o Brasil o segundo maior produtor mundial (PADULA et al., 2012).

Sendo o glicerol o principal subproduto da produção de biodiesel, o crescimento deste setor acarretou em uma redução drástica nos preços do glicerol residual nos últimos anos. Devido à presença de impurezas no glicerol derivado do biodiesel, como metanol, sais e sabões, a aplicação direta no ambiente é proibida porque acarreta na queima da cobertura vegetal e é prejudicial aos organismos aquáticos (SARMA et al., 2013). Com o intuito de evitar problemas



futuros advindos da acumulação desse subproduto e tornar a produção de biodiesel mais competitiva, é necessária a busca de alternativas para o uso do glicerol bruto gerado.

Assim, a valorização do glicerol como substrato para produção de metabólitos de valor agregado via processos fermentativos microbianos tem sido avaliada e estudos têm investigado metabólitos produzidos por organismos capazes de fermentar anaerobiamente o glicerol. No entanto, o potencial de alguns destes micro-organismos para produzir a nível industrial pode ser limitado devido à patogenicidade, exigência de condições anaeróbicas rigorosas, falta de ferramentas genéticas e conhecimento fisiológico necessário para a manipulação efetiva de certos organismos, restringindo assim a projeção de estratégias eficazes para melhorar a produção de compostos de interesse (CLOMBURG e GONZALEZ, 2013).

Dentre as bactérias capazes de metabolizar o glicerol, destacam-se espécies dos gêneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Anaerobiospirillum* e *Enterobacter*, gênero utilizado no presente trabalho. A escolha desse gênero se deu pelo fato desse possuir metabolismo anaeróbio facultativo, e ser capaz de converter o glicerol residual através de fermentação escura à metabólitos de valor agregado como hidrogênio, etanol, 1,3-propanodiol, e ácidos (como acético, butírico, láctico, succínico e fórmico) (RIVALDI et al., 2007).

Os metabólitos de interesse investigados no presente estudo são etanol, 1,3- propanodiol e ácido láctico. Estes possuem diversas aplicações industriais, o etanol por exemplo, é usado principalmente como combustível para transporte, mas também pode ser utilizado na indústria como solvente e intermediário químico. O ácido láctico tem sido utilizado na indústria de alimentos há vários anos, mas pode ser processado para produzir ácido acrílico ou 1,2-propanodiol usado em resinas de poliéster e poliuretano usado como degelo ou anti-congelante (ALMEIDA et al., 2012). Já 1,3-propanodiol tem aplicação abrangente, desde a produção de

polímeros, tintas, resinas de poliéster, lubrificantes, anti-congelante, até produção de cosméticos (RIVALDI et al., 2007).

A influência de fontes de nitrogênio, orgânicas e inorgânicas, como possíveis variáveis na produção fermentativa de metabólitos tem sido constantemente estudada. Sendo que a grande maioria dos trabalhos utiliza extrato de levedura comercial como fonte de nitrogênio, nutriente essencial para a produção de bioprodutos via fermentação anaeróbia (SILVA, 2017). Desta maneira, o presente trabalho buscou uma alternativa mais econômica para meio nutriente utilizado no ensaio de fermentação.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Origem do glicerol**

O glicerol residual foi obtido de uma usina de biodiesel da PETROBRAS BIOCOMBUSTÍVEIS S.A. – unidade Darcy Ribeiro (UBDR), localizada em Montes Claros, Minas Gerais.

### **Origem das leveduras residuais**

As informações relacionadas à obtenção, processamento e uso de leveduras residuais foram omitidas deste documento pela necessidade de sigilo por questão de patente.

### **Origem do inóculo**

A bactéria utilizada foi *Enterobacter sp* 9R, obtida por meio de isolamento de uma amostra de lodo de um reator anaeróbio alimentado com glicerol residual. A coleta da biomassa anaeróbia foi feita em reatores UASB alimentados com esgoto sanitário, localizado na Estação de Tratamento de Esgoto Arrudas (ETE Arrudas).

### **Ensaio de fermentação**

Em todos os experimentos, houve esterilização em autoclave a 120°C por 15 minutos das soluções de glicerol (concentração de 95 g/L). Ainda, para garantir anaerobiose, foi realizada a

purga dos frascos com gás N<sub>2</sub> (99,9999% de pureza) durante 2 min. Os ensaios foram realizados em frascos fechados de 50 mL, com 30 ml de fase líquida, 20 ml de headspace vedados com tampa de borracha, lacre metálico e cola quente.

