

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Letícia Passos Miranda

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM DE *Escherichia coli* ADAPTADA
AO GLICEROL BRUTO PROVENIENTE DA SÍNTESE DE BIODIESEL POR
ENGENHARIA EVOLUTIVA

São Carlos – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Letícia Passos Miranda

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM DE *Escherichia coli* ADAPTADA
AO GLICEROL BRUTO PROVENIENTE DA SÍNTESE DE BIODIESEL POR
ENGENHARIA EVOLUTIVA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dra. Teresa Cristina Zangirolami (DEQ-UFSCar)

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta (DEQ-UFSCar)

São Carlos – 2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M672o Miranda, Letícia Passos
 Obtenção e caracterização de linhagem de
Escherichia coli adaptada ao glicerol bruto
proveniente da síntese de biodiesel por engenharia
evolutiva / Letícia Passos Miranda. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
 126 p.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

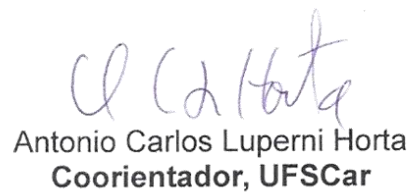
 1. E. coli K12. 2. Evolução adaptativa. 3.
Glicerol bruto. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LETÍCIA PASSOS MIRANDA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 31 DE MARÇO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:



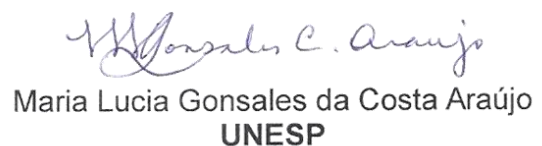
Teresa Cristina Zangirolami
Orientadora, UFSCar



Antonio Carlos Luperni Horta
Coorientador, UFSCar



Cristiane Sanchez Farinas
EMBRAPA



Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo
UNESP

Aos meus pais, minhas irmãs e sobrinha, às minhas avós e ao clã Passos: vocês são meu porto seguro e sempre torceram por mim. Aos meus avôs que juntos, ao lado de Deus intercederam para essa conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus por nunca ter me desamparado e sempre me ensinando que com Fé tudo se vence!

Aos meus pais, Odon e Aparecida, por acreditarem em mim, me incentivarem e não pouparem esforços quando eu mais precisei. Pai obrigada pelas duras palavras quando necessário e mãe por me compreender sempre. As minhas irmãs Thaís e Déborah e a Sofia, o amor da tia, pelo companheirismo, cumplicidade e amizade. A conquista desse trabalho é nossa!

A toda família Passos, que não mediram esforços em me ajudar a superar toda a distância de casa, em especial a tia Dinda, Inho e Memel, companheiros de conversas no Skype.

Às minhas avós, Nonoca e Edith, vocês são meus exemplos de vida!

Aos meus avôs, Raimundo e Odon que já estão junto de Deus, me abençoando o tempo todo e cuidando sempre de mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami pela confiança em mim depositada, pela paciência, pelos ensinamentos, pelo apoio durante a realização dos experimentos e contribuições para que este trabalho fosse concluído.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta pelo otimismo, ensinamentos, pela ajuda na parte experimental e contribuições.

Ao Prof. Dr. Beny Spira, à Profa. Dra. Isabel Rocha, ao Breno e à Fertibom, por terem cedido o material para que esse trabalho fosse realizado e a Alice Raabe e a Embrapa Instrumentação Agropecuária pela contribuição nas análises.

À Cintia, Daniela, Gabriel e Gilson pelas inúmeras vezes que me socorreram durante todo o mestrado, sanando as dúvidas, ajudando nos experimentos e nas análises.

À Adri, Alexandre, Aline, Alisson, André, Chachá e Laiane colegas que ao longo do mestrado se tornaram amigos compartilhando todos os momentos, dos mais árduos aos mais simples, vocês contribuíram para que essa jornada fosse mais leve.

À todos da Bioquímica e do LaFaC pela troca de conhecimentos, ajuda, e pelos momentos de descontração.

À Giovana e a Renata por aguentarem as minhas maluquices, desesperos e cantorias, pela preocupação em saberem se está indo tudo certo e sempre oferecendo ajuda. Rê obrigada pela companhia nas várias madrugadas realizando experimentos e Gi pelas milhares de vezes que aluguei a sua espaçosa mesa e a telinha rsrs.

Às amigas Nah, Be, Tats, Fran, Sil, e Selena, apesar da enorme distância foram por muitas vezes meu refúgio nos desabafos e grandes incentivadoras.

Aos técnicos, cujo trabalho e dedicação possibilitaram a realização deste trabalho.

A UFSCar, seus docentes e funcionários e ao PPG-EQ, sem os quais nada disso seria possível.

À CAPES pelo apoio financeiro.

**“Tudo é do Pai
Toda honra e toda glória
É Dele a vitória
Alcançada em minha vida”.**

(Frederico Cruz)

RESUMO

O biodiesel é um combustível renovável cuja produção gera o glicerol bruto (GB) como principal subproduto. O aproveitamento de GB como fonte de carbono em cultivos de microrganismos se apresenta como uma alternativa para agregar valor e reduzir o impacto ambiental deste resíduo. Contudo, as impurezas do GB (sais, ésteres, álcool e sabão) podem inibir o crescimento das células. Técnicas que visam adaptar os microrganismos via evolução adaptativa a ambientes contendo contaminantes vêm sendo empregadas para contornar problemas de inibição. As estratégias de adaptação permitem impor uma certa pressão seletiva sobre a população, favorecendo o aparecimento de mutantes e a seleção de mutações benéficas, que tornam a célula mais apta a se desenvolver em um ambiente hostil. O trabalho empregou a metodologia de Evolução Adaptativa para obter uma linhagem de *E. coli* K12 adaptada ao GB concentrado por rotaevaporação (GBRota). Os cultivos foram realizados tanto em placas (linhagem *E. coli* – USP) incubadas a 37°C, como em frascos agitados (linhagem *E. coli* – UMinho), mantidos a 37°C e 300 rpm, envolvendo transferências para meios definidos gradualmente enriquecidos com GBRota. A linhagem evoluída obtida assim como a linhagem selvagem *E. coli* – UMinho foram caracterizadas em cultivos em biorreator de bancada de 2 L, dotado de sistema de monitoramento e controle. Durante os experimentos em frascos agitados, o crescimento foi acompanhado por leitura de densidade ótica (DO). Nos cultivos em biorreator, amostras foram coletadas para análises de concentração celular da suspensão (DO e massa seca), da concentração de glicerol, etanol e ácidos orgânicos (por cromatografia líquida), da concentração de células viáveis (por contagem de unidades formadoras de colônia) e de morfologia. Para os cultivos de caracterização da *E. coli* – USP realizados em frascos agitados, os valores da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{\max}) permaneceram entre 0,40 e 0,45 h⁻¹, sendo pouco influenciados pela linhagem ou pela composição dos meios, sugerindo que a metodologia adotada para adaptação em placa não foi eficiente, já que a linhagem selecionada não possuía características diferenciadas em relação à linhagem selvagem. Para a *E. coli* – UMinho foram avaliadas duas estratégias de adaptação: transferências sucessivas na fase exponencial do cultivo (DO = ~2,5) e na fase estacionária (DO = ~10). Em ambos os casos, as células evoluíram, apresentando aumento nos valores de μ_{\max} , sendo que populações mais homogêneas foram observadas na adaptação realizada pela primeira estratégia. Após 26 dias de adaptação, correspondendo a 534 gerações, foi selecionada pela metodologia de transferências sucessivas na fase exponencial, uma linhagem evoluída apresentando velocidade máxima específica de 0,60 h⁻¹, resultado superior em 27,6% ao da linhagem selvagem (0,47h⁻¹), capaz de crescer em meio contendo ~30 g/L de glicerol proveniente do GBRota. As linhagens selvagem e evoluída foram cultivadas em biorreator contendo meio preparado com GBRota na concentração de 40 g/L de glicerol. A linhagem evoluída manteve o μ_{\max} de 0,61 h⁻¹. Foi observada formação de acetato, com rendimento de 0,19 g_{acetato}/g_{glicerol}, o que causou inibição do crescimento e limitou o rendimento em biomassa a 0,26 g_{biomassa}/g_{glicerol}. Enquanto que, para a linhagem selvagem o cultivo em biorreator apresentou uma fase lag de 24 h, um μ_{\max} de 0,28 h⁻¹, rendimento em biomassa de 0,39 g_{acetato}/g_{glicerol} e rendimento em acetato 0,19 g_{acetato}/g_{glicerol}. A linhagem evoluída obtida no presente trabalho, capaz de crescer no resíduo da produção de biodiesel, apresenta μ_{\max} semelhante aos melhores resultados relatados na literatura para adaptação de *E. coli* em glicerol puro (0,7 h⁻¹), demonstrando o sucesso da aplicação da metodologia de evolução adaptativa. O acúmulo de acetato pode ser amenizado utilizando técnicas de Engenharia Genética para manipulação das vias metabólicas e permitindo o desenvolvimento de uma linhagem industrial que poderá ser empregada como plataforma para obtenção de produtos de alto valor agregado usando o glicerol não refinado como substrato.

Palavras chaves: *E. coli* K12; evolução adaptativa; glicerol bruto

ABSTRACT

Biodiesel is a renewable fuel and its production generate raw glycerol (RG) as main byproduct. The use of RG as carbon source in microorganism cultivations poses as an alternative to add value and reduce the environmental impact of this residue. However, RG impurities (salts, esters, alcohol and soap) can inhibit cell growth. Techniques that aims adapting microorganisms to environments containing contaminants by adaptive evolution have been employed to overcome inhibition problems. Adaptation strategies allows imposing a certain selective pressure upon the population, favoring the appearance of mutants and selection of most beneficial mutations, which will make the cell more suited to develop itself in a hostile environment. This work employed Adaptive Evolution methodology to obtain an *E. coli* K12 strain adapted to RG concentrated by rotary evaporation (RGRota). Cultivations were carried out in plates (*E. coli* – USP strain) incubated at 37 °C, as well as shaken flasks (*E. coli* – UMinho strain), kept at 37 °C and 300 rpm, involving transfers to defined media gradually enriched with RGRota. Obtained evolved strain as well as the wild-type strain *E. coli* – UMinho were characterized in cultivations using 2 L, bench-scale bioreactor, equipped with monitoring and control system. During shaken flask experiments, growth was followed by optical density (OD) readings. In bioreactor cultures, samples were withdrawal to analyze cell concentration of the suspension (OD and dry cell weight), concentrations of glycerol, ethanol and organic acids (liquid chromatography), concentration of viable cells (colony forming units counting) and morphology. Cultures characterization were carried out with *E. coli* – USP in shaken flasks, the values of maximum specific growth rate (μ_{\max}) remained between 0.40 e 0.45 h⁻¹ and they showed little influence of strain or media composition. These results suggest that the selected strain did not have differentiated characteristics from the wild-type strain. For *E. coli* – UMinho, two adaptation strategies were evaluated: successive transfer during exponential growth phase (OD = ~2.5) and during stationary growth phase (OD = ~10). In both cases cells evolved, showing increased μ_{\max} values, with more homogeneous populations being observed for adaptation conducted under the first strategy. After 26 days of adaptation, corresponding to 534 generations, an evolved strain, exhibiting μ_{\max} of 0.60 h⁻¹ and capable of growing in medium containing 29 g/L of glycerol from RGRota was selected by the methodology of successive transfers in exponential phase. This growth rate was 27.6 % superior to that achieved by the wild-type strain (0.47 h⁻¹). Evolved and wild-type strains were cultivated in bioreactor, containing defined medium prepared with GBRota to have 40 g/L of glycerol. The evolved one maintained μ_{\max} of 0.61 h⁻¹. Acetate formation was observed, with yield of 0.19 g acetate/g glycerol, which caused growth inhibition and limited biomass yield to 0.26 g_{biomass}/g_{glycerol}. When the wild-type strain was cultivated in bioreactor, exponential growth started after 24 h of lag phase and it presented μ_{\max} of 0.28 h⁻¹, biomass yield of 0,39 g_{biomass}/g_{glycerol} and acetate yield of 0.19 g_{acetate}/g_{glycerol}. The evolved strain obtained, capable of growing in the biodiesel production residue, showed a μ_{\max} value similar to the best results reported in the literature for *E. coli* adaptation in pure glycerol (0.7 h⁻¹), what demonstrates the successful application of the adaptive evolution methodology. Acetate accumulation can be reduced by Genetic Engineering techniques to manipulate metabolic pathways and this will lead to development of an industrial strain which can be employed as a platform of high value products using unrefined glycerol as substrate.

Keywords: *E. coli* K12; adaptive evolution; unrefined glycerol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Matriz energética do Brasil.....	29
Figura 2 - Reação global de transesterificação de triglicerídeos.....	32
Figura 3 - Produtos da reação de transesterificação em decantação.....	32
Figura 4 - Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos e seus possíveis produtos.....	38
Figura 5 - Esquema de Rotaevaporação.....	46
Figura 6 – Esquema de morfologia de colônia.....	50
Figura 7 - Esquema de confecção dos criotubos.....	52
Figura 8 - Esquema estratégia de adaptação <i>E. coli</i> - USP.....	53
Figura 9 - Esquema de cultivo em shaker.....	54
Figura 10 - Estratégia de adaptação evolutiva.....	56
Figura 11 - Esquema para cada cultivo de caracterização.....	58
Figura 12 - Massa de CO ₂ produzido e a massa de células acumulada durante a fase exponencial. Cultivo 2, Linhagem evoluída.....	63
Figura 13 - Ajuste da função de decaimento exponencial com os dados normalizados da DO _{600nm} para cada frasco (f) com meio isento de células.....	66
Figura 14 - Glicerol bruto antes e após rotaevaporação.....	70
Figura 15 - Cultivos em placa - <i>E. coli</i> - USP.....	73
Figura 16 - Cultivo em placa – <i>E. coli</i> - USP.....	74
Figura 17 - Crescimento celular das linhagens selvagem e selecionada em cultivo em shaker com meio definido usando GP ou GBRota. pH: 6,3, T: 37°C, 300 rpm. A barra de erro é referente às duplicatas.....	76
Figura 18 - Curva logarítmica de crescimento celular das linhagens selvagem e selecionada em cultivo em shaker com meio definido usando GP ou GBRota. pH: 6,3, T: 37°C, 300 rpm. A barra de erro é referente às duplicatas.....	76
Figura 19 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 2. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm.....	79
Figura 20 - Velocidade específica máxima de crescimento celular <i>E. coli</i> – UMinho, FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 2. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos 9,14,16: não foi possível quantificar $\mu_{m\acute{a}x}$	80
Figura 21 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 3. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm.....	80

Figura 22 - Velocidade específica máxima de crescimento celular <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 3. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Frascos: 2,8,10,14 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$	81
Figura 23 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 4. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm.....	82
Figura 24 - Velocidade específica máxima de crescimento celular <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 4. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 2, 6, 11, 15, 20, 21 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$	82
Figura 25 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho – Fexp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 5. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 22, 23: apresentavam pontos insuficientes para plotar o gráfico	83
Figura 26 - Velocidade específica máxima de crescimento celular <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 5. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 2, 3, 6, 11, 15, 20, 22, 23 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$	83
Figura 27 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 6. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 1, 5, 7, 15 apresentavam pontos insuficientes para plotar o gráfico	84
Figura 28 - Velocidade específica máxima de crescimento celular <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 6. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 1, 5, 7, 15 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$	85
Figura 29 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 7. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 4, 7, 12, 13 apresentavam pontos insuficientes para plotar o gráfico	86
Figura 30 -Velocidade específica máxima de crescimento celular <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 7. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 4, 7, 12, 13 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$	86
Figura 31 Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho – Fexp. Estratégia de adaptação evolutiva repetição da condição 7. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivo: 8 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$	87
Figura 32 - Velocidade específica máxima de crescimento celular <i>E. coli</i> – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva repetição condição 7. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivo: 8 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$	88
Figura 33 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 2. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 5, 6, 14 não determinado.....	89

Figura 34 - Velocidade específica máxima de crescimento celular <i>E. coli</i> – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 2. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 5, 6, 12 não determinado	90
Figura 35 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 3. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos:2, 3, 5, 10 não determinados.....	90
Figura 36 - Velocidade específica máxima de crescimento celular <i>E. coli</i> – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 3. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 2, 3, 5, 10 não determinado	91
Figura 37 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 4. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 13 não determinado ...	91
Figura 38 - Velocidade específica máxima de crescimento celular <i>E. coli</i> – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 4. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 13 não determinado	92
Figura 39 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 5. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 4, 8, 9, 11 não determinado	92
Figura 40 - Crescimento <i>E. coli</i> – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 4. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 4, 8, 9, 11 não determinado	93
Figura 41 - Comparativo entre $\mu_{\text{máx}}$ médio da FExp com FEst	93
Figura 42 - Curva de crescimento - Cultivo A-1	95
Figura 43 - Curva de crescimento - Cultivo A-2	96
Figura 44 - Perfil logarítmico do crescimento – Cultivo A-2	96
Figura 45 - Curva de crescimento - Cultivo A-3	97
Figura 46 - Curva de crescimento - Cultivo A-4	98
Figura 47 - Análise de morfologia das colônias <i>E. coli</i> – UMinho. A legenda nas fotos corresponde ao cultivo (A1, A2, A3), à fase do crescimento na qual a amostra da suspensão foi plaqueada (FExp, FEst) e ao meio da placa (Def., LB).....	100
Figura 48 - Análise morfológica celular das linhagens selvagem e evoluída da <i>E. coli</i> - UMinho	101
Figura 49 - Perfil de crescimento, consumo da fonte de carbono e etanol, UFC durante o cultivo 1 (<i>E. coli</i> Selvagem em GB Rota 40 g/L).....	103
Figura 50 - Recuperação de carbono no Cultivo 1	105
Figura 51 - Perfil de crescimento, consumo da fonte de carbono e etanol, formação de metabólitos durante o Cultivo 2 (<i>E. coli</i> Evoluída em GB Rota 40 g/L)	106

Figura 52 - Crescimento da linhagem evoluída obtida na condição 6 em cultivo em biorreator	107
Figura 53 - $\mu_{\text{máx}}$ obtido a partir dos dados do CO ₂	107
Figura 54 - Recuperação de carbono no Cultivo 2.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Evolução da utilização de diferentes matérias-primas para produção de biodiesel	31
Tabela 2 - Produção de biodiesel e glicerol bruto no Brasil.....	31
Tabela 3 - Composição do glicerol bruto obtido durante a produção de biodiesel metílico em função de diferentes matérias primas	34
Tabela 4 - Caracterização do Glicerol Bruto Rotaevaporado.....	46
Tabela 5 - Composição do meio complexo LB	47
Tabela 6 - Composição do meio definido.....	48
Tabela 7 - Cultivos realizados em shaker com <i>E. coli</i> - USP selvagem e evoluída	54
Tabela 8 - Cultivos em shaker <i>E. coli</i> - UMinho.....	57
Tabela 9 - Meios usados no pré inóculo e inóculo do reator	60
Tabela 10 - Caracterização do resíduo bruto (cedido pela Fertibom) e dos GBRota obtido após as rotaevaporações.....	69
Tabela 11 - Caracterização glicerol bruto rotaevaporado 7.....	70
Tabela 12 - Composição do meio definido em placa e tempo de incubação.....	72
Tabela 13 - Características dos cultivos em shaker com <i>E. coli</i> - USP.....	75
Tabela 14 - Valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ para cada condição	77
Tabela 15 - Experimentos de adaptação evolutiva com <i>E. coli</i> - UMinho.....	78
Tabela 16 - Valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ encontrados nos cultivos em shaker com <i>E. coli</i> - UMinho.....	95
Tabela 17 - Resumo dos resultados obtidos na evolução adaptativa.....	98
Tabela 18 - Concentrações iniciais de glicerol e etanol em cultivos em reator com linhagens selvagem e evoluída usando GBRota como fonte de carbono	102
Tabela 19 - Produção de ácidos orgânicos no Cultivo 1	104
Tabela 20 - Produção de ácidos orgânicos no Cultivo 2.	108
Tabela 21 - Principais resultados em biorreator: linhagem selvagem e evoluída	110
Tabela 22 - Cultivos com <i>E. coli</i> K12 MG 1655.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEL	Adaptação evolutiva laboratorial
BPF	Boas Práticas de Fabricação
C_0	Concentração de carbono presentes no reator no tempo de referência (mol de carbono)
C_i	Concentração da fonte de carbono ou ácido orgânico (g/L)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO_2	Dióxido de carbono ou Gás carbônico
COD	Concentração de oxigênio dissolvido
C_p	Concentração de produto (g/L)
C_{pin}	Concentração de produto no início da fase exponencial
C_s	Concentração de substrato (g/L)
C_{sin}	Concentração de substrato no início da fase exponencial (g/L)
C_x	Concentração celular (gMS/L ou g/L)
C_{x0}	Concentração celular inicial (gMS/L ou g/L)
C_{xin}	Concentração celular no início da fase exponencial (g/L)
DO	Densidade Ótica
DO_{600nm}	Densidade Ótica no comprimento de onda de 600nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i> – UMinho	<i>Escherichia coli</i> cedida pela Universidade do Minho
<i>E. coli</i> – USP	<i>Escherichia coli</i> cedida pela USP
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
FEst	Transferência na fase estacionária
FExp	Transferência na fase exponencial
GB	Glicerol bruto
GBRota	Glicerol bruto rotaevaporado
GP	Glicerol puro
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
LaFac	Laboratório de Fábricas Celulares
LB	Lúria Bertani
MMi	Massa molar da fórmula mínima (g/mol)
MMx	Massa molar da fórmula mínima (ou elementar) da biomassa (g/mol)
MONG	Matéria orgânica não glicerol
m_x	Massa de células (g)
m_{CO_2}	Massa de dióxido de carbono (g)
n_{CO_2}	Número de mols de CO_2 (mol)
N_{AO}	Número de mols de carbono nos ácidos orgânicos (mol de carbono)
N_{Cx}	Número de mols de carbono na biomassa (mol de carbono)
N_{FC}	Número de mols de carbono nas fontes de carbono (mol de carbono)
P	Pressão (atm)
PHAs	Polihidroxialcanoatos

PROBIODIESEL	Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel
$Q_{gás_saída}$	Vazão total dos gases na saída do reator (L/h)
R	Constante universal dos gases ((atm.L)/(mol.K))
RPM	Rotações por minuto
T	Temperatura (°C ou K)
t	Tempo (s ou h)
$t_{cultivo}$	Tempo de interrupção do cultivo (fase exponencial) (h)
t_d	Tempo de duplicação (h)
UFC	Unidades formadoras de colônias
USP	Universidade de São Paulo
V	Volume (L ou mL)
$Y_{p/s}$	Coefficiente de rendimento em produto ($g_{produto}/g_{substrato}$)
$Y_{x/s}$	Coefficiente de rendimento em biomassa ($g_{célula}/g_{substrato}$ ou gMS/g)
$y_{CO_2,e}$	Fração molar de CO ₂ na entrada
$y_{CO_2,s}$	Fração molar de CO ₂ na saída

Símbolos gregos

μ	Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
$\mu_{máx}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
η_{ger}	Número de gerações
$\eta_{ger\ total}$	Número de geração total ao final do processo de adaptação evolutiva
κ	Representa a condição de adaptação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Objetivos	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	Biodiesel	29
2.2	Glicerol	32
2.2.1	Glicerol bruto em processos fermentativos	33
2.3	<i>Escherichia coli</i>	36
2.3.1	Metabolismo do glicerol em cultivo com <i>E. coli</i>	37
2.4	Evolução adaptativa	39
2.4.1	Estratégias de evolução adaptativa	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1	Microrganismo	45
3.2	Glicerol Bruto	45
3.2.1	Caracterização do Glicerol Bruto Rotaevaporado	46
3.3	Meio de cultivo	47
3.4	Métodos Analíticos	48
3.4.1	Determinação da concentração celular	48
3.4.2	Concentração de fonte de carbono (glicerol), etanol e ácidos orgânicos	49
3.4.3	Análise de morfologia de colônia	49
3.4.4	Análise da morfologia celular	50
3.4.5	Determinação Massa Seca do GBRota	50
3.4.6	Determinação de contagem de UFC	51
3.5	Procedimento experimental	51
3.5.1	Ativação da cepa e preparação de criotubos – Linhagem selvagem	51
3.5.2	Experimentos com a cepa <i>E. coli</i> – USP	52
3.5.2.1	Seleção de células adaptadas ao GBRota para <i>E. coli</i> – USP	52
3.5.2.2	Cultivo em shaker com linhagem selvagem e linhagem selecionada - <i>E. coli</i> - USP	53
3.5.3	Experimentos com a cepa <i>E. coli</i> – UMinho	54
3.5.3.1	Adaptação evolutiva da <i>E. coli</i> – UMinho	54

3.5.3.2	Cultivo em shaker com linhagem selvagem e linhagem evoluída - <i>E. coli</i> - UMinho	56
3.5.3.3	Cultivos em Biorreator	59
3.5.3.3.1	Preparo do pré inóculo e inóculo para cultivos em biorreator	59
3.6	Procedimentos de Cálculo.....	60
3.6.1	Vazão molar de CO ₂ produzido e número de mols de CO ₂ acumulado.	60
3.6.2	Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular a partir dos dados de densidade ótica	61
3.6.2.1	Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular para cultivo em biorreator linhagem evoluída a partir dos dados de CO ₂	62
3.6.3	Determinação do número de gerações	64
3.6.4	Correção da DO _{600nm} do meio de cultivo usando o GBRota.....	65
3.6.5	Determinação do fator de conversão de substrato em células e em produtos.	67
3.6.6	Balanco de carbono nos cultivos.....	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	Caracterização do glicerol rotaevaporado	69
4.2	Estratégia experimental para <i>E. coli</i> – USP.....	71
4.2.1	Seleção de colônia adaptada ao GBRota.....	71
4.2.2	Caracterização em shaker linhagem selvagem e selecionada	75
4.3	Evolução adaptativa para <i>E. coli</i> – UMinho	77
4.3.1	Evolução adaptativa: transferências sucessivas na fase exponencial.....	79
4.3.2	Estratégia de evolução adaptativa: transferências na fase estacionária	89
4.3.3	Cultivo em shaker com linhagem selvagem e linhagem evoluída - <i>E. coli</i> – Uminho	94
4.3.4	Análise de morfologia das colônias	99
4.3.5	Análise de morfologia celular	101
4.4	Cultivos em batelada empregando biorreator de bancada	102
4.4.1	Cultivo 1 – Linhagem selvagem em meio com GBRota à 40 g/L	102
4.4.1.1	Balanco de carbono no cultivo em biorreator com linhagem selvagem – Cultivo 1	105
4.4.2	Cultivo 2 – Linhagem evoluída em meio com GBRota à 40 g/L	106
4.4.2.1	Balanco de carbono no cultivo em biorreator com linhagem evoluída – Cultivo 2	109
4.4.3	Comparação do crescimento, formação de biomassa e produtos das linhagens selvagem e evoluída em cultivo no biorreator.	109

4.4.4	Comparativo com outros trabalhos.....	110
5	Conclusões Finais.....	115
6	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	117
7	REFERÊNCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por combustíveis “limpos” tem sido impulsionada pela necessidade urgente de diminuir a poluição ambiental e o aquecimento global, levando à busca por fontes alternativas de energia e processos sustentáveis. Os biocombustíveis, como o biodiesel, representam uma alternativa renovável e ambientalmente segura aos combustíveis fósseis. Sua produção encontra-se em crescimento acelerado, e como consequência, uma grande quantidade de subprodutos é gerada a partir da sua produção, principalmente o glicerol bruto (RIVALDI et al., 2007).

A rentabilidade de vários processos químicos depende em parte, do aproveitamento dos subprodutos, o que permite a redução dos custos de produção e consequentemente, do preço final do produto (COSTA, 2010). Há ainda a questão ambiental. O glicerol bruto tem um alto potencial poluidor e seu processo de purificação para obtenção da glicerina pura tem um custo elevado. O descarte inadequado do resíduo pode poluir o solo, contaminar águas e até mesmo gerar um impacto ecológico ao ser lançado no ambiente (ALBUQUERQUE, 2014; RIVALDI et al., 2007). Diante disso, o reaproveitamento direto do glicerol bruto favorece a viabilidade econômica do processo de produção de biodiesel, permitindo que este se torne competitivo no crescente mercado de biocombustíveis, contribuindo ainda para os aspectos ambientais da disposição do mesmo (COSTA, 2010).

Uma das aplicações do glicerol é como substrato em processos fermentativos, já que este pode ser utilizado como fonte de carbono por muitas espécies de microrganismos, reduzindo os custos de produção e obtendo-se produtos de interesse comercial, tais como proteínas recombinantes e enzimas, medicamentos, antibióticos e intermediários de química fina (ANTUNES et al., 2011; SILVA et al., 2009).

Por ser um subproduto, o glicerol bruto apresenta impurezas que podem interferir no processo fermentativo como sais, ésteres, álcool e sabão, as quais podem causar inibição do crescimento do microrganismo (OOI et al., 2004).

Técnicas que visam adaptar os microrganismos via evolução adaptativa a ambientes contendo contaminantes vêm sendo largamente empregadas para contornar problemas de inibição. As estratégias de adaptação permitem impor uma certa pressão seletiva sobre a população, favorecendo o aparecimento de mutantes e a seleção de mutações benéficas, que tornam a célula mais apta a se desenvolver em um ambiente hostil. A evolução adaptativa é usada em complemento com a engenharia metabólica racional para acelerar o

desenvolvimento de cepas, superando algumas limitações encontradas no ambiente ao qual estão expostas (DRAGOSITS e MATTANOVICH, 2013).

Dentre os microrganismos mais empregados nas estratégias evolutivas destacam-se a *Escherichia coli* e a *Saccharomyces cerevisiae*, por serem tradicionalmente bem caracterizadas (PORTNOY, BEZDAN e ZENGLER, 2011). Nos últimos 5 anos, cultivos de *E. coli* recombinante em glicerol como fonte de carbono têm sido intensamente estudados pelos pesquisadores do Laboratório de Fábricas Celulares (LaFaC) situado no Departamento de Engenharia Química da UFSCar (DEQ-UFSCar). Essa bactéria é utilizada como hospedeiro para a obtenção de um terço das proteínas recombinantes com aplicação terapêuticas e metade dos produtos aprovados por agências reguladoras internacionais (MAMAT et al, 2015). Os estudos realizados no âmbito do LaFaC até o momento contribuíram para avanços significativos no desenvolvimento de meio de cultivo complexo BPF (Boas Práticas de Fabricação) (SANTOS, 2012), no estabelecimento de estratégias de cultivo de alta produtividade em biomassa (SARGO, 2011; HORTA et al., 2012) e na avaliação de diferentes tipos de biorreatores e de estratégias não convencionais de intensificação da transferência de oxigênio (CAMPANI, 2014). No entanto, a exploração da versatilidade da *E. coli* no aproveitamento de resíduos agroindustriais ainda não havia sido incorporada. Neste caso, devido à presença dos contaminantes, a produção de proteínas com finalidade terapêutica a partir de linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas não seria viável por questões regulatórias. Por outro lado, os progressos alcançados na Engenharia Metabólica e na Biologia de Sistemas permitem que *E. coli* (e outros organismos) seja explorada como plataforma para a produção de biocombustíveis avançados, como por exemplo o n-butanol e o isobutanol, que apresentam propriedades semelhantes aos combustíveis derivados do petróleo (YAHYA et al., 2012). Ou ainda, para a produção de uma infinidade de enzimas com aplicação industrial, inclusive para a produção de etanol 2G. Assim, seria possível fazer uma integração completa entre a produção de biocombustíveis de 1ª geração, como o biodiesel, e os biocombustíveis avançados, de alto valor agregado, concomitantemente com o aproveitamento de um resíduo de alto impacto ambiental.

Assim, o presente trabalho se insere no conjunto de atividades desenvolvidas no LaFaC, contribuindo para a implementação da metodologia de evolução adaptativa, enquanto no campo dos cultivos de *E. coli*, aborda o uso desta bactéria para o aproveitamento do resíduo da produção de biodiesel por rota etílica, ainda não relatado na literatura.

1.1 Objetivos

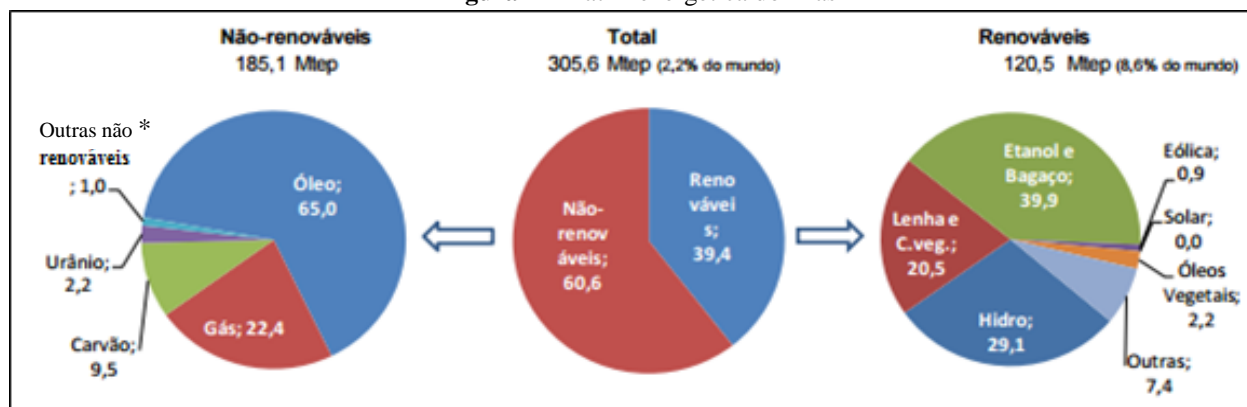
Este trabalho tem como objetivos obter uma linhagem evoluída de *E. coli* usando as estratégias da Engenharia Evolutiva adaptada para crescimento no glicerol bruto proveniente da síntese do biodiesel e caracterizar a linhagem obtida em termos fisiológicos (assimilação de glicerol, crescimento e formação de metabólitos).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

Atualmente, as principais fontes de energia empregadas são provenientes de recursos não renováveis, correspondendo a cerca de 60,6 % da matriz energética brasileira, como mostra a Figura 1. Além de serem esgotáveis, a combustão dessas fontes tem um significativo impacto negativo no meio ambiente, afetando-o de forma bastante agressiva. (APOLINÁRIO, PEREIRA e FERREIRA, 2012; LIMA et al., 2007).

Figura 1 - Matriz energética do Brasil



* Gás industrial de alto forno, aciaria, coqueria, enxofre e de refinaria
Fonte: MME (2015) – Adaptada

Sabe-se que o aumento na concentração dos gases causadores do efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO_2) e o metano (CH_4), liberados na queima dos combustíveis, têm acarretado sérias mudanças climáticas no planeta. Efeitos como o aumento da temperatura média global, as alterações no perfil das precipitações pluviométricas e a elevação do nível dos oceanos poderão ser catastróficos frente à contínua tendência de aumento da população mundial (APOLINÁRIO, PEREIRA e FERREIRA, 2012).

Diante disso, cada vez mais, as fontes renováveis de energia, assumem importante papel no mundo contemporâneo devido à possibilidade de escassez de reservas de petróleo, aos preços flutuantes dos combustíveis fósseis e à poluição ambiental gerada pelo emprego destes (ANTUNES et al., 2011).

Os óleos vegetais começaram a ser estudados no final do século XIX por R. Diesel como matéria prima alternativa para obtenção de combustíveis renováveis (LIMA et al., 2007).

O biodiesel é um dos biocombustíveis mais importantes atualmente, sendo produzido principalmente pela transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com álcoois de cadeia curta, como o metanol ou o etanol, na presença de catalisador básico, ácido ou enzimático (MOTA e PESTANA, 2011).

O uso de biodiesel vem crescendo aceleradamente no mundo inteiro, pois a cadeia de produção deste combustível tem impacto positivo em vários setores, tais como social, ambiental e tecnológico (LIMA et al., 2007).

O biodiesel favorece a geração de emprego no campo, valorizando a mão de obra rural, bem como no setor industrial, valorizando a mão de obra especializada na produção do combustível, além de incentivar a agricultura familiar e melhorar a geração e a distribuição da renda. Quanto ao aspecto ambiental, a contribuição é grande, visto que promove uma redução significativa e quantitativa de níveis de poluição ambiental por ter origem vegetal. Sendo assim, as emissões de CO₂ produzidas na queima do biodiesel contribuem para o ciclo de carbono na natureza, já que as plantas que o produziram consomem CO₂ no processo de fotossíntese. O uso desse biocombustível reduz as emissões de enxofre em 20%; de anidrido carbônico em 9,8%; de hidrocarbonetos não-queimados em 35%; de material não-particulado em 55%; dos gases causadores do efeito estufa em 78 a 100%; de compostos sulfurados e aromáticos em 100% (LIMA et al., 2007; MOTA e PESTANA, 2011; BIODIESELBR, 2005).

Segundo Apolinário, Ferreira e Pereira (2012), o Brasil apresenta condições naturais favoráveis para se tornar um importante produtor internacional de biodiesel, em função de possuir grandes áreas disponíveis para a agricultura, com condições de solo e clima adequados ao plantio de oleaginosas, utilizadas em sua produção. Gonçalves e colaboradores (2009) complementam afirmando que além da grande diversidade em grãos de onde é extraído o óleo vegetal, o Brasil tem uma extensa criação de animais bovinos que fornecem gordura animal ou sebo, matérias primas utilizadas para a produção do biodiesel. A Tabela 1 ilustra a evolução da utilização de matérias-primas para produção de biodiesel.

Diante desse grande potencial de produção, ao final do século XX, o Governo Federal intensificou as discussões sobre a produção e uso do biodiesel, sendo efetuados vários estudos por comissões interministeriais em parceria com universidades e centros de pesquisa.

Muitas estratégias foram traçadas pelo governo brasileiro, destacando-se a criação do Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel (PROBIODIESEL), que visa à gradual substituição do diesel proveniente do petróleo pelo biodiesel (GONÇALVES et al., 2009).

Tabela 1 - Evolução da utilização de diferentes matérias-primas para produção de biodiesel

Matérias-primas	Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel (B100 – biodiesel 100% puro) (m ³)									
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Óleo de soja	226	65.764	353.233	967.326	1.250.590	1.980.346	2.171.113	2.105.334	2.231.464	2.625.558
Óleo de algodão	-	-	1.904	24.109	70.616	57.054	98.230	116.736	64.359	76.792
Gordura animal ¹	-	816	34.445	154.548	255.766	302.459	358.686	458.022	578.427	675.861
Outros materiais graxos ²	510	2.431	18.423	31.655	37.863	47.781	44.742	39.805	46.756	37.255

¹ Inclui gordura de porco, gordura de frango e gordura bovina.

² Inclui óleo de palma, óleo de amendoim, óleo de nabo forrageiro, óleo de girassol, óleo de mamona, óleo de sésamo, óleo de fritura usado e outros materiais graxos.

Fonte: ANP (2014)

A produção de biodiesel foi significativamente acelerada, uma vez que o governo brasileiro estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao combustível derivado do petróleo mediante a lei 11097/2005 (RIVALDI et al., 2007). De acordo com a lei 13.033/2014, a mistura obrigatória de biodiesel ao diesel vendido ao consumidor final foi elevada de 5% para 6%, a partir de julho de 2014 e em novembro, o percentual aumentou para 7% (PLANALTO, 2014).

Este cenário culminou em um notável crescimento da produção do biodiesel e, por consequência, numa elevada quantidade de glicerol bruto formado, contudo sem uma destinação definida para esse resíduo (ALBUQUERQUE, 2014).

O glicerol bruto é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido correspondem ao resíduo. Com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação de glicerol bruto e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessária a busca por alternativas para o uso do resíduo gerado no processo (RIVALDI et al., 2007). A Tabela 2 ilustra a produção de biodiesel e glicerol bruto no Brasil.

Tabela 2 - Produção de biodiesel e glicerol bruto no Brasil

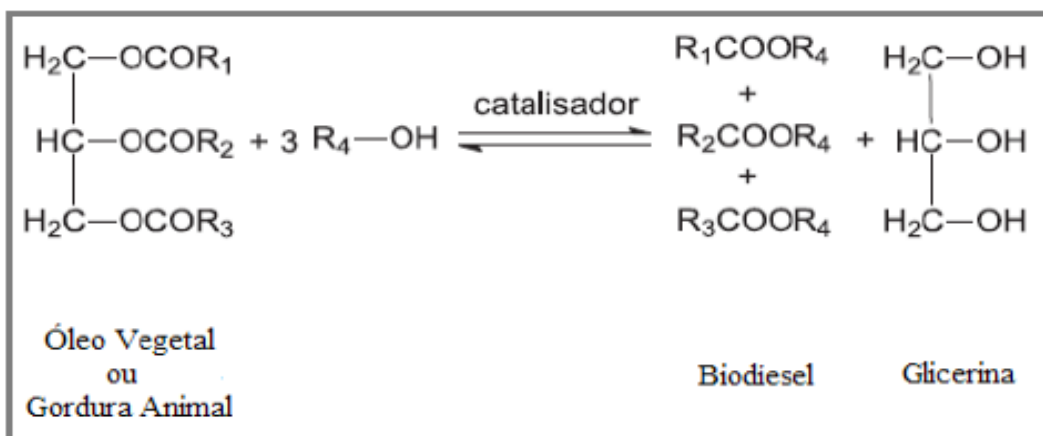
	Produção de biodiesel (B100) e Glicerol - (m ³)									
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Biodiesel	736	69.002	404.329	1.167.128	1.608.448	2.386.399	2.672.760	2.717.483	2.917.488	3.419.838
Glicerol bruto	69	9.460	36.740	124.415	171.829	256.884	273.353	274.683	290.260	311.827

Fonte: ANP (2014)

2.2 Glicerol

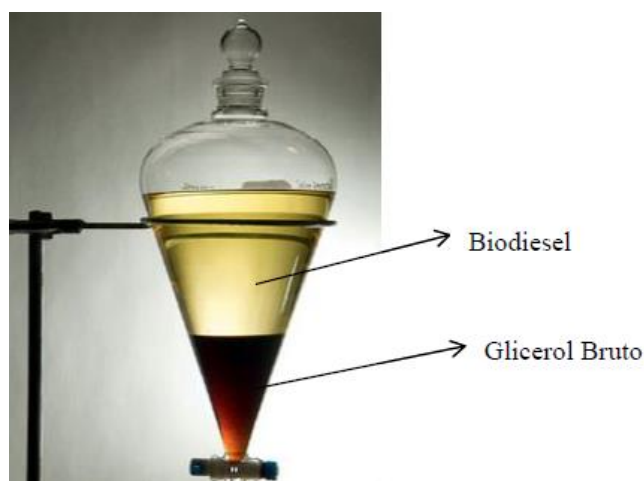
O glicerol bruto ou não refinado constitui o principal subproduto gerado no processo de produção do biodiesel via esterificação de ácidos graxos vegetais ou gordura animal com álcool (metanol ou etanol). A equação global de transesterificação é apresentada na Figura 2, onde são necessários três moles de álcool por cada mol de triglicerídeo utilizado. No final da etapa de transesterificação, glicerol e ésteres formam uma massa líquida de duas fases, que são facilmente separáveis por decantação ou centrifugação (Figura 3). A fase superior, a mais leve ou menos densa, contém os ésteres metílicos ou etílicos constituintes do biodiesel. A fase inferior ou pesada é composta por glicerol bruto, água e impurezas (LIMA et al., 2007; RIVALDI et al., 2007).