Com a densidade óptica inicial pré-estabelecida ( $Abs_{560nm} = 0,035$ ), calculou-se o volume de micro-organismos, glicerol e água a adicionar em cada frasco para manter o volume final de 30 ml. A cultura bacteriana utilizada, *Enterobacter sp. 9R*, foi cultivada em placas de Petri contendo ágar nutriente e glicerol a 10 g/L incubadas por 16 h em estufa a 30°C, inoculado posteriormente em frascos de 50 mL, contendo meio nutriente e glicerol a 95 g/L. Para os ensaios de fermentação, os frascos foram mantidos por 264 h em shaker a 35°C a 180 rpm.

### **Meios de cultivo**

Foram utilizados três diferentes meios de cultivo para comparação dos rendimentos finais de bioprodutos, sendo o M1 o meio convencionalmente usado, o M2 e M3 com mudanças na composição conforme a descrição a seguir:

**M1:** Meio mínimo, com extrato de levedura comercial (MMCYE)

**M2:** Meio mínimo, com extrato de levedura preparado (MMRYC)

**M3:** Sem meio mínimo, água tamponada e extrato de levedura preparado (BWRYC)

O meio de cultivo mínimo foi adaptado de Homann e colaboradores (1990), composto de 3,4 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,005 g/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,02 g/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,25g NaHCO<sub>3</sub>. Juntamente ao meio mínimo foi acrescido 1 g/L de extrato levedura comercial, no caso do meio MMCYE (M1) e 1 g/L de extrato de levedura preparado no meio MMRYC (M2).

Para o preparo do meio BWRYC (M3) foram utilizados de 8,7092 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,8044 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1 g/L de extrato de levedura preparado. O pH utilizado para todos os meios foi de 6,5 e corrigido quando necessário com uma solução a 10% de NaOH ou de HCl.

## **Identificação e quantificação do substrato e dos produtos gerados na fermentação**

Amostras de 1,5mL foram retiradas periodicamente do ensaio de fermentação para análise dos metabólitos (tempos 0h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 168h, 240h e 264h). As amostras foram filtradas em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A separação dos metabólitos foi monitorada com o uso de um detector UV-Vis (SPD-10AV Shimadzu®), no comprimento de onda de 210 nm seguido de um detector de índice de refração (RID-6A Shimadzu®). A fase móvel empregada foi ácido sulfúrico a 6 mM (grau HPLC, Sigma) na vazão de 0,5 mL/min e a temperatura do forno (CTO-10A Shimadzu®) ajustada em 36 °C.

Para verificar os compostos produzidos, os tempos de retenção dos sinais dos cromatogramas foram comparados com os cromatogramas obtidos da separação da mistura de padrões de diferentes metabólitos. Na quantificação empregou-se curvas padrões na faixa de concentração de 100 mg/L a 2000 mg/L para álcoois, poliálcoois e ácidos orgânicos e 100 mg/L a 40000 mg/L para o glicerol. Após cada retirada de amostra e os frascos foram purgados por 2 min com N<sub>2</sub> (99,9%) para garantir anaerobiose e evitar acúmulo de pressão.

### **Análises estatísticas**

Embora os resultados dos ensaios de fermentação tenham apresentado produção de ácido succínico, fórmico, acético, propiônico e butírico, os rendimentos foram irrelevantes e, portanto, não serão analisados neste estudo. Os resultados obtidos dos principais metabólitos; etanol, 1,3-propanodiol e ácido láctico foram analisados pelo Minitab para análise da variância (ANOVA). Comprovada a normalidade do sistema, realizou-se o Teste de Tukey, um teste de comparação das médias utilizando confiança de 95%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando que a fermentação do glicerol pode produzir, além do hidrogênio, outros compostos de interesse e que a quantificação desses pode indicar quais as principais vias metabólicas ativas nos isolados, foi realizada a análise do caldo fermentado em diferentes intervalos de tempo. Na Figura 1, estão representados o consumo de glicerol e as curvas de crescimento de *Enterobacter sp.* 9R nos diferentes meios de cultivo, e a produção desses metabólitos em função do tempo estão demonstrados na Figura 2.

Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa no crescimento celular entre meios analisados e o maior consumo de glicerol ocorreu no meio BWRYC (M3), 57,78 % (Figura 1). A degradação do glicerol residual e o crescimento celular sofrem influência de fatores externos que interferem nas vias fermentativas do micro-organismo, como pH, temperatura e alcalinidade, além do acúmulo de intermediários e a presença de compostos considerados tóxicos (como ácidos graxos de cadeia longa, sais inorgânicos de cloretos e sulfatos), e também o excesso do próprio substrato ou produtos podem afetar a geração de metabólitos (Yong et al., 2001).

Com relação aos metabólitos, como observado na Figura 2 e Tabela 1, o maior rendimento (mol produto/mol glicerol consumido) ocorreu para o etanol, seguido por 1.3-PDO e ácido láctico. Os meios MMRYC (M2) e BWRYC (M3) se destacaram na produção de etanol, apresentando rendimentos de 0,69 e 0,66 mol/mol glicerol, respectivamente, com uma maior produção acumulada para o meio BWRYC, correspondente a 13,57 g/L de etanol, demonstrando que mesmo com o rendimento similar a MMRYC, sua produção acumulada foi maior.

Chanthoom e colaboradores (2016), obtiveram resultados da produção de etanol superiores aos do presente estudo. Utilizando glicerol residual a 25 g/L, alcançaram um

rendimento de 0,90 mol de etanol/mol de glicerol na fermentação de *Enterobacter aerogenes*. Já no trabalho de Wu e colaboradores (2011), na fermentação por *Klebsiella sp. HE1*, os autores utilizaram uma concentração de glicerol residual mais aproximada à do presente trabalho (70 g/L); e obtiveram um rendimento inferior, (0,26 mol de etanol/mol glicerol). Desta maneira, comparando os resultados encontrados com trabalhos que também utilizaram glicerol residual, os rendimentos deste estudo estão dentro do esperado de acordo com a literatura.

O segundo melhor rendimento foi referente à produção de 1,3-propanodiol com 0,6 mol/mol glicerol e produção de 18,32 g/L no meio MMRYC (M2). E outro metabólito de valor agregado obtido durante a fermentação foi o ácido láctico, que no meio de cultivo BWRYC (M3) teve produção de 5,89 g/L, correspondendo a um rendimento de 0,14 mol/ mol de glicerol.

Os modelos metabólicos para o metabolismo fermentativo do glicerol abrangem os genes, enzimas e vias metabólicas diretamente relacionadas à capacidade do micro-organismo de utilizar o glicerol como fonte de carbono. Quando internalizado à célula, o glicerol pode ser direcionado a três principais vias de bioconversão: formação de massa celular, via oxidativa (pela qual podem ser produzidos o ácido láctico e o etanol) e redução à 1,3-propanodiol (Clomburg & Gonzalez, 2013).

Para o produto 1,3-propanodiol nota-se que a presença de extrato de levedura comercial (meio MMCYE, M1) favoreceu a sua produção em detrimento à produção de etanol e ácido láctico. Esse efeito antagônico pode ser explicado pelas vias metabólicas responsáveis pela geração desses produtos, uma vez que a formação de bioprodutos pela via oxidativa utiliza equivalentes redutores necessários à formação de 1,3-PDO.

Na via de reductiva, o glicerol é convertido em 1,3-propanodiol através do intermediário 3-hidroxi-propionaldeído, reação catalisada pela enzima glicerol-desidratase dependente de coenzima B12. Logo este intermediário é reduzido a 1,3-PDO pela enzima 1,3-propanodiol-

desidrogenase dependente de NADH (Sarma et al., 2012). Esta via redutora é a mais bem caracterizada e é responsável por consumir o NADH liberado pela formação de massa celular, proporcionando assim um equilíbrio redox na ausência de receptores externos de elétrons (Clomburg & Gonzalez, 2013). Já a via oxidativa, é destinada à geração de energia e produção de compostos, como ácidos orgânicos (como o ácido lático), hidrogênio e outros combustíveis (como etanol) (Sarma et al., 2012).

A diferença apontada para as rotas preferenciais impostas pelo uso da levedura comercial e residual pode estar relacionada à integridade de moléculas importantes do metabolismo, tais como vitaminas, no extrato de levedura comercial. Considerando a conversão redutiva do glicerol à 1,3-propanodiol, já foi reportado a importância da vitamina B12 na reação de transformação do glicerol a 3-hidróxipropionaldeído, primeira etapa da produção de 1,3-propanodiol, pela enzima glicerol-desidratase (Biebl et al., 1999). A possível ausência ou baixa disponibilidade dessa vitamina (para os meios M2 ou M3) pode ter ocorrido devido ao método de rompimento celular utilizado neste trabalho, o qual pode ter acarretado na degradação de alguns nutrientes mais sensíveis durante a liberação do conteúdo intracelular. A falta ou menor disponibilidade de B12 nos meios M2 e M3 pode ter desfavorecido a ação da enzima glicerol-desidratase, favorecendo, desse modo, a atividade da via oxidativa do glicerol.