Figura 2 - Reação global de transesterificação de triglicerídeos



Fonte: Antunes et al. (2011)

Figura 3 - Produtos da reação de transesterificação em decantação



Fonte: Vasconcelos (2012)

O glicerol, na forma pura, apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e em clorofórmio e possui inúmeras aplicações industriais (indústria de cosméticos, farmacêutica, detergentes, na fabricação de resinas e aditivos e na indústria de alimentos). Entretanto, a obtenção do glicerol puro requer o uso de operações como destilação fracionada, troca iônica para a remoção principalmente de ions K^+ e Na^+ utilizados como catalisadores, adsorção, precipitação, filtração, extração, cristalização, diálise, o que resulta em custos elevados e inviabiliza sua purificação, principalmente por pequenos e médios produtores (ROCHA, 2009; RIVALDI et al., 2007; YONG et al. 2001).

Por isso, efluentes contendo glicerol acabam sendo descartados no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando conseqüentemente os problemas e riscos ambientais (RIVALDI et al., 2007). O estudo de novas aplicações para esse resíduo faz-se cada vez mais necessário, já que, devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio, o glicerol não pode ser depositado em aterros, e as indústrias que utilizam o glicerol como matéria prima não têm capacidade de absorver esse excesso de glicerina produzida (ANTUNES et al., 2011). Segundo Rivaldi e colaboradores (2007), o reaproveitamento direto, sem tratamento, proporcionará a viabilização do processo de produção de biodiesel, permitindo que este se torne competitivo no crescente mercado de biocombustíveis.

2.2.1 Glicerol bruto em processos fermentativos

O glicerol bruto apresenta-se na forma de um líquido viscoso pardo escuro, contendo impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, sem valor comercial (OOI et al., 2004), sendo a maior parte das impurezas sabão formado pela reação de saponificação dos ácidos graxos livres com excesso de catalisador (RIVALDI et al., 2007). Ainda segundo Bohon *et al* (2011), a quantidade dessas impurezas, genericamente denominadas como matéria orgânica não glicerol (MONG), depende da matéria prima e do processo produtivo. Contendo principalmente sabão e compostos polimerizados do glicerol (diglicerol e triglicerol), a MONG representa a diferença obtida ao subtrair de 100 a soma do teor de glicerol, água e cinzas expressos em porcentagem (COCKS, DEVIN, GIBBS, 1970; MATTOS, 2013).

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal), como mostra a Tabela 3, e do tipo de catalisador empregado na produção de biodiesel (RIVALDI et al., 2007).

Tabela 3 - Composição do glicerol bruto obtido durante a produção de biodiesel metílico em função de diferentes matérias primas

Composição					Composição			Matriz Vegetal	Ref.
mg/L					%m/m				
Ca	K	Mg	P	S	Na	N	C		
7,29	0,30	3,29	0,01	ALD	2,59	0,14	-	Algodão / Soja	Viana (2011)
16,00	12,00	12,00	45,10	-	1,08	<0,05	-	DNF	Lobato <i>et al.</i> (2010)
7,00	7,50	4,00	0,04	-	0,79	0,13 ^c	-	DNF	Oswald (2009)
ALD	31250,00	-	ALD	-	0,02 ^c	-	-	Soja	Pyle (2008)
140,00	27300,00	-	480,00	-	0,02 ^c	-	-	Sebo de frango	
ALD	ALD	-	ALD	-	1,00 ^c	-	-	canola	
11,70	ALD	3,90	25,30	21,00	1,20	0,04	24,0	Mostarda "Idagold"	Thompson & He (2006)
23,00	ALD	6,60	48,00	16,00	1,20	0,04	24,3	Mostarda "PacGold"	
24,00	ALD	4,00	65,00	21,00	1,10	0,05	25,3	Colza	
19,70	ALD	5,40	58,70	14,00	1,10	0,05	26,3	Canola	
11,00	ALD	6,80	53,00	ALD	1,20	0,04	26	Soja	
163,00	216,70	126,70	136,70	128,00	1,10	0,06	24	Crambe	

ALD: abaixo do limite de detecção; DNF: dados não fornecidos pelos autores; c: valores obtidos considerando a densidade do glicerol residual igual a 1,26 kg/L.

Fonte: Viana (2011) - Adaptada

Uma das aplicações do glicerol bruto é como substrato em processos fermentativos, uma vez que o glicerol presente no resíduo pode ser utilizado como fonte de carbono por muitas espécies de microrganismos, e os compostos contendo fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio podem ser assimilados. O aproveitamento do glicerol bruto na formulação de meios de cultivo permite reduzir os custos de produção de processos biotecnológicos e obter produtos de maior valor agregado como biomassa e biomoléculas, constituindo uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (ITO *et al.*, 2005; ANTUNES *et al.*, 2011; THOMPSON e HE, 2006).

Os trabalhos descritos a seguir mostram a aplicação direta do glicerol bruto em processos fermentativos.

Mu e colaboradores (2006) demonstraram que o glicerol bruto pode ser usado diretamente para a produção de 1,3-propanodiol em culturas de *Klebsiella pneumoniae*. As diferenças entre as concentrações finais de 1,3-propanodiol foram pequenas utilizando-se o glicerol bruto obtido a partir da metanólise de óleo de soja por catálise alcalina (51,3 g/L) ou por catálise enzimática mediada por lipase (53 g/L). Isto sugere que a composição de glicerol

bruto teve pouco efeito sobre a conversão biológica e um baixo custo de fermentação pode ser esperado (YANG, HANNA, SUN, 2012).

Chatzifragkou et al. (2010) estudaram os efeitos de diferentes impurezas em glicerol bruto para a produção de 1,3-propanodiol por *C. butyricum*. Os autores constataram que a presença de resíduos de metanol não afetou a conversão microbiana. Já a presença de NaCl influenciou o processo contínuo, mas não o descontínuo. Durante experimentos preliminares com diferentes sais em cultivos anaeróbios conduzidos em frascos agitados, NaCl (4,5% m/m, de glicerol) foi encontrado como o principal agente inibidor. Geralmente as bactérias são conhecidas por serem inibidas quando cultivadas em meio contendo altas concentrações de sais, principalmente devido à pressão osmótica e o seu efeito sobre as membranas das células. No entanto, quando experimentos nas mesmas condições foram realizados em biorreatores, não foram observados efeitos inibitórios significativos, mesmo quando concentrações relativamente elevadas de NaCl foram adicionados no meio de fermentação (30% m/m, de glicerol). Diante disso pode-se dizer que a preservação de condições ótimas de cultura no biorreator (agitação, controle de pH e fornecimento constante de gás para remoção do CO₂) permitiu o crescimento microbiano adequado.

Pajuelo et al. (2005), comparando uma espécie selvagem de *Clostridium butyricum* VPI 3266 com outra geneticamente modificada *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5) (contendo genes para produção de 1,3-propanodiol) observaram que no tempo de 47 h de fermentação em batelada alimentada, a cepa modificada alcançou resultado semelhante em rendimento e superior em produtividade (0,65 mol/mol de glicerol e 1,7 g/L.h, respectivamente) que a cepa selvagem (0,69 mol/mol e 1,21 g/L.h, respectivamente). Em fermentação contínua de glicerol bruto e comercial (pureza de 80-90%), em uma taxa de diluição (D) de 0,05 h⁻¹ (pH 6,5; 35°C) com a mesma cepa modificada, foram obtidos valores de rendimento e produtividade similares aos observados em batelada alimentada (0,61-0,64 mol/mol glicerol, 1,49-1,56 g/L.h).

O glicerol bruto foi testado em outros trabalhos, tais como de Mainka (2013), usando *B. megaterium*; Paula (2012), usando várias linhagens bacterianas; e Phithakrotchanakoon e colaboradores (2015), usando *E. coli* recombinante para a produção de polihidroxicanoatos (PHAs). Esses compostos são poliésteres biodegradáveis, sintetizados como grânulos intracelulares em células bacterianas, e podem ser utilizados na elaboração de produtos de higiene e embalagens, além de aplicações no setor médico e farmacêutico, particularmente na produção de cápsulas de medicamentos e drogas agrícolas, ou ainda na obtenção de próteses e enxertos de tecidos humanos e na medicina veterinária. Em todos eles a

substituição do glicerol puro pelo glicerol bruto proveniente da síntese do biodiesel foi satisfatória, alcançando maiores produções de PHAs. O uso do GB viabiliza a produção dos PHAs, já que segundo Posada et. al. (2011), o custo do substrato representa cerca de 45% do custo do cultivo e a utilização do glicerol bruto como matéria prima reduz esse custo para 8%.

2.3 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria mesófila, com habilidade de crescer em temperaturas que variam de 8 à 48°C, sendo sua temperatura ótima 37°C. Apresenta-se como um bastonete curto, gram-negativo, não esporulado. Seu metabolismo é anaeróbio facultativo, pois possui metabolismo respiratório e fermentativo. Ela cresce bem em ambientes com pH em torno de 6 e 8. Sendo um habitante natural do trato intestinal dos humanos e da maioria dos animais de sangue quente, ela faz parte do grupo coliformes fecais (coliformes a 45°C) (SARGO, 2011; CORRÊA, 2012).

O mais antigo isolamento de bactérias agora identificadas como *Escherichia coli* foi feito em 1885 por Theodor Escherich, pediatra e bacteriologista que estava interessado em colonização do intestino humano e analisou o aparecimento de bactérias nas fezes de crianças amamentadas. Ele nomeou a espécie como *Bactéria coli*. No início do século 20, microbiologistas iniciaram esforços sistemáticos para classificar todas as espécies conhecidas bacterianas baseados em características morfológicas e bioquímicas, classificando as espécies como *Bacillus coli* e *Escherichia coli*. *Escherichia coli* é agora o nome padrão, mas todos os três nomes são conservados como identificadores desta espécie. A cepa foi depositada na Coleção Nacional de Culturas Tipo Reino Unido como NCTC estirpe 86 em 1920 (o ano da sua fundação) pelo Instituto Lister, em Londres (DAEGELEN et al., 2009).

A linhagem do tipo selvagem de *E. coli* K-12 foi isolada a partir das fezes de um paciente convalescente de difteria em Palo Alto, Califórnia, por Blair em 1922. Em 1925, a cultura foi depositada na coleção de estirpes do Departamento de Bacteriologia da Universidade de Stanford, onde foi dada a designação K-12. No início dos anos 1940, o pesquisador Tatum, então na Universidade de Stanford iniciou os trabalhos com essa linhagem. Desde então, a estirpe vem sendo intensivamente utilizada em muitos laboratórios (BACHMANN, 1987; KUHNERT, NICOLET e FREY, 1995). A linhagem MG1655 é uma selvagem com manipulação genética mínima, tendo apenas sido curada do bacteriófago temperado lambda e F plasmídeo por luz ultravioleta e laranja acridina (BLATTNER et al.; 1997).

Ancestrais de *Escherichia coli* B, outra linhagem de *E. coli* bastante estudada, estão aparentemente associados a uma cepa do Instituto Pasteur em Paris usada por d'Herelle em seus estudos de bacteriófagos, em 1918. Esta estirpe passou por vários laboratórios e, em 1942, Delbrück e Luria publicaram o primeiro artigo chamando esta estirpe de *E. coli* B. A partir de trabalhos desenvolvidos por Delbrück, Luria e Hershey na década de 1940 levou-se à utilização generalizada da *E. coli* B junto com *E. coli* K-12, escolhida aproximadamente na mesma época para estudos bioquímicos e genéticos por Tatum e Lederberg.

Os meios de cultivo usados para crescimento da *E. coli* precisam ser balanceados, pois o excesso de nutrientes pode causar inibição, afetando tanto o crescimento do microrganismo como a obtenção de produtos. Riesenber e colaboradores (1991) relatam que elevadas concentrações dos seguintes componentes podem inibir o crescimento da *E. coli*: fósforo (10 g/L); magnésio (8,7 g/L); molibdênio (0,8 g/L); boro (44 mg/L); cobre (4,2 mg/L); manganês (68 mg/L); cobalto (0,5 mg/L); zinco (38 mg/L) e ferro (1,15 g/L).

Com a sua fisiologia, morfologia e genética molecular bem conhecida a *E. coli* é amplamente empregada em diferentes estratégias de cultivo, principalmente os de alta densidade celular. Vários produtos recombinantes são produzidos em *E. coli*, como enzimas industriais (renina, amilases, proteases e celulasas), e ainda proteínas terapêuticas (insulina, hormônios de crescimento) (EITEMAN e ALTMAN, 2006; LIMA, 2004; SARGO, 2011).

2.3.1 Metabolismo do glicerol em cultivo com *E. coli*

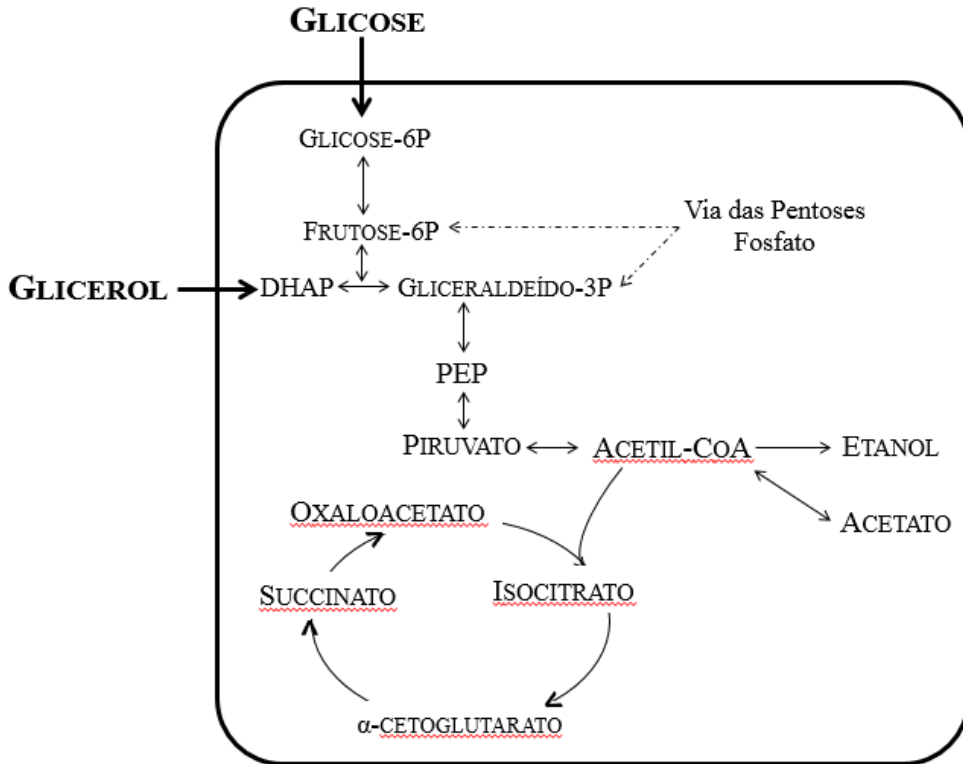
Em células procarióticas, o glicerol é um dos substratos que atravessa a membrana celular por difusão facilitada, sendo a passagem pela membrana a primeira etapa de sua assimilação por parte dos microrganismos (RIVALDI, 2008), podendo envolver transporte passivo (GANCEDO, GANCEDO e SOLS, 1968) e ativo (LAGES, SILVA-GRAÇA, LUCAS, 1999) através da membrana plasmática.

Em bactérias como *Escherichia coli*, a proteína do tipo poro-canal-G1pF atua por sensibilidade mecânica sem gasto energético na presença de glicerol. Este facilitador permite a assimilação, além de glicerol, de pequenas moléculas de polihidroxi álcoois, uréia e glicina, mas exclui moléculas carregadas como gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (HOLST et al., 2000 *apud* RIVALDI et. al., 2007).

Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática pelos mecanismos descritos, o glicerol pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas independentes, representadas na Figura 4, sendo inicialmente oxidado pela via glicolítica, gerando, piruvato,

energia e metabólitos intermediários que são utilizados em outras vias (LEHNINGER, NELSON e COX, 2006).

Figura 4 - Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos e seus possíveis produtos



Fonte: Martínez-Gómez (2012) – Adaptado.

O acetato é o principal subproduto tóxico formado em cultivos de *E. coli*. Sendo produzido em condições aeróbias, durante fases rápidas de crescimento em excesso de substrato, esse fenômeno é conhecido como “metabolismo overflow” e é de extrema importância para a indústria biotecnológica. Neste caso o acetato é produzido quando o fluxo de carbono pela via metabólica do carbono central excede a demanda biossintética e a capacidade de geração de energia da célula, saturando o ciclo do ácido tricarboxílico e/ou a cadeia de transporte de elétrons. A sua formação também depende do meio usado e da velocidade específica de crescimento. Por exemplo em meios complexos e definidos usando glicose como substrato, a formação de acetato ocorre quando velocidade específica de crescimento é superior a 0,2 ou 0,35 h⁻¹ respectivamente. Em algumas linhagens de *E. coli* o acetato foi produzido em meio definido para velocidade específica de crescimento superior a 0,14 h⁻¹ (LEE, 1996, LIMA, 2004).

Nos trabalhos de Contiero e colaboradores (2000) e De Mey e colaboradores (2007) é relatado que concentrações superiores a 1 g/L de acetato em cultivos com *E. coli*

podem ser inibitórias ao crescimento no microrganismo. De Mey e colaboradores (2007) ainda afirmam que a quantidade de ácido acético produzido depende da linhagem de *E. coli* e das condições do meio. Culturas a partir da *E. coli* K12 tendem a produzir mais acetato quando comparada com as da *E. coli* B, especialmente a BL 21, a qual sofreu modificações genéticas para ser utilizada principalmente em cultivos de alta densidade (PHUE J-N., SHILOACH, 2004; SHILOACH et. al., 1996, LEONE et al., 2015).

Apesar da grande quantidade de estudos com a *E. coli* K12 MG1655 disponível na literatura, há pouca informação sobre a assimilação de glicerol em condições aeróbias. No estudo conduzido por Beg e colaboradores (2007) em biorreator, utilizando meio definido M9 e diferentes substratos, a velocidade específica de crescimento em glicerol foi de aproximadamente $0,42 \text{ h}^{-1}$, enquanto em glicose alcançou cerca de $0,74 \text{ h}^{-1}$. Em relação à formação de acetato, a mesma foi observada para vários substratos estudados (glicose, lactato, lactose, galactose e maltose), mas não para o glicerol.

2.4 Evolução adaptativa

Técnicas que visam adaptar os microrganismos via evolução adaptativa a ambientes contendo contaminantes vêm sendo largamente empregadas para contornar problemas de inibição. As estratégias de adaptação permitem impor uma certa pressão seletiva sobre a população, favorecendo o aparecimento de mutantes e a seleção de mutações benéficas, que tornam a célula mais apta a se desenvolver em um ambiente hostil. A evolução adaptativa é usada em complemento com a Engenharia Metabólica racional para acelerar o desenvolvimento de cepas, superando algumas limitações encontradas no ambiente ao qual estão expostas (DRAGOSITS e MATTANOVICH, 2013).

Estudos envolvendo evolução adaptativa surgiram há uma década, como um valioso método da Engenharia Metabólica para o desenvolvimento e a otimização de cepas, tornando-a uma ferramenta amplamente usada em aplicações biotecnológicas, melhorando o rendimento dos processos e reduzindo custos industriais (CHATTERJEE e YUAN, 2006; MAAHEIMO, et al., 2001; PORTNOY, BEZDAN e ZENGLER, 2011).

Na metodologia de adaptação evolutiva laboratorial (AEL), um microrganismo é cultivado sob condições bem definidas por períodos prolongados de tempo, no intervalo de semanas a anos, o que permite a seleção dos fenótipos melhorados. As células microbianas oferecem vantagens importantes para os estudos de AEL, pois apresentam necessidades nutricionais simples, podem ser facilmente cultivadas em laboratório e geralmente crescem

muito rápido, podendo ser cultivadas por várias centenas de gerações dentro de algumas semanas ou meses, com velocidades específicas de crescimento de 0,05 a 1,0 h⁻¹ (DRAGOSITS e MATTANOVICH, 2013).

Em combinação com a Engenharia Metabólica, a adaptação evolutiva permite aliar a variação genética com a seleção de mutações benéficas de forma imparcial. Essas mutações acontecem de maneira aleatória em diversos genes e regiões reguladoras. A maioria das aplicações da Evolução Adaptativa tem sido descrita para microrganismos como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *E. coli*, bastante conhecidos, estudados e aplicados industrialmente. Entretanto, aplicações com outros organismos estão em ascensão (PORTNOY, BEZDAN e ZENGLER, 2011).

Geralmente, os experimentos de AEL são fáceis de estabelecer, como o cultivo em frascos agitados, que pode ser empregado para cultivar células microbianas em culturas sequenciais. Em intervalos regulares (normalmente diários), uma alíquota da cultura é transferida para um novo frasco contendo meio fresco. Esta estratégia tem a vantagem de apresentar um baixo custo e permitir a realização de vários experimentos ao mesmo tempo. Ao substituir frascos por placas de poços com volumes de cultura ainda menores, centenas de culturas microbianas podem ser cultivadas em paralelo. Vários fatores ambientais podem ser facilmente controlados, incluindo a temperatura e homogeneidade da cultura (por meio de agitação constante). No entanto, cultivos em frascos agitados ou em placas possuem algumas deficiências, incluindo a densidade populacional variável, oscilação na velocidade de crescimento, dificuldade de fornecimento de nutrientes e variações das condições ambientais, tais como pH e concentração de oxigênio dissolvido. Em muitos casos, esses fatores podem não ser de grande importância para o sucesso da metodologia, mas a simplicidade da configuração pode impedir a implementação de ambientes complexos para experimentos de seleção microbiana. Uma alternativa é o cultivo contínuo em biorreatores. As vantagens do cultivo são densidades populacionais e velocidades de crescimento constantes. Além disso, é possível controlar rigorosamente o fornecimento de nutrientes e condições ambientais tais como o pH e a oxigenação. As principais desvantagens são o custo de operação, a maior complexidade experimental e a ocorrência de instabilidade na população, com risco de *wash-out* (GONZALEZ, BELL, 2013; WRIGHT et al, 2011; WEIKERT, SAUER, BAILEY, 1997; DRAGOSITS e MATTANOVICH, 2013).

Um importante fator durante a busca por novos fenótipos via AEL é ao número de gerações. No trabalho apresentado por Dragosits e Mattanovich (2013) são relatados diversos experimentos nos quais são necessárias entre 100 e 2000 gerações, o que pode levar

de algumas semanas a meses. Além de ser necessário um número mínimo de gerações para acumular fenótipos melhorados, o aumento da aptidão é um fator importante para a implementação do AEL. Em cultivos de *E. coli* e *S. cerevisiae* esse tempo corresponde aproximadamente a 2 meses, acumulando cerca de 100 a 500 gerações, levando a um aumento da aptidão em torno de 50-100%.

2.4.1 Estratégias de evolução adaptativa

Alguns estudos de AEL descritos a seguir têm sido aplicados visando adaptar tanto bactérias como leveduras em ambientes desfavoráveis, seja por excesso de substrato ou presença de impurezas, ou ainda para a redução da dependência em relação a algum nutriente ou melhoria na aptidão celular para a produção de novos compostos.

A ativação de vias latentes para produção de produtos não constitutivos permite a obtenção de novos compostos que, de maneira natural, não seriam produzidos pelo microrganismo (PORTNOY, BEZDAN e ZENGLER, 2011). No trabalho desenvolvido por Hu e Wood (2010), uma cepa de *E. coli* BW25113 sem atividade em fumarato redutase foi adaptativamente evoluída para uso na produção de etanol e hidrogênio a partir do glicerol, durante 78 passagens, sendo o volume de inóculo para cada passagem ajustado devido a alterações na taxa de crescimento da estirpe evoluída, para assegurar que as culturas se mantivessem na fase de crescimento exponencial. A cepa melhorada apresentou velocidade de crescimento 5 vezes maior, produtividade em hidrogênio aumentada em 20 vezes e em etanol em 5 vezes comparada à cepa original. Nesse trabalho foram combinadas técnicas de evolução adaptativa com mutagênese química e o microrganismo foi submetido a cultivos em bateladas sucessivas ou contínuo por muitas gerações para identificar variantes genéticas mais aptas, e assim selecionar cepas melhoradas de *E. coli* com as características desejadas.

Fong e colaboradores (2005) afirmam que a perda de condicionamento celular acarreta uma redução na produção do metabólito de interesse. As técnicas de adaptação evolutiva para otimização de fenótipo podem não só amenizar esse efeito como também conduzir a melhorias na aptidão fisiológica das linhagens modificadas, melhorando principalmente a velocidade de crescimento e reduzindo a formação de subprodutos. Linhagens de *E. coli* modificadas geneticamente para produção de ácido lático foram cultivadas em meio mínimo suplementado com glicose 2 g/L durante 60 dias e impedidas de entrar na fase estacionária, transferindo-as durante a fase logarítmica para o meio fresco. Como resultado, as linhagens evoluídas mostraram uma velocidade de crescimento variando entre 30 a 120%

maior. Neste caso, a adaptação não somente resultou em aumento do rendimento do produto, mas também eliminou quase que completamente a formação de subprodutos para a linhagem evoluída (FONG et. al., 2005).

Alguns microrganismos também podem ser submetidos a ambientes mais hostis, onde a concentração de fontes de carbono, matérias primas, produtos ou impurezas são elevadas, o que pode levar à perda de rendimento devido à possível toxicidade de alguns compostos e ao comprometimento do condicionamento da cepa. Uma maneira de forçar o microrganismo a se adaptar a esse tipo de condição consiste em transferências sequenciais da cultura para novos meios contendo concentração crescente dos compostos que causam a pressão evolutiva (contaminantes) até o máximo tolerado pelo organismo. Essa técnica foi empregada para a adaptação de *E. coli* visando à superprodução de alguns álcoois (PORTNOY, BEZDAN e ZENGLER, 2011) como etanol (WANG et al., 2010), isobutanol (ATSUMI et al., 2010) bem como altas concentrações de ácidos orgânicos (KWON et al., 2011).

No trabalho desenvolvido por Kwon e colaboradores (2011), uma cepa de *E. coli* W3110 foi submetida à evolução adaptativa com objetivo de torná-la mais tolerante a altas concentrações de ácido succínico. A estratégia de adaptação foi implementada ao longo de 9 meses, obtendo-se uma cepa capaz de crescer rapidamente na presença de cerca de 37 mM de succinato no meio. A cepa exibiu uma velocidade de crescimento 13 vezes maior que a da cepa não evoluída, crescendo em altas concentrações de succinato. A metodologia empregada no cultivo contínuo com vazão de alimentação de 0,167 mL/min (taxa de diluição de 0,1 h⁻¹) consistiu na mudança do meio a cada 100 horas, para um meio fresco com as mesmas concentrações e pH do inicial, exceto pela concentração de succinato, que foi aumentada gradualmente de 11 mM até 37 mM. Neste mesmo experimento, observou-se que a cepa evoluída foi capaz de tolerar maiores concentrações de NaCl presentes no meio, em torno de 25% a mais que a selvagem. Entretanto, a cepa evoluída não se mostrou tão tolerante ao aumento nas concentrações de KCl, exibindo uma velocidade de crescimento 18% menor que a selvagem.

Atsumi e colaboradores (2010) também aplicaram a abordagem da evolução adaptativa para desenvolver uma linhagem de *E. coli* tolerante a isobutanol. Nesse trabalho, uma linhagem selvagem passou por 45 transferências sequenciais, em tubos de ensaio com rosca, sempre aumentando-se a cada 15 transferências a concentração de isobutanol, de 4, 6, até 8 g/L. As transferências foram realizadas na fase estacionária. O resultado foi uma cepa evoluída com um aumento na tolerância ao isobutanol de 100%.

Wang e colaboradores (2010) aplicaram a metodologia de evolução adaptativa a uma cepa de *E. coli* geneticamente modificada para aumentar sua tolerância a altas concentrações de etanol. A cepa foi evoluída por aproximadamente 350 gerações, aumentando-se gradualmente a concentração de etanol, partindo de 15 g/L até 40 g/L. As transferências sucessivas eram realizadas na mesma concentração durante uma semana e, no 8º dia, o meio fresco utilizado era preparado com uma nova concentração de etanol. A mutante evoluída, *E. coli* SZ470, foi capaz de crescer em condições anaeróbias a 40 g/L de etanol, uma melhoria significativa em relação à cepa original, KC01. Quando comparada com uma fermentação da KC01, em pequena escala (500 mL) de xilose (50 g/L), a SZ470 alcançou 67% mais de massa celular e foi 48% superior em produtividade volumétrica de etanol, reduzindo o tempo de fermentação em 50% e levando a um aumento de rendimento de 94%. Estes resultados demonstram que uma cepa de *E. coli* desenvolvida por meio da combinação de técnicas de biologia molecular e microbiologia tradicionais é capaz de apresentar resultados satisfatórios, melhorando o rendimento do processo fermentativo.

Lee e Palsson (2010) evoluíram uma cepa de *Escherichia coli* K-12 MG1655 em l-1,2-propanodiol (1,2-PDO l) como fonte de carbono por cerca de 700 gerações, o que resultou na aquisição da capacidade de utilizar l-1,2-PDO como uma única fonte de carbono e energia. O organismo evoluído a partir de um organismo que não crescia nesse substrato inicialmente, alcançou uma velocidade de crescimento de $0,35 \text{ h}^{-1}$. O procedimento experimental empregado envolveu a determinação da densidade ótica a 600_{nm} e a transferência das células para frascos contendo meio fresco com o novo substrato. A diluição utilizada para cada passagem foi ajustada em função de mudanças na velocidade de crescimento (normalmente entre 5×10^5 e 5×10^8 células foram transferidas durante cada inoculação) e para garantir que as culturas não entrassem na fase estacionária antes da próxima passagem. Durante a fase inicial da evolução adaptativa, o meio mínimo também foi suplementado com 2 g/L de glicerol e a concentração deste composto foi gradualmente diminuída enquanto a concentração de 1,2-PDO foi aumentada para manter a concentração total de fonte de carbono no meio mínimo de 2 g/L. Este processo de transferências sucessivas durou 60 dias, até que se observou uma taxa de crescimento estável por mais de 5 dias. A quantidade de glicerol adicionada ao meio foi reduzida de forma exponencial durante os primeiros 11 dias de evolução.

Diante do que já foi apresentado e como afirma Suarez (2014), pode-se dizer que a engenharia evolutiva é uma técnica que pode ser aplicada para melhorar a diversidade e as propriedades de vários microrganismos, como por exemplo, o uso de diferentes substratos, tolerância a maiores concentrações de nutrientes, impurezas ou de inibidores, trazendo várias

vantagens para a engenharia de bioprocessos, assim como avanços significativos na obtenção de produtos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

No presente trabalho foram utilizadas duas cepas da *Escherichia coli* K12 MG1655 selvagem, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Beny Spira, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), da Universidade de São Paulo – USP, denominada de *E. coli* – USP; e pela Profa. Dra. Isabel Rocha, do Departamento de Engenharia Biológica (DEB) da Universidade do Minho – Portugal, adquirida no banco da Coli Genetic Stock Center – CGSC, da Yale University, denominada neste trabalho *E. coli* – UMinho,

3.2 Glicerol Bruto

O glicerol bruto (GB) foi cedido pela empresa Fertibom situada em Catanduva – São Paulo. O GB é subproduto da produção do biodiesel etílico utilizando uma combinação de óleos vegetais, óleo recuperado e sebo bovino na presença de um catalisador, constituído por NaOH e/ou KOH. A reação ocorre em temperatura ambiente e dura cerca de uma hora à uma hora e meia, levando à formação de uma suspensão composta pelo biodiesel, glicerol, sais e sabão. Para separar os compostos é feita uma extração com água e glicerol. A fase rica em éster é lavada com água para retirar os resíduos de sabão e sais. A mistura da água de lavagem com a fase contendo o álcool residual e o glicerol, denominada AGA, constitui o resíduo cedido para realização desse trabalho.

Por ser um resíduo com alto teor de álcool, o mesmo foi submetido a uma rotaevaporação, para a remoção do composto mais volátil. O rotaevaporador (Heidolph - Laborota 4000) foi acoplado a um banho termoestatizado e a uma bomba de vácuo, conforme Figura 5. A velocidade de rotação foi mantida em torno de 45 rpm, a temperatura entre 60 e 70 °C, a pressão entre -550 e -600 mmHg por um período de 2 a 3 horas. O resíduo concentrado obtido ao final desse processo foi denominado de glicerol bruto rotaevaporado (GBRota).

Figura 5 - Esquema de Rotaevaporação

Fonte: Acervo pessoal.

3.2.1 Caracterização do Glicerol Bruto Rotaevaporado

A caracterização do GBRota utilizado nos cultivos descritos a seguir foi realizada na Embrapa Instrumentação Agropecuária – São Carlos/SP, pela analista Alice Raabe. Os elementos quantificados assim como a metodologia empregada, espectroscopia de absorção atômica (AAS) ou análise elementar (CHN), estão descritos na Tabela 4. Os equipamentos utilizados foram: Analisador Elementar, modelo CHN 2400, marca PerkinElmer; Espectrômetro de Absorção Atômica com modo de atomização em chama, modelo PinAAcle 900T, marca PerkinElmer.

Tabela 4 - Caracterização do Glicerol Bruto Rotaevaporado

Elemento		Metodologia
Ca	AAS	$\lambda = 422,67 \text{ nm}$; acetileno: 2,70 L/min; ar: 10,0 L/min
K		$\lambda = 766,49 \text{ nm}$; acetileno: 2,50 L/min; ar: 10,0 L/min
Mg		$\lambda = 285,21 \text{ nm}$; acetileno: 2,50 L/min; ar: 10,0 L/min
Na		$\lambda = 589,00 \text{ nm}$; acetileno: 2,50 L/min; ar: 10,0 L/min
C	CHN	Gás de combustão: oxigênio
N		Gás de arraste: argônio
H		Ambos ultrapuros

Fonte: Acervo pessoal.

A quantificação de glicerol e etanol foi realizada no DEQ/UFSCar, conforme metodologia descrita no item 3.4.2. Quantificou-se ainda a massa total de sólidos presentes no GBRota usando a metodologia de massa seca, descrita no item 3.4.5.

3.3 Meio de cultivo

Os meios de cultivo utilizados no trabalho foram: meio sólido Lúria Bertani – Ágar (LB – Agar – tabela 5) descrito por Spegeleer et al. (2004); meio sólido definido com 1,5 % (m/v) de ágar, meio LB líquido conforme Tabela 5, exceto pelo ágar e meio líquido definido. A composição do meio definido está descrita na Tabela 6.

Tabela 5 - Composição do meio complexo LB

Componente	Concentração
Triptona	5 g/L
Extrato de Levedura	10 g/L
NaCl	10 g/L
Ágar	20 g/L

Fonte: Spegeleer et al., 2004

Inicialmente a composição do meio de cultivo definido foi baseada na descrita por Silva (2015). Porém, a fonte de carbono consistiu em misturas de glicerol puro e glicerol bruto rotaevaporado, em proporções que variaram ao longo do andamento do trabalho.

Foi preparada uma solução contendo o EDTA, ácido cítrico, ácido bórico e os sais descritos na Tabela 6, com exceção do sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$). O pH foi ajustado para 6,3 e esta solução foi esterilizada a 121°C por 20 minutos. Tanto a solução de glicerol quanto a solução de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ foram esterilizadas separadamente também a 121°C e por 20 minutos e adicionadas posteriormente à primeira solução. A solução de tiamina foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μm . As soluções foram misturadas asepticamente (SARGO, 2011). Tanto o meio sólido quanto o meio líquido tiveram o pH ajustado para 6,3.

Tabela 6 - Composição do meio definido

Nutriente	Concentração
Glicerol P.A	20g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5,3 g/L
KH ₂ PO ₄	17,73 g/L
Ácido Cítrico	2,27 g/L
Fe (III) Citrato	133,33 mg/L
CoCl ₂ 6H ₂ O	3,33 mg/L
MnCl ₂ 4H ₂ O	20,0 mg/L
CuCl ₂ 2H ₂ O	2,0 mg/L
H ₃ BO ₃	4,0 mg/L
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	2,8 mg/L
Zn (CH ₃ COOH) ₂ 2H ₂ O	33,8 mg/L
EDTA	18,8 mg/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,6 g/L
Tiamina (45mg/mL)	45 mg/L
*Antiespumante Polipropilenoglicol 30 %	1 mL/L

*Somente para cultivo em biorreator.

Fonte: Silva, 2015 – Adaptada.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Determinação da concentração celular

A concentração de biomassa foi medida por turbidimetria, sendo que as leituras de Densidade Ótica (DO) foram feitas no comprimento de onda de 600nm, utilizando espectrofotômetro Pharmacia Biotech modelo Ultrospec 2000. As amostras foram diluídas de modo que a leitura da absorbância não ultrapassasse o valor de 0,8, para garantir que a medida fosse realizada dentro da faixa de linearidade da relação entre densidade óptica e massa seca (HORTA, 2011).

Foi utilizado também o método da massa seca, onde um volume conhecido do caldo foi filtrado a vácuo em membrana (0,22 µm) cuja massa foi previamente aferida. A membrana foi então submetida à secagem a 70°C por 48 h. A diferença entre as massas da membrana antes e depois da filtração foi utilizada para o cálculo da massa seca - (gMS/L), (SILVA, 2015). A concentração celular (Cx em gMS/L) foi estimada a partir da correlação linear gerada pelas medidas de DO_{600nm} e massa seca obtidas em todos os experimentos realizados em biorreator (Equações 1 e 2)

$$C_x = 0,463 \pm 0,007 * DO_{600nm} - 0,625 \text{ (experimento em biorreator: linhagem selvagem)} \quad (1)$$

$$C_x = 0,46 \pm 0,01 * DO_{600nm} - 0,08 \text{ (experimento em biorreator: linhagem evoluída)} \quad (2)$$

3.4.2 Concentração de fonte de carbono (glicerol), etanol e ácidos orgânicos

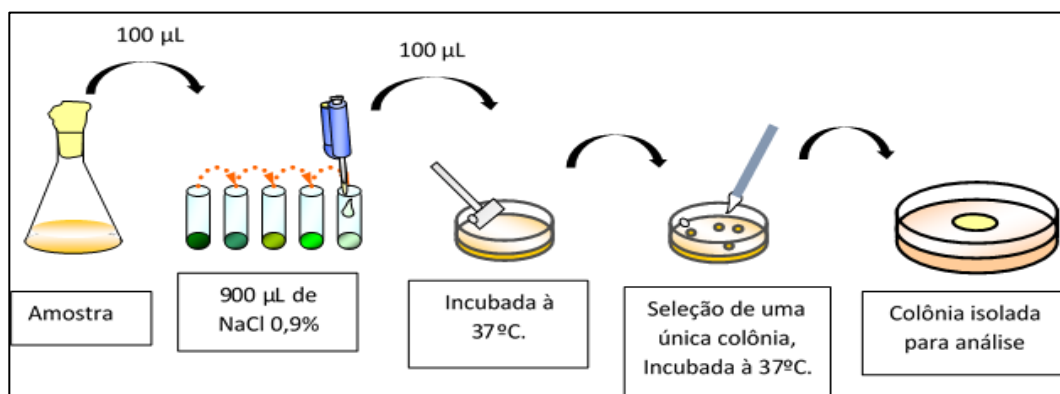
A determinação da concentração de glicerol, etanol e ácidos orgânicos (ácidos acético, succínico, fórmico e láctico) foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (sistema Waters Co; Bombas HPLC 510, Injetor W717, refratômetro W410 e leitor de UV PDA W996) utilizando a coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) como fase estacionária e uma solução de H₂SO₄ 5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 L/min e 60°C (SARGO, 2011).

3.4.3 Análise de morfologia de colônia

Preparou-se eppendorfs com 900 µL de NaCl 0,9% (solução salina) de acordo com a diluição seriada desejada, entre 10⁵ (para DO do meio até 3) e 10⁷ (DO do meio entre 3 e 20). Adicionou-se ao primeiro eppendorf 100 µL da amostra. Agitou-se e transferiu-se 100 µL para o próximo eppendorf, seguindo assim até o último.

Adicionou-se 100 µL do último eppendorf a uma placa com o meio desejado e espalhou-se com auxílio de uma alça de Drigalski até notar que a placa encontrava-se seca. A placa foi incubada em estufa incubadora (BOD) à temperatura de 37°C. Observou-se o crescimento de colônias isoladas e quando estas atingiram um tamanho satisfatório, foi escolhida uma única colônia, a qual foi replicada com auxílio de palitos estéreis em uma nova placa com a mesma composição da primeira para que crescesse isolada. A placa foi incubada em BOD à 37°C. Após o crescimento da colônia, as placas foram fotografadas e realizou-se a análise morfológica quanto ao formato da colônia e aspecto. A Figura 6 representa um esquema simplificado do processo.

Figura 6 – Esquema de morfologia de colônia



Fonte: Acervo pessoal

3.4.4 Análise da morfologia celular

A morfologia das células foi acompanhada em microscópio, após tratamento da suspensão pelo método de Gram (KYLE et al., 2012), sendo que, para isso, uma colônia crescida em placa foi espalhada em uma lâmina contendo de 20 µl de solução salina 0,9% e fixada com calor. Solução de cristal violeta foi aplicada sobre a amostra por um período de 1 minuto, sendo então lavada extensivamente. A lâmina foi coberta com solução de lugol por 30 segundos antes de ser novamente enxaguada. Procedeu-se em seguida à descoloração com álcool etílico absoluto por cerca de 5 segundos e à lavagem com água destilada. Aplicou-se o corante fucsina por 30 segundos antes da lavagem final com água destilada.

As lâminas bacteriológicas foram examinadas usando um microscópio ótico (Olympus BX50) munido de um sistema de aquisição digital de imagens utilizando ampliação de 1000 vezes.

3.4.5 Determinação Massa Seca do GBRota

Colocou-se os eppendorfs na estufa a 70°C por cerca de 12 horas, até eliminação completa da umidade. Numerou-se os eppendorfs e estes foram pesados em balança analítica, anotando o peso dos mesmos. Transferiu-se 2,0 mL da amostra a ser analisada para o eppendorf. Transferiu-se os eppendorfs contendo as amostras para estufa a 70°C. Diariamente os tubos eppendorf contendo as amostras foram transferidos para dessecador por 30 minutos e posteriormente pesados em balança analítica até obter massa constante. Determinou-se massa seca da seguinte forma:

$$\text{Massa seca} = (\text{massa Eppendorf} + \text{amostra}) - (\text{massa Eppendorf vazio})$$

O procedimento foi realizado com 6 amostras do mesmo resíduo GB Rota.

3.4.6 Determinação de contagem de UFC

Para a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC), amostras de 100 μL da suspensão celular retiradas da cultura de forma estéril foram diluídas entre 10^6 e 10^8 e semeadas em placas de LB-Ágar. Após 24 h de incubação a 37°C , foi realizada a contagem do número de colônias formadas nessas placas (VÉLEZ et al., 2014).

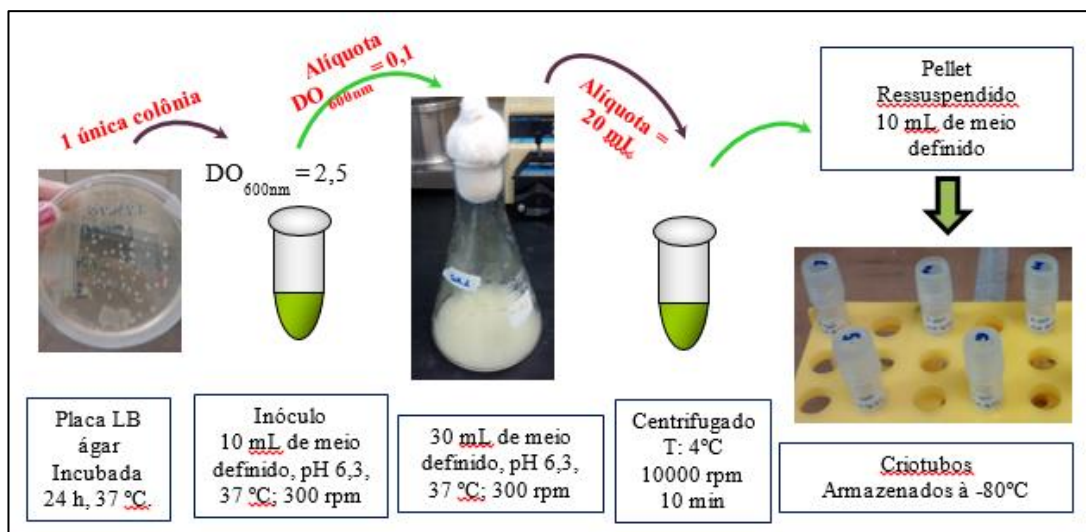
3.5 Procedimento experimental

3.5.1 Ativação da cepa e preparação de criotubos – Linhagem selvagem

As cepas recebidas foram transferidas para placas de petri contendo o meio LB para verificação de contaminação e isolamento de colônias de *E. coli*.