#### **4 CONCLUSÃO**

A cepa *Enterobacter sp.* 9R apresentou capacidade de consumir glicerol bruto o convertendo em bioprodutos de interesse econômico. O consumo máximo da fonte de carbono foi de 57,78% e o bioproduto com maior rendimento foi o etanol com produção de 13,57 g/L no meio BWRYC (M3, água com solução tampão e extrato de levedura preparado), meio que também proporcionou a maior produção de ácido lático (5,9 g/L), com rendimentos de 0,66 e

0,14 mol/mol de glicerol, respectivamente. Já a maior produção de 1,3-propanodiol (18,33 g/L) ocorreu em meio mínimo com extrato de levedura comercial (MMCYE), com um rendimento de 0,60 mol/mol de glicerol. Desta maneira, conclui-se que utilizando o meio BWRYC o ensaio de fermentação apresentou melhor produção dos metabólitos de interesse por *Enterobacter sp. 9R*, sendo este um meio de cultivo promissor devido sua composição simples e de baixo custo.

## **AGRADECIMENTOS**

Sou imensamente grata aos amigos e familiares por toda torcida e apoio, ao LBTM pelos anos de aprendizado e por ter proporcionado pessoas excepcionais que me orientaram durante esses anos: Flaviane, Zé, Ivon obrigada pela paciência e ensinamentos e Isabela e Prof. Silvana, agradeço a confiança e empenho na realização desse trabalho, sem vocês não seria possível! Agradeço também ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro e UFOP por toda estrutura e oportunidades ofertadas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. **Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste.** *Biotechnology for biofuels*, v. 5, n. 1, p. 48, jan. 2012.
- BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. **Microbial production of 1,3-propanediol.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, v. 52, p. 289-297.
- Bilgen, S., Keleş, S., Kaygusuz, A., Sarı, A., & Kaygusuz, K. (2008). **Global warming and renewable energy sources for sustainable development: A case study in Turkey.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12(2), 372–396.
- CHANTHOOM K., TANIKKULA P., SIRISUKPOKAB U., PISUTPAISAL N. **Ethanol Production form Biodiesel-derived Crude Glycerol by Enterobacter Aerogenes.** *Chemical Engineering Transactions* v. 50, 2016.
- CLOMBURG J.M, GONZALEZ R. **Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals.** *Trends in Biotechnology*, Janeiro 2013, Vol. 31, No. 1
- HOMANN, T., TAG, C., BIEBL, H., DECKWER, W., SCHINK, B., BIOTECHNOLOGISCHE, G., REPUBLIC, F. (1990). **Applied Microbiology Biotechnology Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by Klebsiella and Citrobacter strains.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 33(2), p. 121–126
- LI C., LESNIK K.L, LIU H. **Microbial Conversion of Waste Glycerol from Biodiesel Production into Value-Added Products.** V. 6, p.4739-4768, 2013
- PADULA, A. D. et al. **The emergence of the biodiesel industry in Brazil: Current figures and future prospects.** *Energy Policy*, v. 44, p. 395–405, maio 2012 [1]  
[SEP]
- PRATES, Cláudia Pimentel Trindade; PIEROBON, Ernesto Costa; COSTA, Ricardo Cunha da. **Formação do mercado de biodiesel no Brasil.** BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n.25 , p. 39-64, mar. 2007.
- RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. DA. **Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento d o glicerol gerado da produção de biodiesel.** *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, 2007.]
- SARMA, S. J., BRAR, S. K., SYDNEY, E. B., LE BIHAN, Y., BUELNA, G., & SOCCOL, C. R. (2012). **Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review.** *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37(8), p. 6473–6490

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; et al. **Bio-hydrogen production by biodiesel-derived crude glycerol bioconversion: a techno-economic evaluation.** *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 36, n. 1, p. 1–10, jan. 2013.

SILVA, F.C.; **Avaliação da condição nutricional e do tipo de inóculo na geração de bioprodutos a partir da fermentação de glicerol residual.** 2017. 138f Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Ouro Preto, 2017.

VICTRAL, D. M.; AQUINO, S. F.; SANTOS, V. S.; BAÊTA, B. E. L. **Application of Residual Yeast as a Source of Redox Mediators for the Anaerobic Decolorization of a Model Azo Dye.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering (Impresso)*, 2015

Wu, K.-J., Lin, Y.-H., Lo, Y.-C., Chen, C.-Y., Chen, W.-M., & Chang, J.-S. (2011). **Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation.** *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 20–25.

YONG, K C; OOI, T L; DZULKEFLY, K; WAN YUNUS, W M Z and HAZIMAH, A H (2001). **Characterization of glycerol residue generated from a palm kernel oil methyl ester plant.** *Journal of Oil Palm Research* Vol. 13 (2). In press.