Para preparação da cultura estoque da linhagem selvagem foi coletada uma colônia em crescimento em placa de LB Ágar (incubada por 24 horas à 37°C) e transferida para um frasco tipo falcon estéril de 50 mL contendo 10 mL de meio definido (Tabela 6) para preparo do inóculo. O frasco foi deixado em uma câmara incubadora rotativa (shaker) a 300 rpm e 37°C até atingir $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 2,5 (garantia que o crescimento ainda estava na fase exponencial), transferindo-se então uma alíquota para frasco erlenmeyer estéril de 500 mL contendo 30 mL de meio definido idêntico ao usado no preparo do inóculo, de maneira que a DO inicial do cultivo fosse 0,1. Quando foi atingida uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 1, o cultivo foi interrompido e um volume de 20 mL de meio foi centrifugado. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 10 mL de meio fresco. Como crioprotetor foi adicionado glicerol 50% em volume e concentração adequados para se obter uma solução final com 10% v/v de glicerol. Em seguida a suspensão resultante foi transferida para os criotubos, os quais foram identificados e estocados a -80°C . A Figura 7 é um esquema do procedimento.

Figura 7 - Esquema de confecção dos criotubos



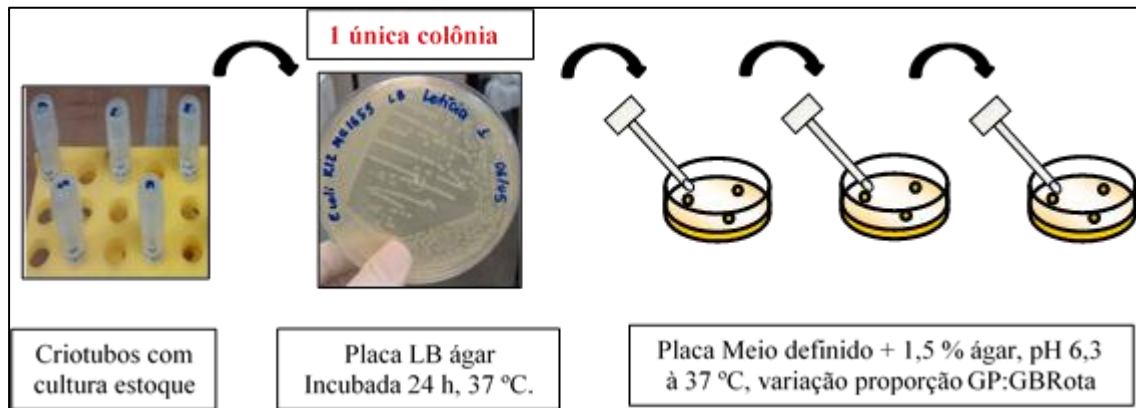
Fonte: Acervo pessoal

3.5.2 Experimentos com a cepa *E. coli* – USP

3.5.2.1 Seleção de células adaptadas ao GBRota para *E. coli* – USP

Com base na estratégia empregada por Suarez (2014) desenvolveu-se uma metodologia visando selecionar células da bactéria *E. coli* – USP capazes de crescer no GBRota como fonte de carbono. Células provenientes da cultura estoque foram inicialmente estriadas em placa contendo meio LB – Ágar. Após incubação a 37°C, por 12 a 24 horas, cinco colônias formadas foram selecionadas e estriadas separadamente em 5 placas contendo meio sólido definido com 1,5% (m/v) de ágar usando glicerol PA (GP) como fonte de carbono. Estas placas foram incubadas nas mesmas condições que a anterior, porém por 48 horas. Foram preparadas novas placas com mistura de GP:GBRota na proporção de 80:20. Uma colônia de cada placa da condição anterior foi selecionada e estriada na placa com a proporção 80:20. Após nova incubação a 37°C por período de até 96 horas, se necessário, as colônias formadas foram novamente selecionadas, identificadas e estriadas em outras 5 placas, contendo GP:GBRota na proporção 60:40. Esse procedimento foi repetido sucessivamente em placas contendo GP:GBRota nas proporções 40:60 e 20:80 até que o GP foi integralmente substituído por GBRota. Todas as placas foram fotografadas. O procedimento foi ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema estratégia de adaptação *E. coli* - USP



Fonte: Acervo pessoal

As colônias constituídas por células adaptadas ao glicerol bruto rotaevaporado, obtidas ao final do processo foram cultivadas em frascos contendo meio líquido definido preparado com GBRota para preparação da cultura estoque da linhagem selecionada, conforme procedimento descrito no item 3.5.1.

3.5.2.2 Cultivo em shaker com linhagem selvagem e linhagem selecionada - *E. coli* - USP

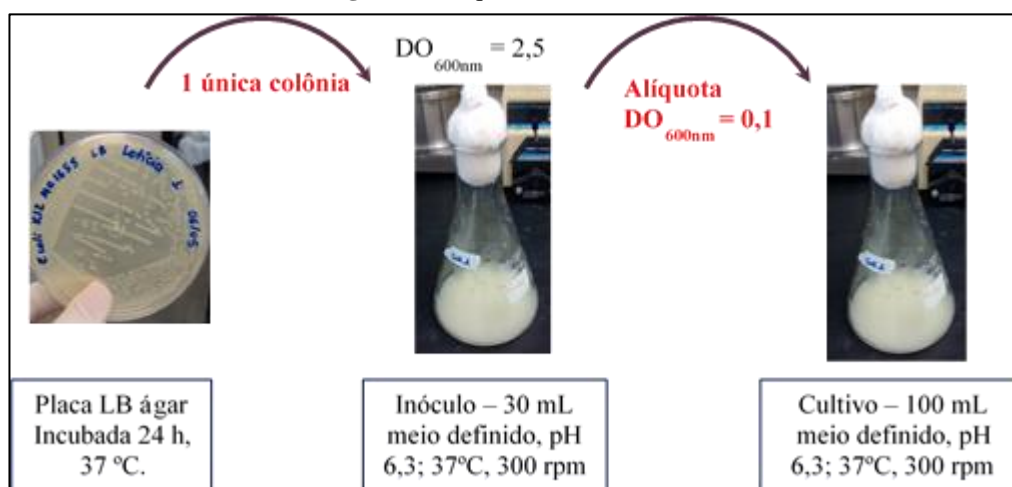
Para comparar as linhagens selvagem e adaptada, obtida ao final dos experimentos descritos em 3.5.2.1, ambas foram cultivadas em shaker, usando meio definido contendo tanto glicerol P.A como glicerol bruto rotaevaporado como fonte de carbono.

Para o cultivo em shaker, a cepa (linhagem selvagem ou selecionada) foi estriada em placa com meio LB – ágar, incubada por 24 horas à 37°C. Uma colônia isolada foi adicionada ao frasco de preparo de inóculo contendo 30 mL de meio definido com glicerol P.A ou GBRota em frasco erlenmeyer estéril de 500 mL. Realizou-se o acompanhamento da DO_{600nm} , e quando esta encontrava-se aproximadamente em 2,5, transferiu-se uma alíquota para o frasco de cultivo contendo 100 mL do mesmo meio usado no inóculo, de maneira que a DO_{600nm} inicial do frasco fosse 0,1. Acompanhou-se a DO_{600nm} do cultivo até observar-se o início da fase estacionária. A tabela 7 apresenta os cultivos realizados e a figura 9 representa esquematicamente o procedimento empregado nesta etapa do trabalho.

Tabela 7 - Cultivos realizados em shaker com *E. coli* - USP selvagem e evoluída

Cultivo	Linhagem	Fonte de Carbono
1	Selvagem	GP
2	Selvagem	GBRota
3	Selecionada	GP
4	Selecionada	GBRota

Fonte: Acervo pessoal

Figura 9 - Esquema de cultivo em shaker

Fonte: Acervo pessoal

3.5.3 Experimentos com a cepa *E. coli* – UMinho

3.5.3.1 Adaptação evolutiva da *E. coli* – UMinho

Baseados nos trabalhos desenvolvidos por Lee e Palsson (2010); Wang e colaboradores (2010); Kwon e colaboradores (2010); Hu e Wood (2010); Atsumi e colaboradores (2010); Li e colaboradores (2013) e Dragosits e Mattanovich (2013) aplicou-se a metodologia de evolução adaptativa para obter uma cepa evoluída a partir da *E. coli* – UMinho capaz de crescer no GBRota como fonte de carbono.

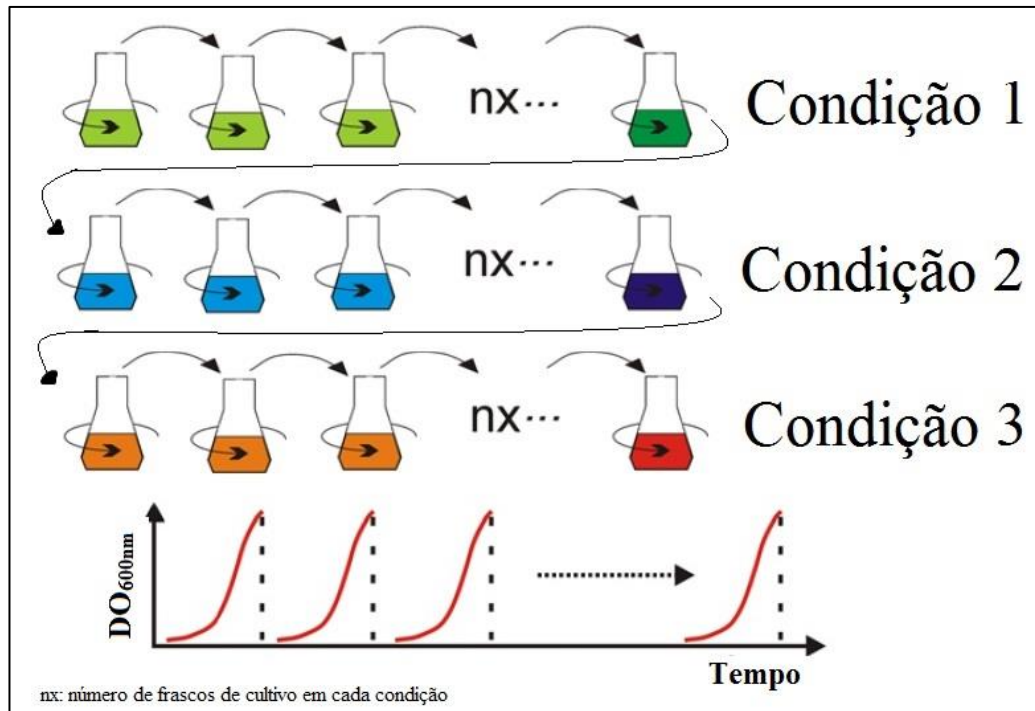
Fez-se o estriamento da linhagem selvagem de *E. coli* – UMinho a partir do criotubo previamente preparado, conforme item 3.5.1, em placa com meio LB-ágar, a qual foi incubada por 24 horas à 37°C. Uma colônia isolada foi adicionada a um frasco erlenmeyer de 500 mL com 15 mL de meio definido contendo GP e pH ajustado em 6,3. Os frascos foram incubados em shaker sob rotação de 300 rpm e temperatura de incubação de 37°C. Realizou-se

o acompanhamento da DO_{600nm} , e quando esta encontrava-se aproximadamente em 2,5, transferiu-se uma alíquota para o frasco de cultivo contendo 15 mL do mesmo meio usado no inóculo, de maneira que a DO_{600nm} inicial do frasco fosse 0,1. Quando o frasco do cultivo atingiu uma DO_{600nm} em torno de 2,5, foram iniciados dois conjuntos de experimentos de adaptação evolutiva em paralelo por transferências sucessivas. Para o conjunto FExp a transferência sempre aconteceu com culturas na fase exponencial do crescimento enquanto para o conjunto FEst a transferência foi feita na fase estacionária de crescimento. As condições de cultivos em relação a pH, temperatura e agitação foram as mesmas do inóculo.

Para o conjunto FExp foram preparados 23 frascos para cada condição de composição do meio, sendo as 4 primeiras condições com a mesma concentração da fonte carbono – 20 g/L, apenas substituindo gradualmente a proporção do glicerol puro pelo resíduo rotaevaporado, nas seguintes proporções (GP:GBRota): 75:25; 50:50; 25:75; 0:100. Nos experimentos seguintes foram preparados 15 frascos de cultivo e a concentração da fonte de carbono foi aumentada para 30 g/L e por fim 60 g/L, usando apenas o GBRota. Para o conjunto FExp as transferências sucessivas ocorriam quando a DO_{600nm} da suspensão encontrava-se entre 2 e 3. No cultivo do último frasco de cada condição realizava-se a transferência para o primeiro frasco da próxima condição. A Figura 10 ilustra a metodologia de transferências sucessivas. A partir da suspensão coletada no último frasco de cada condição foram preparados criotubos para armazenamento das culturas gradativamente evoluídas.

Para o conjunto FEst, o procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente (Figura 10), exceto pelo número de frascos empregados em cada condição, que foi reduzido para 14, mantendo-se a concentração da fonte carbono em 20 g/L e substituindo gradualmente a proporção do glicerol puro pelo resíduo rotaevaporado nas mesmas proporções descritas acima. As transferências sucessivas ocorriam quando a DO_{600nm} encontrava-se entre 10 e 13. No cultivo do 14º frasco (último frasco de cada condição) realizava-se a transferência para o primeiro frasco da próxima condição. A partir da suspensão coletada no último frasco de cada condição (0:100) foram preparados criotubos para armazenamento da cultura evoluída. Não foram realizados estudos com concentrações de fonte de carbono superiores a 20 g/L no conjunto FEst.

Figura 10 - Estratégia de adaptação evolutiva



Fonte: Dragosits e Mattanovich, (2013) – Adaptada.

Para os cultivos da condição 6 e 7 e os cultivos em que foram usados o GBRota acima de 20 g/L as medidas de DO_{600nm} foram corrigidas conforme item 3.6.4. Essa correção foi necessária pois em meios com concentrações superiores a 20 g/L há uma concentração maior de sólidos não solúveis que afetam a turbidez do meio interferindo na leitura real da DO_{600nm} .

3.5.3.2 Cultivo em shaker com linhagem selvagem e linhagem evoluída - *E. coli* - UMinho

Para comparar as linhagens selvagem e evoluída (obtida ao final do conjunto de experimentos FExp em meio contendo 30 g/L), ambas foram cultivadas em shaker, usando meio definido contendo tanto glicerol P.A como glicerol bruto rotaevaporado como fonte de carbono conforme descrito na tabela 8. Além da influência dos sais e impurezas contidas no GBRota, a ocorrência de inibição por substrato também foi avaliada (Cultivos A-3 e A-4).

Os cultivos A-1 a A-4 (Tabela 8) foram realizados em shaker. A partir dos criotubos armazenados, a cepa escolhida (linhagem selvagem ou evoluída) foi inicialmente ativada em placa com meio definido com 1,5 % (m/v) de ágar contendo a mesma fonte de carbono usada no cultivo no qual foi obtida, sob incubação por 24 horas à 37°C. Uma colônia isolada foi transferida ao frasco erlenmeyer de 500 mL contendo 15 mL de meio conforme tabela 8. Realizou-se o acompanhamento da DO_{600nm} e, quando esta encontrava-se aproximadamente em

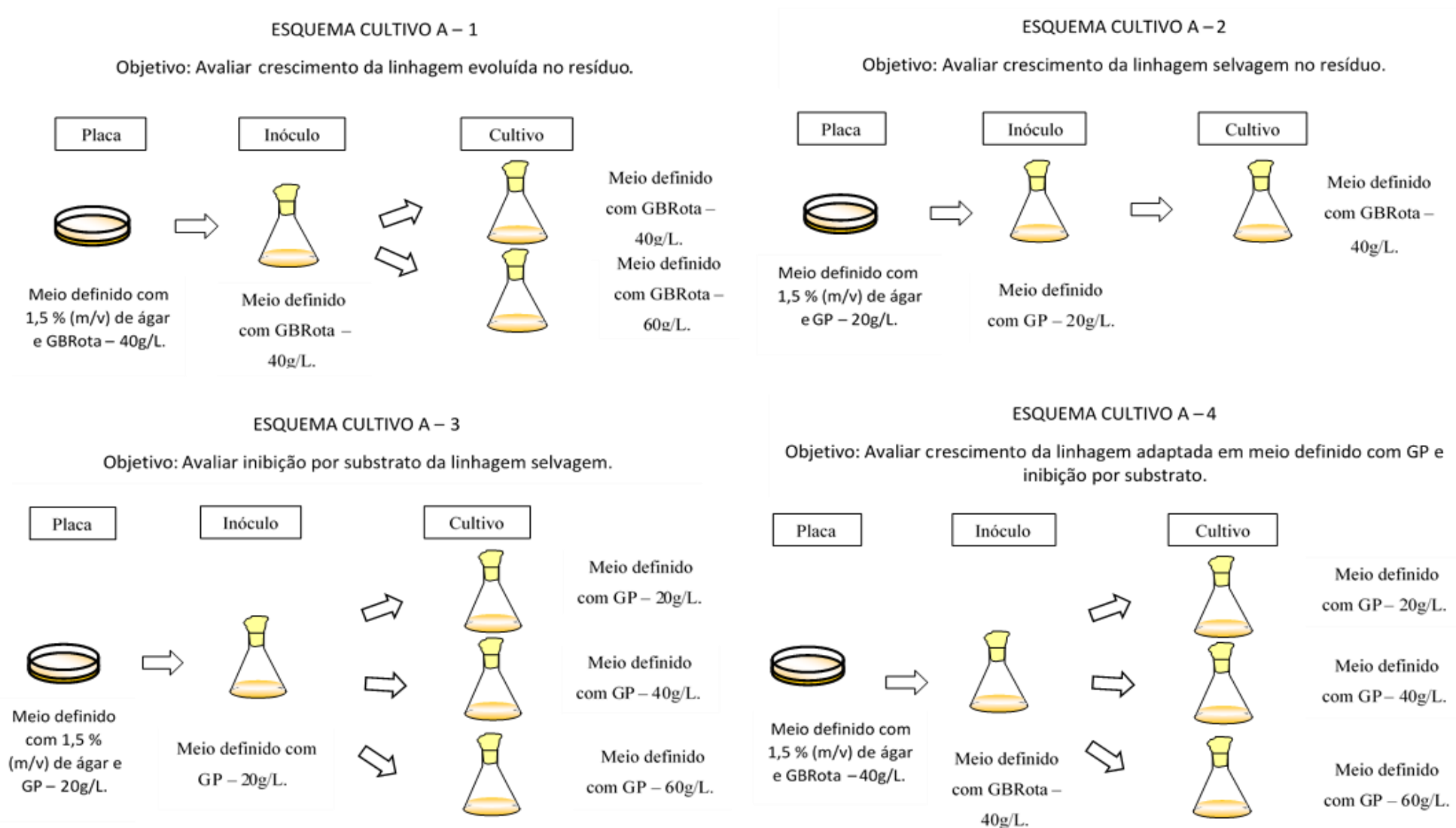
2,5, transferiu-se uma alíquota para o frasco de cultivo contendo 30 mL de meio, de acordo com Tabela 8, de maneira que a DO_{600nm} inicial do frasco fosse 0,1. Acompanhou-se a DO_{600nm} do cultivo até observar o início da fase estacionária. Foram retiradas amostras ao longo do cultivo para acompanhamento da DO_{600nm} assim como para análises de morfologia das colônias e das células e para medida do pH ao final do cultivo. A Figura 11 mostra uma representação esquemática de cada cultivo.

Tabela 8 - Cultivos em shaker *E. coli* - UMinho

Cultivo	Microrganismo	Meio da Placa	Meio do inóculo	Meio do cultivo	Objetivo
A - 1	<i>E. coli</i> - UMinho Evoluída	Meio definido com 1,5 % (m/v) de ágar e GBRota - 40 g/L.	Meio definido com GBRota - 40 g/L.	<ul style="list-style-type: none"> ● Meio definido com GBRota - 40 g/L. ● Meio definido com GBRota - 60 g/L. 	Avaliar crescimento da linhagem evoluída no resíduo.
A - 2	<i>E. coli</i> - UMinho Selvagem	Meio definido com 1,5 % (m/v) de ágar e GP - 20 g/L.	Meio definido com GP - 20 g/L.	<ul style="list-style-type: none"> ● Meio definido com GBRota - 40 g/L. 	Avaliar crescimento da linhagem selvagem no resíduo.
A - 3	<i>E. coli</i> - UMinho Selvagem	Meio definido com 1,5 % (m/v) de ágar e GP - 20 g/L.	Meio definido com GP - 20g/L.	<ul style="list-style-type: none"> ● Meio definido com GP - 20 g/L. ● Meio definido com GP - 40 g/L. ● Meio definido com GP - 60 g/L. 	Avaliar inibição por substrato da linhagem selvagem.
A - 4	<i>E. coli</i> - UMinho Evoluída	Meio definido com 1,5 % (m/v) de ágar e GBRota - 40 g/L.	Meio definido com GBRota - 40 g/L.	<ul style="list-style-type: none"> ● Meio definido com GP - 20 g/L. ● Meio definido com GP - 40 g/L. ● Meio definido com GP - 60 g/L. 	Avaliar crescimento da linhagem evoluída em meio definido com GP e inibição por substrato

Fonte: Acervo pessoal

Figura 11 - Esquema para cada cultivo de caracterização.



Fonte: Acervo pessoal

3.5.3.3 Cultivos em Biorreator

Foram realizados dois cultivos em biorreator, sendo um com a linhagem selvagem da *E. coli* – UMinho (Cultivo 1) e outro com a linhagem evoluída da *E. coli* – Uminho obtida na condição 6 (Cultivo 2).

Os cultivos em batelada foram realizados em condições aeróbias utilizando meio definido, conforme Tabela 6 e glicerol proveniente do GBRota, como fonte de carbono. Os experimentos foram conduzidos a 37°C em biorreator tipo tanque agitado, encamisado com capacidade de 2,0 L de volume total (Applikon, Netherlands), com 930 mL de meio definido com GBRota a 40 g/L, acrescido de 70 mL de inóculo preparado de acordo com o item 3.5.3.3.1, com $DO_{600nm} \sim 2,5$. O pH dos cultivos foi mantido em 6,3, através da adição automática de NH_4OH e H_3PO_4 e ajustado gradualmente para 6,7 quando o cultivo atingiu DO_{600nm} igual a 15. A concentração de oxigênio dissolvido (COD) permaneceu sempre acima dos 30% da saturação através de um controlador que automaticamente ajustava a velocidade de agitação (entre 200 e 900 rpm) e as vazões de ar e oxigênio (vazão total da corrente gasosa de entrada mantida em 1 L/min) controladas por fluxômetros (GFC AALBORG). A composição do gás de saída foi monitorada pelo analisador de gases (Sick / MAIHAK S710) para a aquisição automática da fração molar de CO_2 e pelo sensor de oxigênio amperométrico / polarográfico (InPro 6830-12-220 / Mettler Toledo), ambos com aquisição analógica via cFP. Todo o controle e aquisição dos dados foi feito pelo software SuperSys_HCDC® desenvolvido em LabVIEW® (National Instruments) e MATLAB® (MathWorks) pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LADABio) do Departamento de Engenharia Química - UFSCar (HORTA et al., 2011; HORTA et al., 2014; SARGO, 2015).

Ao longo dos cultivos amostras foram retiradas para acompanhamento do crescimento celular, consumo da fonte de carbono e produção de metabólitos, conforme metodologias descritas no item 3.4 e 3.6 possibilitando o cálculo da velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e dos coeficientes de rendimento $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$.

3.5.3.3.1 Preparo do pré inóculo e inóculo para cultivos em biorreator

Para o preparo do pré inóculo, uma colônia isolada em placa com meio sólido (incubada por 24 horas à 37°C) foi semeada em frasco erlenmeyer estéril de 500 mL preenchido com 50 mL de meio líquido. O frasco foi deixado em shaker a 300 rpm e 37°C por cerca de 12 horas, com acompanhamento periódico do crescimento por meio de medida de densidade ótica.

Ao alcançar o valor de DO próximo a 2,5 (garantindo que o mesmo esteja em fase exponencial de crescimento) teve início a preparação do inóculo.

Para a preparação do inóculo, 2 erlenmeyers estéreis de 500 mL foram preenchidos com 70 mL de meio de mesma composição que o usado no pré inóculo. Uma alíquota do frasco de pré-inóculo foi adicionada em cada erlenmeyer de forma que todos tivessem inicialmente uma DO igual a 0,1. Os frascos foram deixados em shaker a 300 rpm e 37°C por cerca de 8 h, com acompanhamento periódico do crescimento também por meio de medida de DO_{600nm}. Ao alcançar o valor de DO próximo a 2,5 (garantindo que o mesmo esteja em fase exponencial de crescimento) os 70 mL de inóculo (de um único frasco) foram transferidos para o biorreator. A tabela 9 descreve os meios usados em cada cultivo de acordo com a linhagem selvagem ou evoluída.

Tabela 9 - Meios usados no pré inóculo e inóculo do reator

Cultivo	Linhagem	Meio da placa	Meio do pré inóculo	Meio do inóculo
1	Selvagem	LB - ágar	LB - líquido	
2	Evoluída	Meio sólido definido com GB Rota – 20 g/L e 1,5 % (m/v) de ágar	Meio definido com GB Rota – 20 g/L	

3.6 Procedimentos de Cálculo

3.6.1 Vazão molar de CO₂ produzido e número de mols de CO₂ acumulado.

A vazão molar de CO₂ produzido foi calculada aplicando-se a lei dos gases ideais (Equação 3), utilizando-se os dados de fração molar de CO₂ (y_{CO_2}) adquiridos em tempo real pelo software SuperSys_HCDC®.

$$\dot{n}_{CO_2} = (y_{CO_2,s} - y_{CO_2,e}) \cdot \frac{P}{RT} \cdot Q_{gás_saída} \quad (3)$$

Onde “ \dot{n}_{CO_2} ” é a vazão molar de CO₂ produzido (mol/h), P e T referem-se à pressão e à temperatura nas CNTP, “ $Q_{gás_saída}$ ” à vazão total dos gases na saída do reator e

“ $y_{CO_2,s}$ ” e “ $y_{CO_2,e}$ ” às frações molares de CO_2 na saída e na entrada, respectivamente. A vazão de gás na saída do reator, por sua vez, foi considerada aproximadamente igual à de entrada.

Finalmente, o número de mols de CO_2 acumulado com o tempo (n_{CO_2}) foi determinado por meio da integração da vazão molar de CO_2 , Equação 4, (SANTOS, 2012).

$$n_{CO_2} = \int_0^t \dot{n}_{CO_2} dt \quad (4)$$

3.6.2 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular a partir dos dados de densidade ótica

A velocidade específica de crescimento é definida por meio de um balanço de massa em reator em batelada representado pela Equação 5.

$$\frac{d(C_x \cdot V)}{dt} = \mu \cdot C_x \cdot V \quad (5)$$

Considerando μ na fase exponencial de crescimento e volume constante, temos que:

$$\mu = \left(\frac{1}{C_x} \right) \frac{dC_x}{dt} \quad (6)$$

Rearranjando, temos:

$$\mu \cdot dt = \frac{dC_x}{C_x} \quad (7)$$

Quando a velocidade específica de crescimento é máxima, $\mu = \mu_{\text{máx}}$ (constante) a equação 7 pode ser integrada, resultando em:

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln(C_x/C_{x0})}{t} \quad (8)$$

Rearranjando e assumindo a correlação $C_x = \alpha \cdot DO$; e substituindo na equação 8, temos que:

$$\ln \left(\frac{\infty \cdot DO}{\infty \cdot DO_0} \right) = \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad (9)$$

Rearranjando a equação 9, no formato $y = b + a \cdot x$, temos:

$$\ln DO = \ln DO_0 + \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad (10)$$

Nas equações 5 a 10, μ é a velocidade específica de crescimento, $\mu_{\text{máx}}$ a máxima velocidade específica de crescimento, observada na fase exponencial; “ t ” refere-se ao tempo decorrido durante a fase exponencial; “ C_{x0} ” é a concentração celular no início da fase log, enquanto “ C_x ” é a concentração celular ao longo da fase log.

As velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram determinadas através da construção do gráfico $\ln(DO_{600\text{nm}})$ em função do tempo, obtendo-se o valor de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento, conforme a equação 10, (SHULER E KARGI, 2002).

3.6.2.1 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular para cultivo em biorreator linhagem evoluída a partir dos dados de CO_2

O $\mu_{\text{máx}}$ para a linhagem evoluída no cultivo em biorreator foi determinado a partir da correlação entre a produção da massa de CO_2 e de células (C_x) na fase exponencial do cultivo. Essa estratégia foi utilizada pois houve uma fase exponencial muito rápida e poucas medidas de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ foram coletas, sendo insuficientes para um cálculo preciso. Como as medidas de CO_2 são online, obteve-se pontos suficientes para estimar com confiança o valor do $\mu_{\text{máx}}$.

Com base na correlação linear obtida através do método de massa seca, Equação 2, pode-se obter a massa de células produzidas, Equação 12. Para isso os dados de DO medidos na fase exponencial foram interpolados utilizando um polinômio de grau 3. O volume do reator foi considerado constante.

$$m_x = ((0,461 * 0,00582750t^3 + 0,01739631t^2 + 0,10761652t + 0,15534399) - 0,079) * v \quad (11)$$

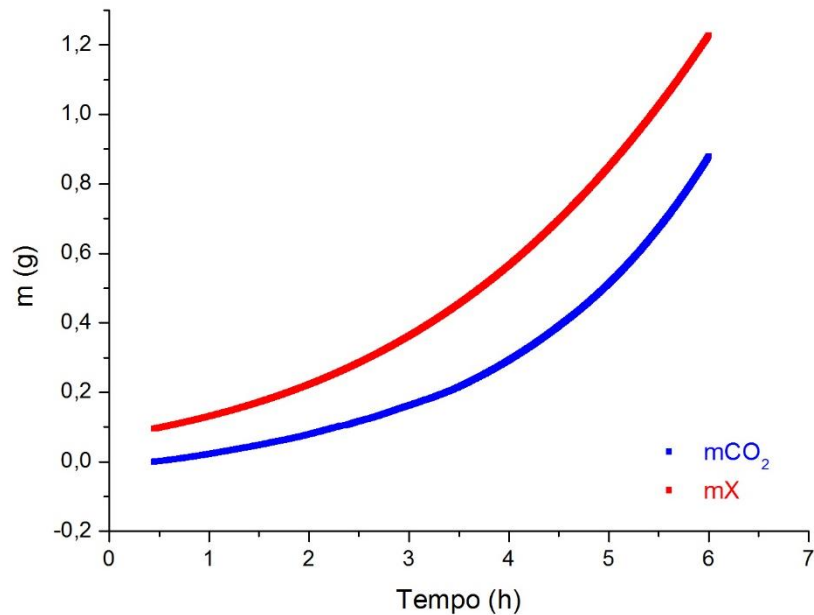
Onde “ m_x ” é a massa de células produzidas, em gramas, “ t ” é o tempo de cultivo em hora e “ v ” o volume do reator, 1L.

A massa de CO_2 – “ m_{CO_2} ” foi obtida a partir da Equação 12, sendo a massa molar do CO_2 igual a 44g/mol e o n_{CO_2} fornecido pela Equação 4.

$$m_{\text{CO}_2} = n_{\text{CO}_2} \cdot 44 \quad (12)$$

Com os dados das equações 11 e 12 construiu-se a Figura 12, na qual observa-se que as curvas que representam o acúmulo de massa celular e a liberação acumulada de CO_2 seguem a mesma tendência na fase exponencial.

Figura 12 - Massa de CO_2 produzido e a massa de células acumulada durante a fase exponencial. Cultivo 2, Linhagem evoluída.



Fonte: Acervo pessoal.

Assim, a relação entre m_X e m_{CO_2} pode ser expressa conforme Equação 13 onde α é uma constante.

$$m_X = \alpha \cdot m_{\text{CO}_2} \quad (13)$$

O valor de $\mu_{\text{máx}}$ para o cultivo da linhagem evoluída em reator pôde ser encontrado reformulando a Equação 10, em termos de massa de CO_2 , resultando na Equação 14.

$$\ln m_{CO_2} = \ln m_{CO_2 0} + \mu_{m\acute{a}x} \cdot t \quad (14)$$

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi determinada através da construção do gráfico $\ln(m_{CO_2})$ em função do tempo, obtendo-se o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1}) pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento, conforme a equação 14.

3.6.3 Determinação do número de gerações

Durante a fase exponencial também é possível calcular o tempo de duplicação (t_d), que corresponde ao intervalo de tempo necessário para a concentração celular dobrar. Tomando como base a Equação 9, temos que:

$$\ln\left(\frac{2 \cdot C_x}{C_x}\right) = \mu_{m\acute{a}x} \cdot t_d \quad (15)$$

Rearranjando temos que t_d é dado por (SHULER E KARGI, 2002):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} = \frac{0,693}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (16)$$

A partir da equação 16, pode-se determinar então o número de gerações (η_{ger}) em um cultivo.

$$\eta_{ger} = \frac{t_{cultivo}}{t_d} \quad (17)$$

sendo $t_{cultivo}$ correspondente ao momento de interrupção do cultivo (fase exponencial).

Tendo em vista que, no presente trabalho, para cada condição de adaptação temos um conjunto de valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ e de $t_{cultivo}$ característico da fase exponencial as equações (16) e (17) foram reformuladas em termos das médias do tempo de duplicação e o $\mu_{m\acute{a}x}$, para cada condição, conforme mostram as equações 18 e 19.

$$\bar{t}_d = \frac{\ln 2}{\overline{\mu}_{m\acute{a}x}} = \frac{0,693}{\overline{\mu}_{m\acute{a}x}} \quad (18)$$

$$\eta_{ger} = \frac{\sum_{i=1}^n t_{cultivo}}{\bar{t}_d} \quad (19)$$

Nas equações 18 e 19, “ \bar{t}_d ” é o tempo de duplicação médio, “ $\overline{\mu}_{m\acute{a}x}$ ” é a máxima velocidade média específica de crescimento em cada condição; “ n ” é o número de cultivos dentro da mesma condição.

A determinação do número de gerações total ao final do processo de adaptação evolutiva foi calculada usando a equação 20.

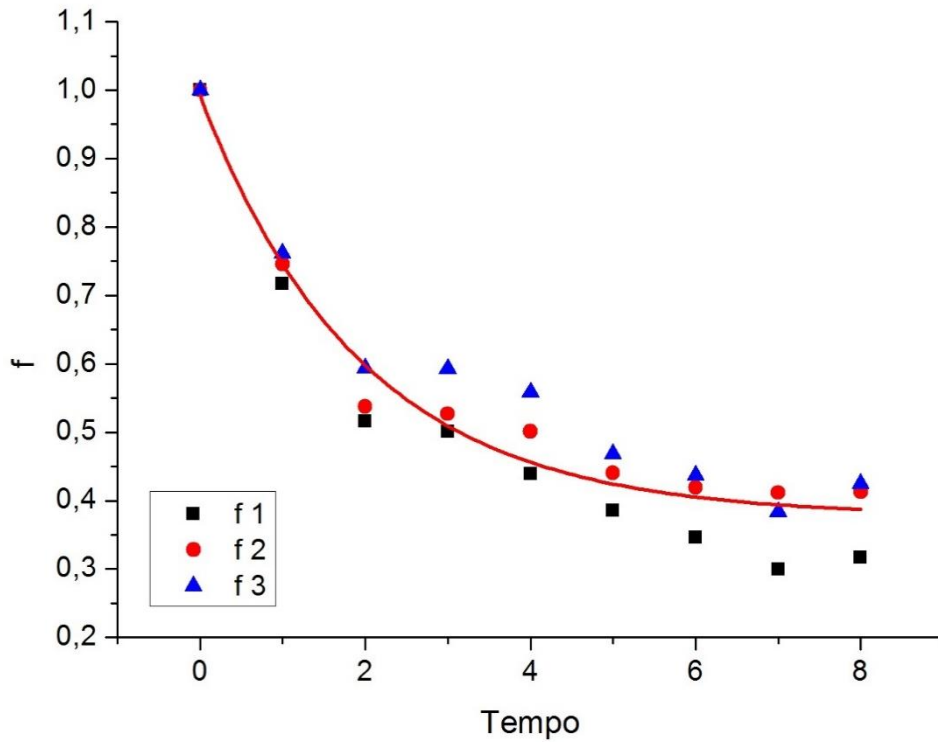
$$\eta_{ger_{total}} = \sum_{i=2}^{\kappa} \eta_{ger} \quad (20)$$

onde “ $\eta_{ger_{total}}$ ” é o número de geração total ao final do processo de adaptação evolutiva, “ κ ” representa cada condição de adaptação.

3.6.4 Correção da DO_{600nm} do meio de cultivo usando o GBRota

Devido à maior presença de sólidos não solúveis no meio de cultivo preparado com GBRota em concentrações superiores a 20 g/L, foi necessário corrigir os valores lidos da DO para obter o valor real da turbidez relacionado com a concentração celular. A partir do acompanhamento da DO do meio (isento de células) ao longo de 8 horas constatou-se que a mesma apresentava um perfil de decaimento exponencial. A variação da DO foi normalizada (Figura 13) e a Equação 21 foi obtida a partir do ajuste da função de decaimento exponencial aos dados normalizados. Para a correção da DO do meio para cada cultivo usando o GBRota em concentrações superiores a 20 g/L, o valor de f foi multiplicado pela DO do meio medida inicialmente e a DO real da suspensão foi calculada pela diferença entre DO lida e DO corrigida do meio de cultivo.

Figura 13 - Ajuste da função de decaimento exponencial com os dados normalizados da DO_{600nm} para cada frasco (f) com meio isento de células



$$f = A_1 \cdot e^{\left(\frac{-x}{t_1}\right)} + f_0 \quad (21)$$

Onde, A_1 , t_1 e f_0 são constantes do modelo determinadas a partir dos dados experimentais.

A Equação 22 foi usada para meios com concentração em torno de 40 g/L e a Equação 23 para meios com concentração em torno de 60 g/L.

$$f = 0,6147 \cdot e^{\left(\frac{-x}{1,95539}\right)} + 0,3769 \quad (22)$$

$$f = 0,5883 \cdot e^{\left(\frac{-x}{0,8386}\right)} + 0,4128 \quad (23)$$

3.6.5 Determinação do fator de conversão de substrato em células e em produtos.

A partir do cálculo de consumo do glicerol e etanol e da produção de biomassa correspondente a cada intervalo de tempo é possível calcular o valor do coeficiente de rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) empregando uma regressão linear, usando dados na fase exponencial pela equação 24 (SHULER e KARGI, 2002).

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta Cx}{-\Delta Cs} \quad (24)$$

O coeficiente de rendimento em ácido acético ($Y_{p/s}$), principal produto metabólico acumulado nos cultivos é dada pela regressão linear da equação 25.

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta Cp}{-\Delta Cs} \quad (25)$$

Para as equações 24 e 25, “ ΔCx ” corresponde à diferença entre a concentração celular variando com o tempo ($Cx(t)$) e a concentração celular no início da fase exponencial ($Cxin$); “ ΔCs ” corresponde à diferença entre concentração dos substratos (glicerol e etanol) no início da fase exponencial ($Csin$) e a concentração de substratos variando com o tempo (Cs); “ ΔCp ” corresponde à diferença entre concentração de ácido acético variando com o tempo (Cp) e a concentração de ácido acético no início da fase exponencial ($Cpin$).

3.6.6 Balanço de carbono nos cultivos

Para a realização do cálculo do balanço de carbono nos cultivos, são necessários dados da concentração celular, obtidos através de medidas de massa seca e da correlação entre o Cx e DO , dados de concentração de açúcares e ácidos orgânicos, dados de vazão total de gás e a fração molar de CO_2 no efluente gasoso que deixa o reator e dados do volume do reator.

O balanço foi realizado através de uma comparação entre o número total de C-mols de carbono ($\sum C_t$) presentes em um determinado instante no cultivo e o número total de C-mols de carbono presentes no reator no tempo de referência do experimento ($\sum C_0$). Para tal cálculo, estimou-se o número de C-mols de carbono presentes no cultivo como biomassa (N_{Cx}), conforme mostrado na Equação 26; o número de C-mols de carbono presentes no cultivo na forma de fontes de carbono (N_{FC}) e ácidos orgânicos (N_{AO}), como mostrado na Equação 27, e

o número de C-mols de carbono que deixam o reator na forma de CO₂ (N_{CO2}), como mostrado na Equação 4. A fórmula mínima adotada para o cálculo da quantidade de carbono (mol de carbono) presente na biomassa de *E. coli* foi CH_{1,77}O_{0,49}N_{0,24}P_{0,014}, e para os cálculos dos valores de N_{Cx}, foram considerados que até 5,5% da biomassa como sendo constituída por cinzas (von STOCKAR e LIU, 1999). Os valores obtidos para a fórmula mínima através de análise elementar podem variar significativamente de acordo com as condições adotadas durante o cultivo (VILLADSEN, NIELSEN, LIDÉN, 2011), sendo assim, a fórmula mínima adotada para os balanços de massa é considerada um valor médio.

$$N_{Cx} = \frac{C_x \cdot v}{MM_x} \quad (26)$$

$$N_{FC} \text{ ou } N_{AO} = \sum_{i=1}^{\infty} \frac{C_i \cdot v}{MM_i} \quad (27)$$

Onde “Cx” é a concentração celular (gMS/L), “v” é o volume do reator (L), “MMx” é a massa molar da fórmula mínima (ou elementar) da biomassa (g/mol), “Ci” é a concentração da fonte de carbono ou ácido orgânico (g/L), “MMi” é a massa molar da fórmula mínima (ou elementar) da fonte de carbono, ácido orgânico ou composto solúvel de carbono (g/mol) (SILVA, 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do glicerol rotaevaporado

O glicerol bruto recebido da Fertibom apresentava uma concentração muito alta de etanol. Por isso, foi empregada uma rotaevaporação para eliminar o máximo possível desse composto e gerar o resíduo GBRota utilizado na preparação de todos os meios. Na tabela 10, encontra-se a concentração média de glicerol e etanol do GBRota após cada rotaevaporação realizada. Foram realizadas 11 rotaevaporações e a numeração adotada identifica o GBRota obtido em cada uma delas. Os resultados da tabela 10 mostram que a composição do produto final da rotaevaporação variou em função das condições de tempo, temperatura e volume inicial empregadas durante o processo. Como esperado, a concentração de glicerol aumentou e a de etanol diminuiu para todos os GBRotas.