## FIGURAS

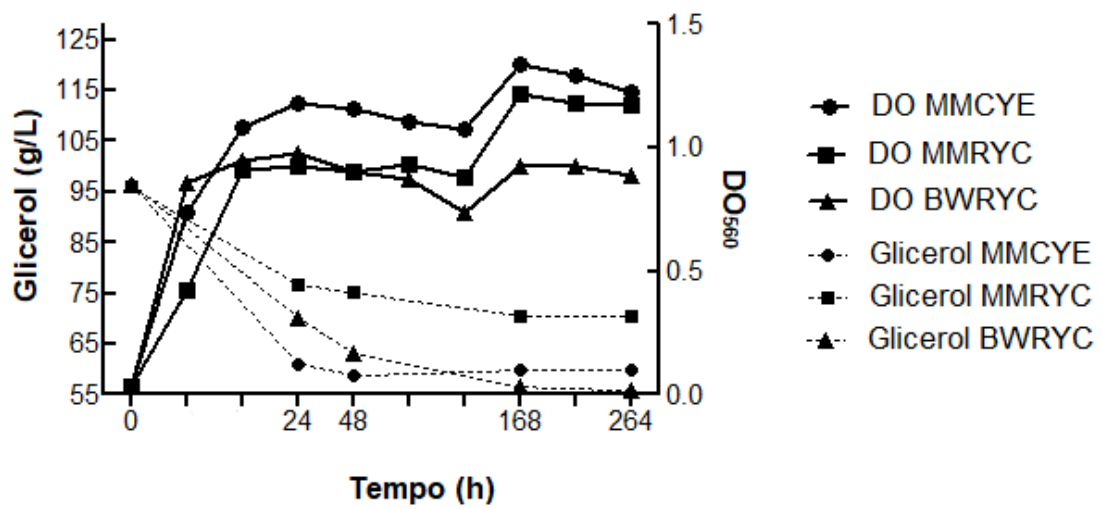


Figura 1. Consumo de glicerol e curva de crescimento de *Enterobacter sp. 9R* para os meios de fermentação MMCYE, M1 (●), MMRYC, M2 (■) e BWRYC, M3 (▲).

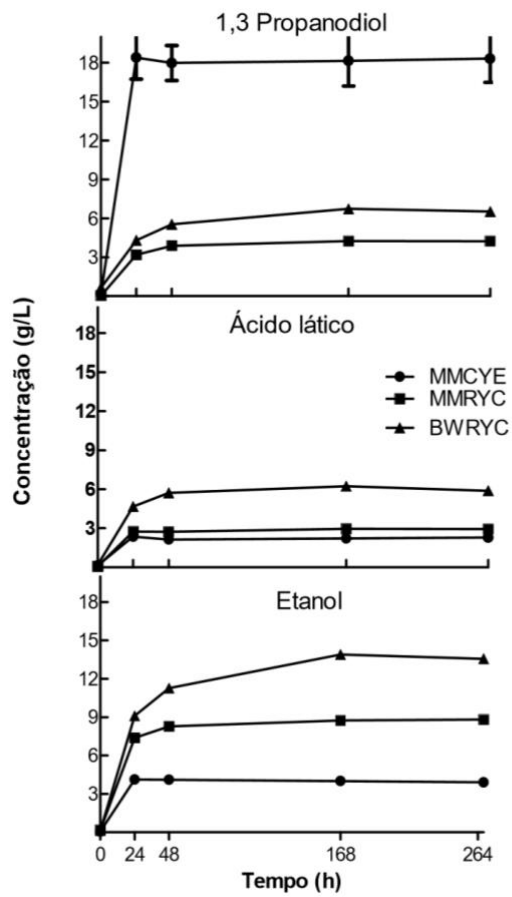


Figura 2. Produção dos metabólitos obtidos na fermentação do glicerol utilizando os meios de cultivo MMCYE, M1 (●), MMRYC, M2 (■) e BWRYC, M3 (▲)..

Tabela 1. Dados experimentais do consumo de glicerol, produção acumulada e rendimento dos metabólitos durante a fermentação.

Meio de Cultivo	Glicerol consumido (%)	Produção acumulada (g/L)			Rendimento (mol/mol de glicerol)		
		Etanol	Ác. Lático	1,3-PDO	Etanol	Ác. Lático	1,3-PDO
<b>MMCYE</b>	37,76	3,91	2,29	18,32	0,21	0,06	0,60
<b>MMRYC</b>	26,46	8,82	2,94	4,23	0,69	0,12	0,20
<b>BWRYC</b>	57,78	13,57	5,89	6,52	0,66	0,14	0,19