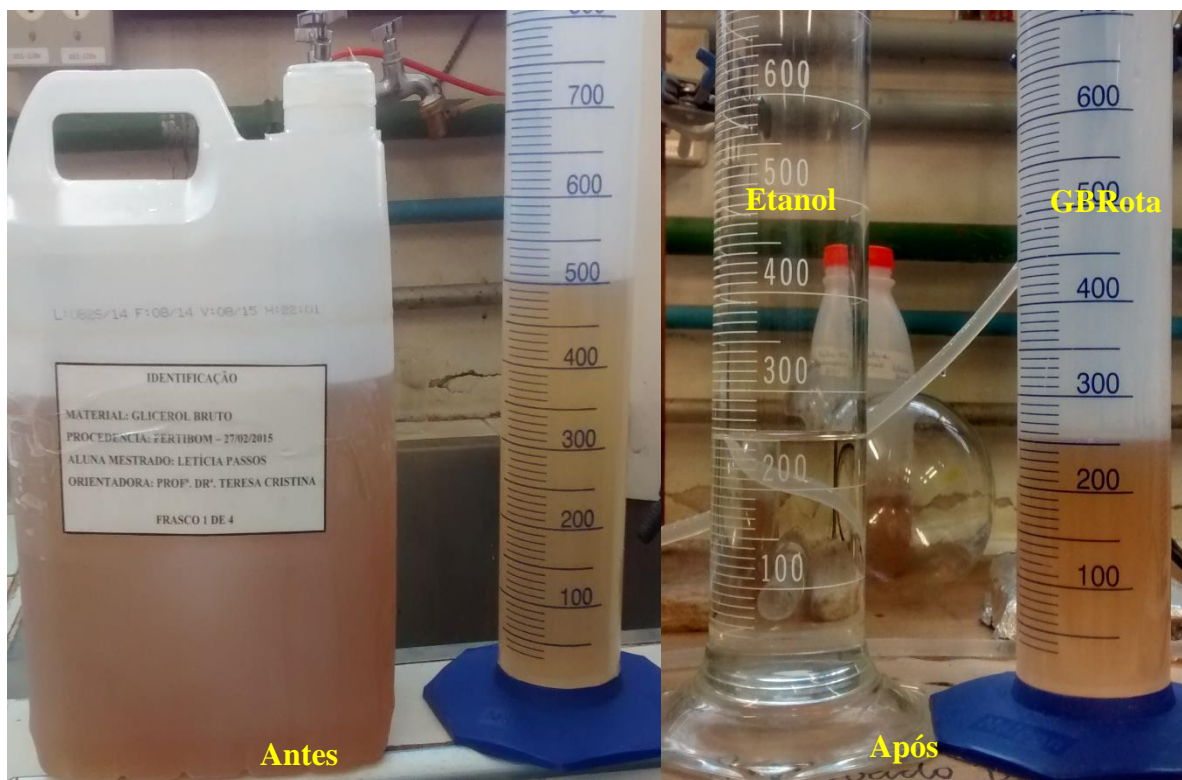
Tabela 10 - Caracterização do resíduo bruto (cedido pela Fertibom) e dos GBRota obtido após as rotaevaporações

Resíduo	Conc. Glicerol (g/L)	Conc. Etanol (g/L)
Glicerol Bruto	29±1	323±19
GBRota 1	58,7±0,3	38,2±0,1
GBRota 2	71,5±0,5	10,7±0,6
GBRota 3	71,2±0,3	22,7±0,2
GBRota 4	66±1	13,25*
GBRota 5	66,4±0,4	14,9±0,1
GBRota 6	75,9*	12,3±0,2
GBRota 7	79,7*	10,7±0,5
GBRota 8	71±1	22±6
GBRota 9	76±2	32,8±0,1
GBRota 10	71±1	32,4±0,5
GBRota 11	70±1	20,2±0,4

*Não houve duplicata.

Em cada rotaevaporação realizada, o volume final de glicerol bruto rotaevaporado obtido era em torno de 50% do inicial, como ilustrado na Figura 14. Para a preparação de alguns meios foram consumidos volumes maiores de GBRota e, neste caso, GBRota era constituído pela mistura dos resíduos obtidos em diferentes rotaevaporações.

Figura 14 - Glicerol bruto antes e após rotaevaporação



O glicerol rotaevaporado enviado a Embrapa para análise foi o GBRota 7. Os resultados relativos às caracterizações estão descritos na tabela 11. O valor referente ao elemento N é composto pela soma de nitrogênio e água, pois para a análise de CHN era necessário a amostra totalmente isenta de água. Como isso não foi possível, a massa de água presente na amostra foi quantificada juntamente com a do nitrogênio.

Tabela 11 - Caracterização glicerol bruto rotaevaporado 7

Unidade	(% m/m)			(mg/L)				(g/L)
Composto	C	H	N*	Na	Ca	K	Mg	Sólidos totais
Concentração	24,5±0,6	3,8±0,9	2,3±0,1	4555±15	111 ±2	6304±60	76,9±0,3	133±1

*O valor apresentado é a soma de N mais água.

Pode-se observar na tabela 11 maiores teores de sódio e potássio em relação aos demais sais quantificados. Isso se deve à presença dos catalisadores utilizados no processo, KOH e NaOH. Ao quantificar os sólidos totais utilizando o método de massa seca, o GBRota apresentou uma alta concentração de sólidos, os quais 79,7 g/L são referentes ao glicerol, 11,05 g/L correspondem aos sais quantificados. Já os 41,92 g/L restantes são provavelmente representados pelo MONG, como resíduos da saponificação, gorduras e óleos não reagidos.

De acordo com Rivaldi e colaboradores (2007) e Bueno (2007), a procedência das matérias primas, o catalisador, a rota (metílica ou etílica) influenciam a composição do glicerol produzido durante a síntese do biodiesel. A tabela 3, descrita no item 2.2.1 permite comparar a caracterização realizada em trabalhos de outros autores com a caracterização obtida nesse trabalho. Em relação ao elemento carbono pode-se notar que seu teor varia muito pouco mesmo quando óleos de diferentes origens são empregados, apresentando concentrações em torno de 25% (p/p). O nitrogênio apresenta teores baixos e homogêneos. Na amostra do GBRota os valores para o N são mais altos devido à análise realizada e à presença de água na amostra.

Já os teores em Na, K, Mg e outros sais são muito diferentes devido à natureza do glicerol bruto e às condições do processo de produção de biodiesel. Para o GBRota, os teores de sais são bem elevados em relação à maioria dos apresentados na tabela 3, exceto pelo sódio, principalmente devido ao efeito da rotaevaporação, que resulta no aumento da concentração de todos os componentes presentes no resíduo original devido à redução de volume.

4.2 Estratégia experimental para *E. coli* – USP

4.2.1 Seleção de colônia adaptada ao GBRota.

Para a confecção das placas utilizadas para selecionar a colônia adaptada foram utilizados tanto o glicerol puro, misturas dos GP com GBRota e somente o GBRota, conforme mostra a tabela 12. O volume de meio preparado foi de 300 mL para cada condição. Para o glicerol puro preparou-se uma solução de 100 g/L, a qual era adicionada às placas no volume necessário para obter a concentração desejada. Na mesma tabela, também é apresentado o tempo de incubação das placas.

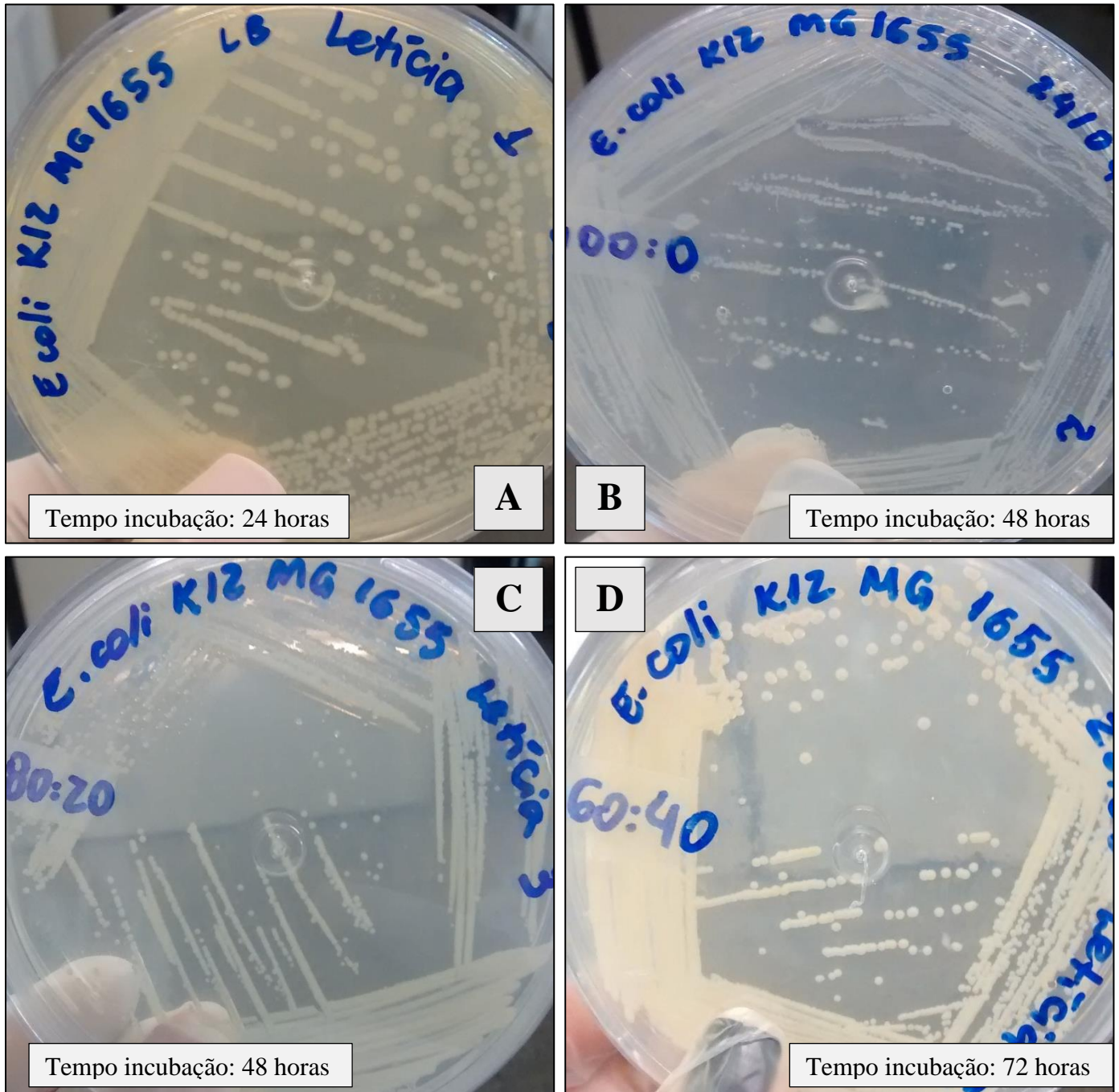
Tabela 12 - Composição do meio definido em placa e tempo de incubação

Concentração de glicerol na placa	Denominação da condição (GP:GBRota)	Proporção (%)		GBRota utilizado	Volume GP (mL)	Volume GBRota (mL)	Diluição GBRota (vezes)	Tempo de incubação (horas)
		GP	GBRota					
Meio LB - ágar	--	--	--	--	--	--	--	24
20 g/L	100:0	100	0	1	60,00	0,00	--	48
	80:20	80	20	1	48,00	20,43	14,68	48
	60:40	60	40	1	36,00	40,86	7,34	72
	40:60	40	60	2	24,00	50,34	5,96	72
	20:80	20	80	2	12,00	67,11	4,47	72
	0:100	0	100	2	0,00	83,89	3,58	72

Como pode-se observar na tabela a concentração do GBRota aumenta gradualmente à medida em que se aumenta o percentual de substituição em relação ao GP, tendo na última condição apenas o GBRota como fonte de carbono. Proporcionalmente, a concentração das impurezas e sais presentes no GBRota também sofre aumento, o que interfere no crescimento da *E. coli*.

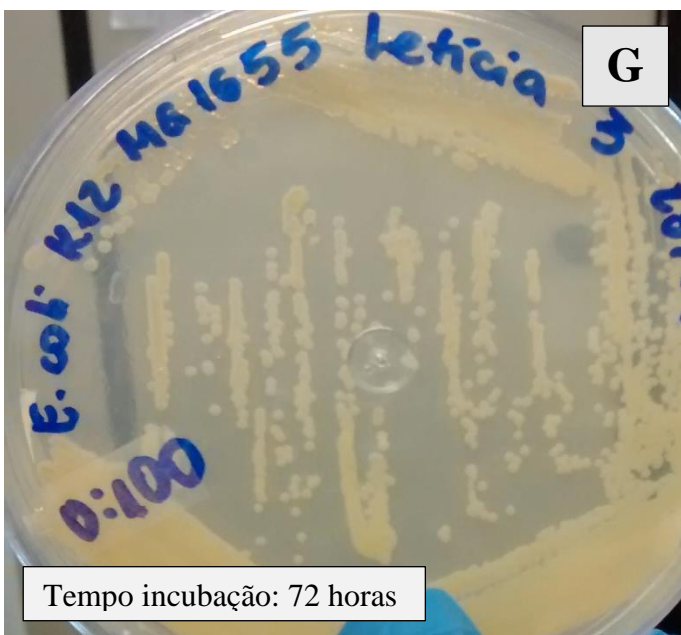
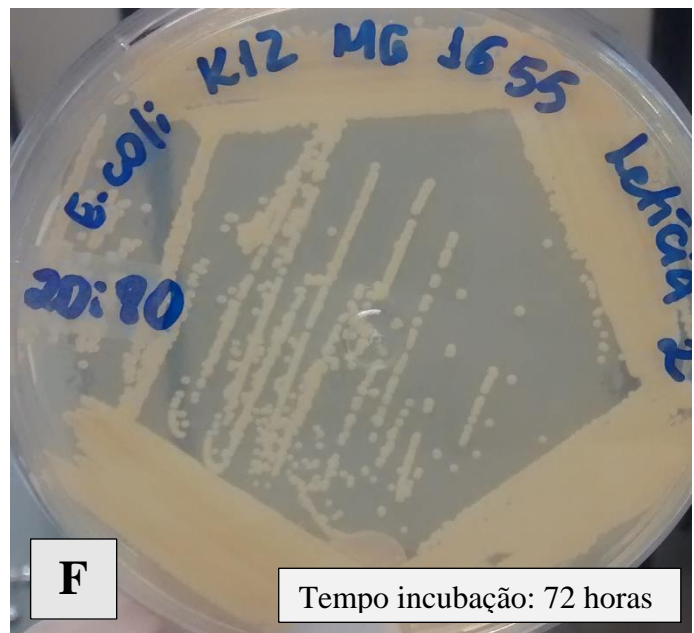
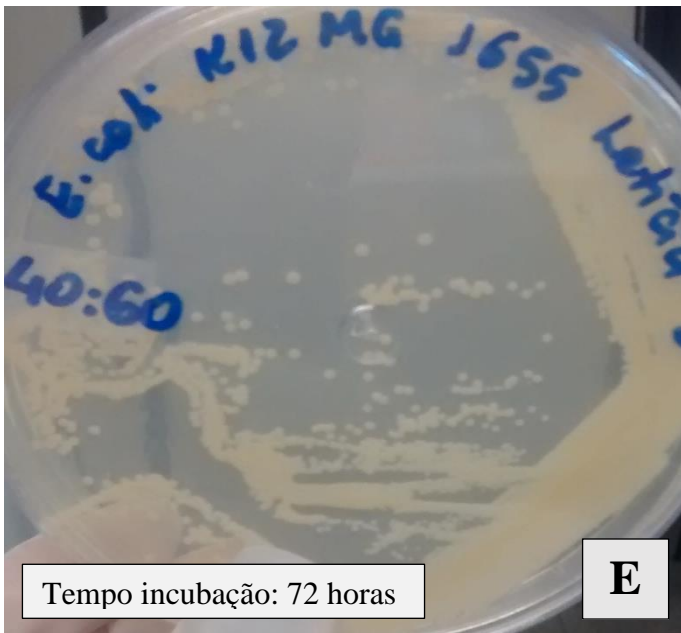
Como o meio LB é rico em aminoácidos e proteínas, ele é prontamente assimilável pelo microrganismo e em 12 horas de incubação já se nota algumas colônias e em 24 horas existiam muitas colônias aptas para dar sequência ao experimento. Ao transferir as colônias para o meio definido foi necessário o dobro do tempo de incubação até se observar a formação de colônias, já que este meio apresenta apenas sais de amônia como fonte de nitrogênio. Nota-se que à medida que a concentração de GBRota no meio sólido aumenta, o tempo de incubação da placa se torna maior, já que o aumento da concentração das impurezas, sais e etanol residual provavelmente inibe o crescimento. As Figuras 15 e 16 mostram imagens dos cultivos em meio sólido para as diferentes composições de meio. Em todas as condições houve um crescimento satisfatório, permitindo assim selecionar colônias capazes de se desenvolverem em meio com somente o GBRota como fonte de carbono e na presença das impurezas e sais. Uma única colônia foi selecionada a partir da placa da condição 0:100 e foi estriada em placa na mesma condição da qual ela foi obtida (Figura 16-H) e a partir desta placa foi realizado cultivo conforme procedimento para confecção dos criotubos, usando o GBRota 3.

Figura 15 - Cultivos em placa - *E. coli* - USP



- A: Placa com Meio LB-ágar;
 B: Placa com meio definido condição 100:0;
 C: Placa com meio definido condição 80:20;
 D: Placa com meio definido condição 60:40.

Figura 16 - Cultivo em placa – *E. coli* - USP



- E: Placa com meio definido condição 40:60;
 F: Placa com meio definido condição 20:80;
 G: Placa com meio definido condição 0:100;
 H: Placa com meio definido condição 0:100 para confecção dos criotubos.

4.2.2 Caracterização em shaker linhagem selvagem e selecionada

Os cultivos para avaliação das linhagens selvagem e selecionada foram realizados utilizando o meio definido contendo glicerol puro e o glicerol bruto rotaevaporado GBRota 5. Como o GBRota 5 apresenta uma concentração maior de glicerol do que a normalmente utilizada em cultivos em shaker, foi feita a diluição do resíduo procurando-se atingir a concentração de 20 g/L no meio. A Tabela 13 resume as principais características dos cultivos, bem como a concentração inicial do glicerol no meio.

Tabela 13 - Características dos cultivos em shaker com *E. coli* - USP

Origem do glicerol	Concentração inicial de glicerol (g/L)	Concentração inicial de etanol (g/L)	Microrganismo	pH inicial	Condição operação do shaker
P.A	19,8	0	Selvagem Selecionada	6,3	T=37°C 300 rpm
GBRota 5	24,6±0,5	5,9±0,2	Selvagem Selecionada		

Todos os cultivos foram realizados em duplicata e interrompidos um pouco após o início da fase estacionária.

A Figura 17 apresenta o crescimento celular das duas linhagens tanto no cultivo com GP quanto com GBRota. Para ambas as condições temos um comportamento semelhante, porém o crescimento é mais intenso no meio com glicerol puro, chegando a alcançar uma DO_{600nm} em torno de 8 para as duas linhagens em 12 horas de cultivo, enquanto no GBRota foi atingida uma DO_{600nm} de quase 6 em 14 horas.

É possível perceber, analisando a Figura 18, que para o cultivo usando o meio com GBRota há uma fase de adaptação, nas duas primeiras horas. Isso ocorre devido à presença dos contaminantes do GBRota, o que requer adaptação das células, e somente aquelas que conseguem se adaptar entram em crescimento exponencial. Com os experimentos realizados em placa era esperado que a fase de adaptação não fosse observada com a linhagem selecionada, já que a mesma tinha sido exposta anteriormente a esse meio.

Figura 17 - Crescimento celular das linhagens selvagem e selecionada em cultivo em shaker com meio definido usando GP ou GBRota. pH: 6,3, T: 37°C, 300 rpm. A barra de erro é referente às duplicatas.

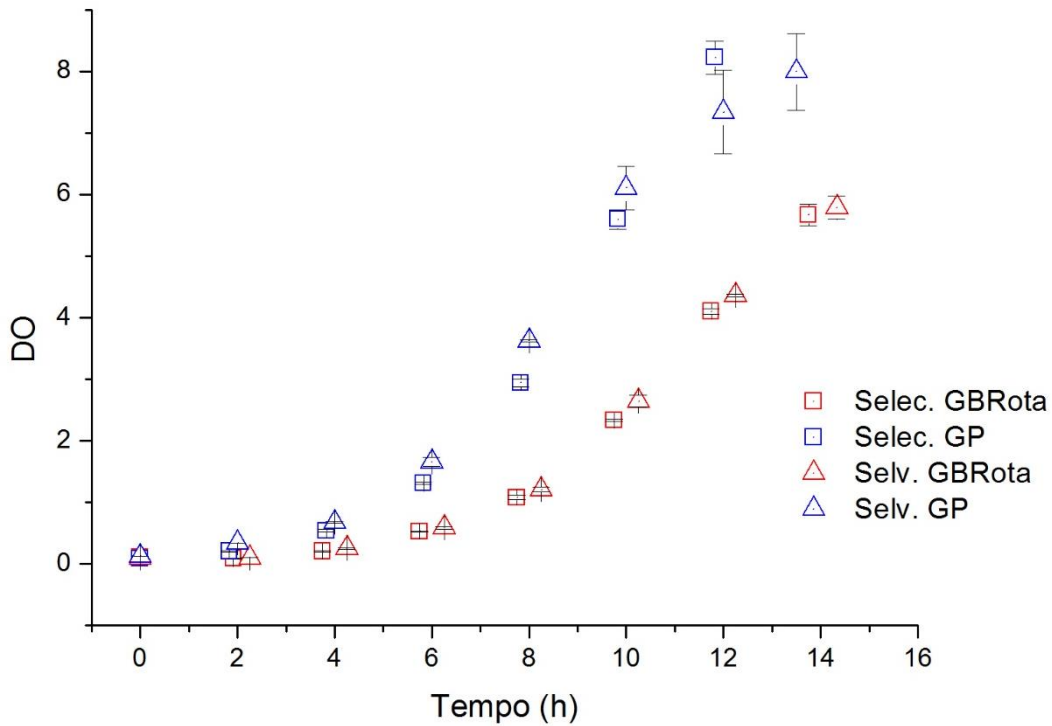
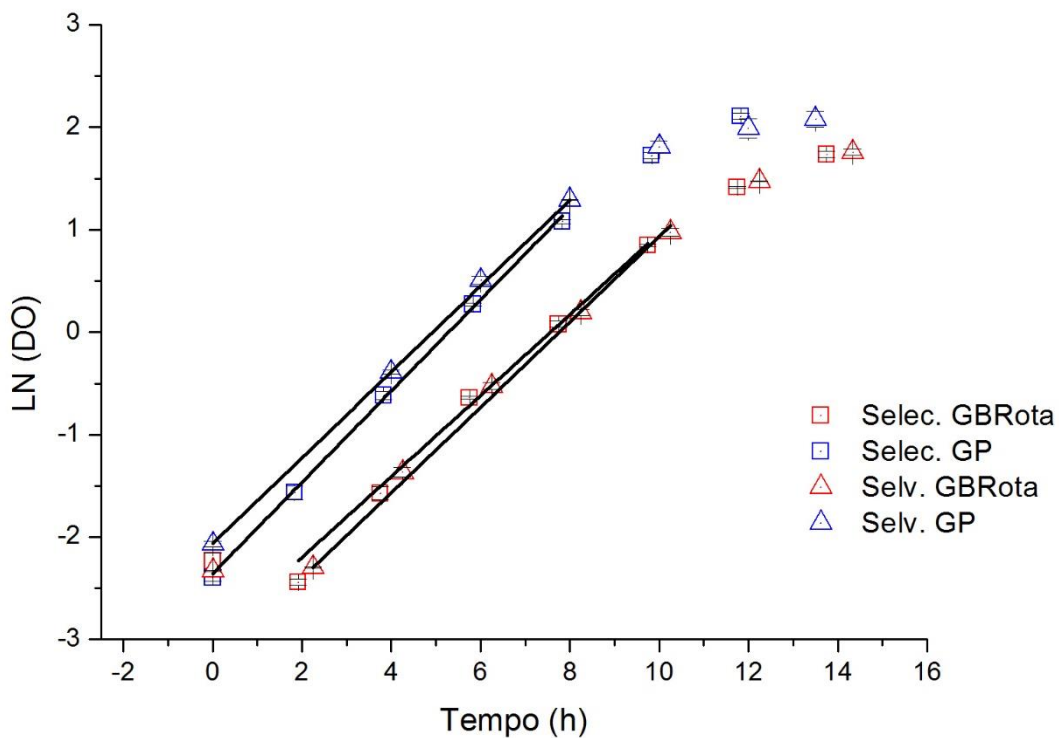


Figura 18 - Curva logarítmica de crescimento celular das linhagens selvagem e selecionada em cultivo em shaker com meio definido usando GP ou GBRota. pH: 6,3, T: 37°C, 300 rpm. A barra de erro é referente às duplicatas.



A partir dos dados de crescimento e da Equação 10, construiu-se a figura 18 para estimar a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para cada cultivo. Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos por regressão linear estão resumidos na tabela 14.

Tabela 14 - Valores de $\mu_{\text{máx}}$ para cada condição

Microrganismo	Tipo de glicerol	$\mu_{\text{máx}}$
Selvagem	GP	0,414±0,008
	GBRota	0,405±0,008
Selecionada	GP	0,447±0,006
	GBRota	0,42±0,01

Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram pouco influenciados pelas linhagens ou pela composição dos meios. Pode-se assim concluir que a linhagem selecionada não possui características diferenciadas em relação à linhagem selvagem. Esses resultados podem ser atribuídos à baixa concentração das impurezas no meio devido à diluição do GBRota para preparação do meio na concentração desejada. Assim, a fase de adaptação no início do cultivo parece ter sido suficiente para as células se ajustarem às condições que inicialmente apresentam-se como desfavoráveis. Além disso, a estratégia de seleção empregada pode ter sido pouco eficiente. Na continuidade do trabalho foram adotadas metodologias de adaptação evolutiva da linhagem selvagem visando obter linhagens com as características desejadas.

4.3 Evolução adaptativa para *E. coli* – UMinho

Com base nos trabalhos apresentados nos itens 2.4 e 2.4.1, adotou-se a metodologia de evolução adaptativa, que consiste em impor uma pressão seletiva sobre a linhagem selvagem como estratégia para obter uma linhagem evoluída, mais adaptada às impurezas presentes no meio contendo o GBRota e consequentemente, apresentando maior velocidade de crescimento na presença do resíduo. A metodologia foi aplicada utilizando a *E. coli* – UMinho e técnicas de transferências sucessivas descritas nos trabalhos de Hu e Wood (2010), Fong e colaboradores (2005), Kwon e colaboradores (2011), Atsumi e colaboradores (2010), Wang e colaboradores (2010), Lee e Palsson (2010). Na maioria dos trabalhos as transferências ocorreriam na fase exponencial de crescimento. Neste trabalho, além das

transferências sucessivas na fase exponencial, também avaliou-se a evolução da linhagem com transferências sucessivas na fase estacionária.

Para as 5 primeiras condições estudadas, a concentração de glicerol no meio de cultivo foi mantida em aproximadamente 20 g/L. Os experimentos foram iniciados com um cultivo em meio definido contendo glicerol puro e as transferências sucessivas foram realizadas para meios gradualmente enriquecidos com o resíduo, até termos somente o GBRota diluído na concentração de aproximadamente 20 g/L. Na 6ª condição, o meio foi preparado com maior concentração de GBRota, levando a uma concentração inicial de glicerol de aproximadamente 30 g/L. E, por fim, na 7ª condição, o GBRota foi submetido a uma diluição mínima para preparar um meio com aproximadamente 60 g/L de glicerol. A tabela 15 resume os principais detalhes do cultivo.

Tabela 15 - Experimentos de adaptação evolutiva com *E. coli* - UMinho

Condição	Concentração inicial de glicerol (g/L)	Concentração inicial de etanol (g/L)	Proporção (%)		GBRota usado	Diluição GBRota
			GP	GBRota		
1	19,97	0	100	0	--	--
2	21,18	0,645	75	25		15
3	17,92	1,019	50	50	7	7,5
4	20,56	1,852	25	75		5
5	17,61	1,835	0	100		3,75
6	29,21	2,872	0	100	8	2,43
7	59,58	6,31	0	100		1,19
Repetição 7	60,44	11,3	0	100	9	1,26

A estratégia adotada para a sequência de experimentos de evolução adaptativa baseia-se na exposição a concentrações gradualmente crescentes de possíveis inibidores do crescimento por um número mínimo de gerações, de forma a se obter uma população homogênea, constituída predominantemente pelas células evoluídas, ao final de cada condição estudada.

4.3.1 Evolução adaptativa: transferências sucessivas na fase exponencial

O cultivo inicial, condição 1, apresentou um $\mu_{\text{máx}}$ de $0,470 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$, sendo este resultado tomado como referência para avaliar a evolução da linhagem adaptada obtida ao final da última condição.

A Figura 19 apresenta o crescimento da *E. coli* na condição 2 durante a fase exponencial. Pode-se observar o comportamento linear e homogêneo em relação a todos os frascos. A Figura 20 apresenta o registro dos valores de $\mu_{\text{máx}}$ estimado para cada cultivo, sendo a última coluna o valor médio de $\mu_{\text{máx}}$ para esta condição. A velocidade específica máxima de crescimento oscila ao longo dos cultivos sucessivos, sendo o menor valor encontrado ($0,469 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$, cultivo 12), similar ao valor obtido no cultivo da linhagem selvagem em meio contendo somente GP. Para esta condição o $\mu_{\text{máx}}$ médio encontrado foi de $0,54 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ e o número total de gerações foi 107.

Figura 19 - Crescimento *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 2. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm

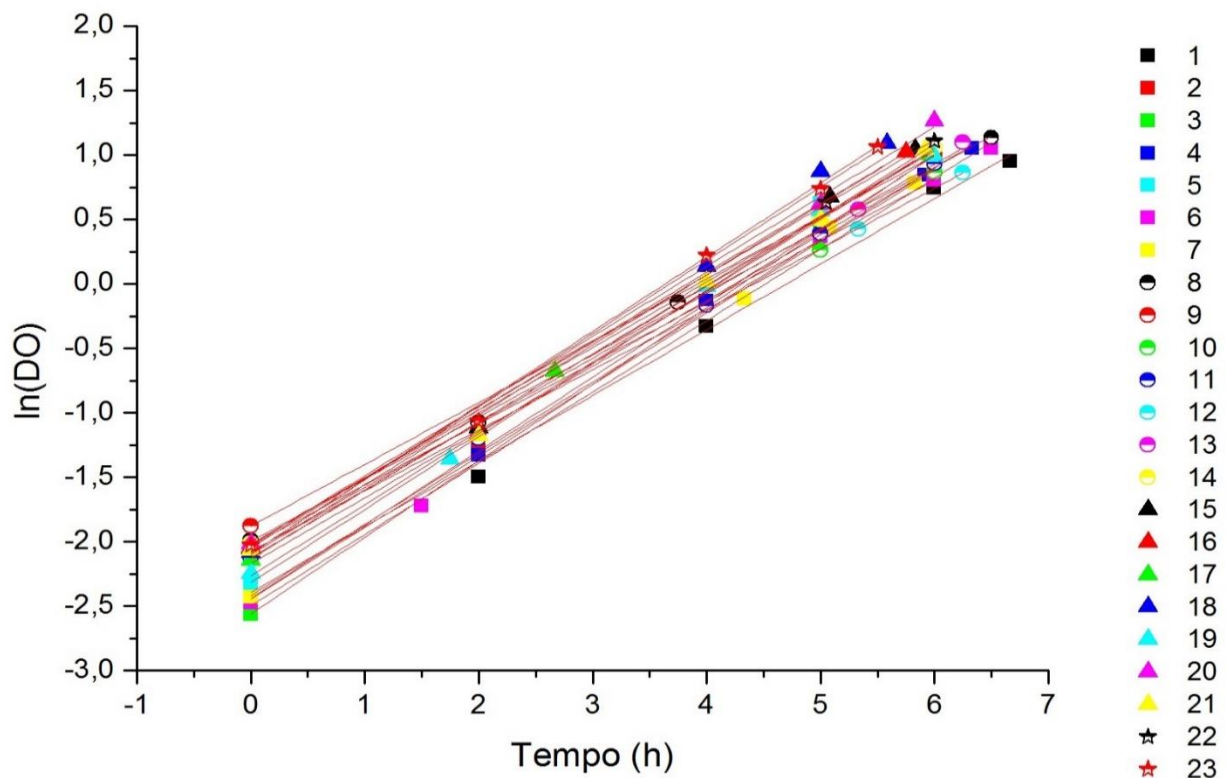
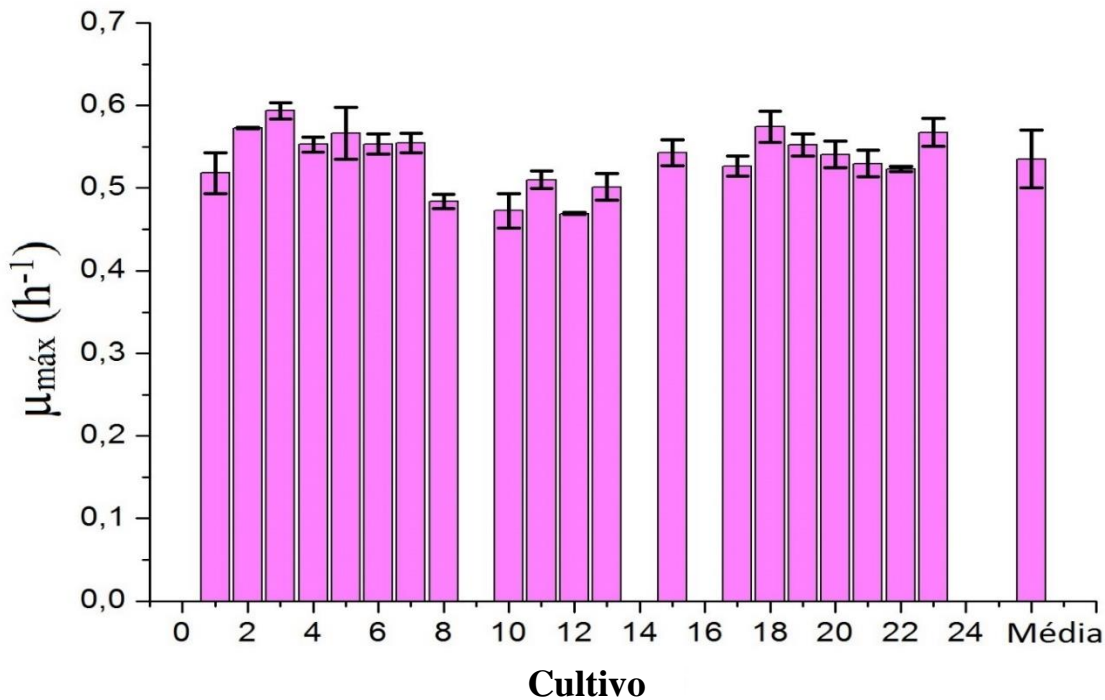
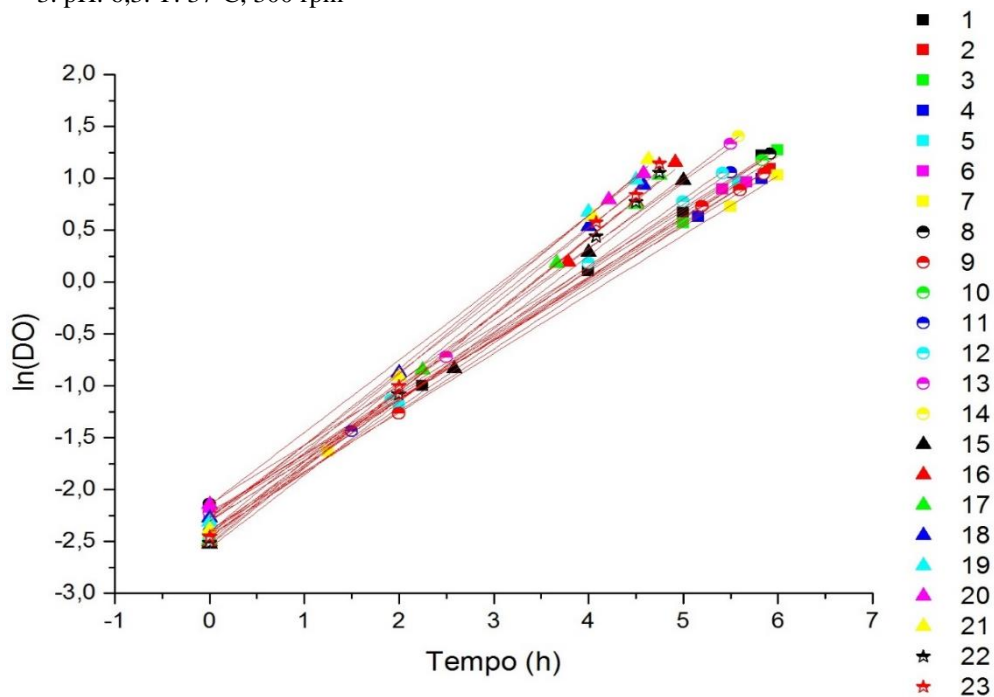


Figura 20 - Velocidade específica máxima de crescimento celular *E. coli* – UMinho, FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 2. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos 9,14,16: não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$.



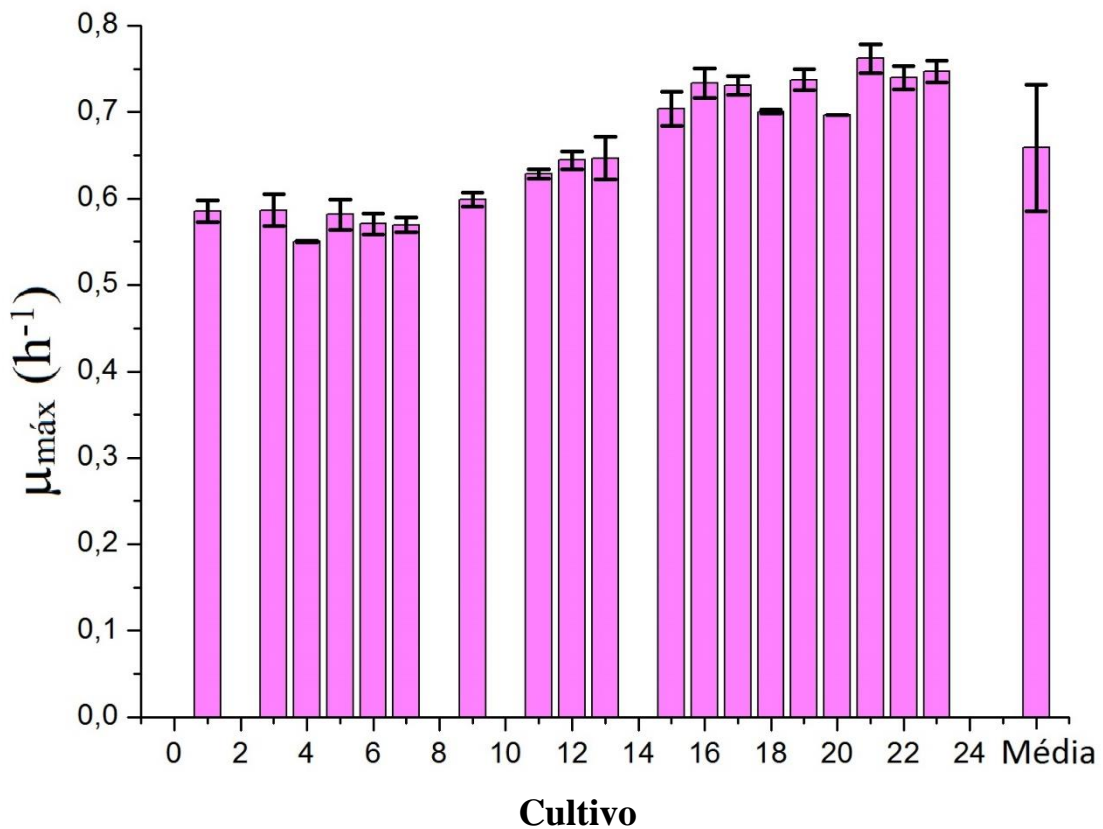
Na condição 3 observa-se pela Figura 21 a diminuição do tempo de cultivo a partir do 15º cultivo sucessivo dessa condição, indicando um aumento da velocidade máxima de crescimento, o que indica que o microrganismo está se adaptando ao meio.

Figura 21 - Crescimento *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 3. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm



A Figura 22, onde são apresentados os valores de $\mu_{\text{máx}}$ em cada cultivo, reforça a constatação sobre o aumento da velocidade de crescimento. O valor de $\mu_{\text{máx}}$ médio dessa condição $0,66 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$, levando a um número de 117 gerações.

Figura 22 - Velocidade específica máxima de crescimento celular *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 3. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Frascos: 2,8,10,14 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$.



Na condição 4, o meio contém GBRota em concentração 3 vezes superior à empregada na condição 2. Conseqüentemente, a presença dos contaminantes também aumentou gradualmente e, como visto na Figura 23, a *E. coli* respondeu à estratégia de adaptação, apresentando alta homogeneidade nos cultivos sucessivos realizados nesta condição. Na Figura 24 é possível perceber que o $\mu_{\text{máx}}$ sofreu pequenas variações ao longo da sequência de cultivos, apresentando resultados superiores aos observados na condição anterior, o que sugere a evolução do microrganismo e a estabilização da população. O valor médio de $\mu_{\text{máx}}$ nessa condição foi de $0,73 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, correspondendo a 113 gerações.

Figura 23 - Crescimento *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 4. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm

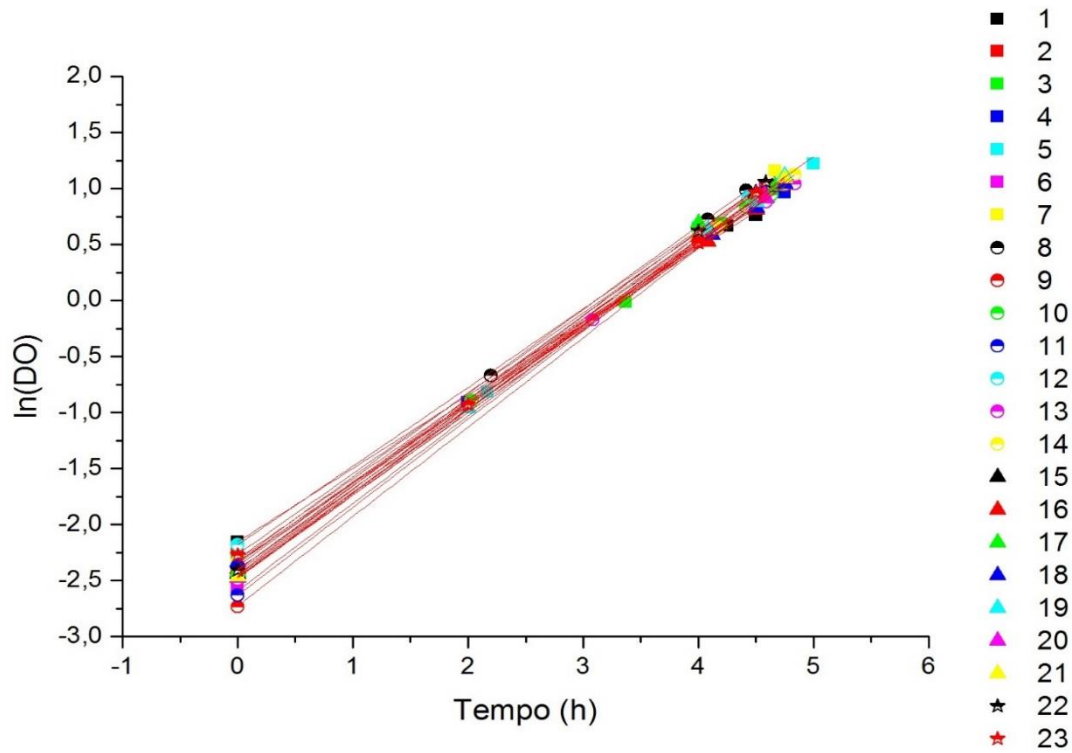
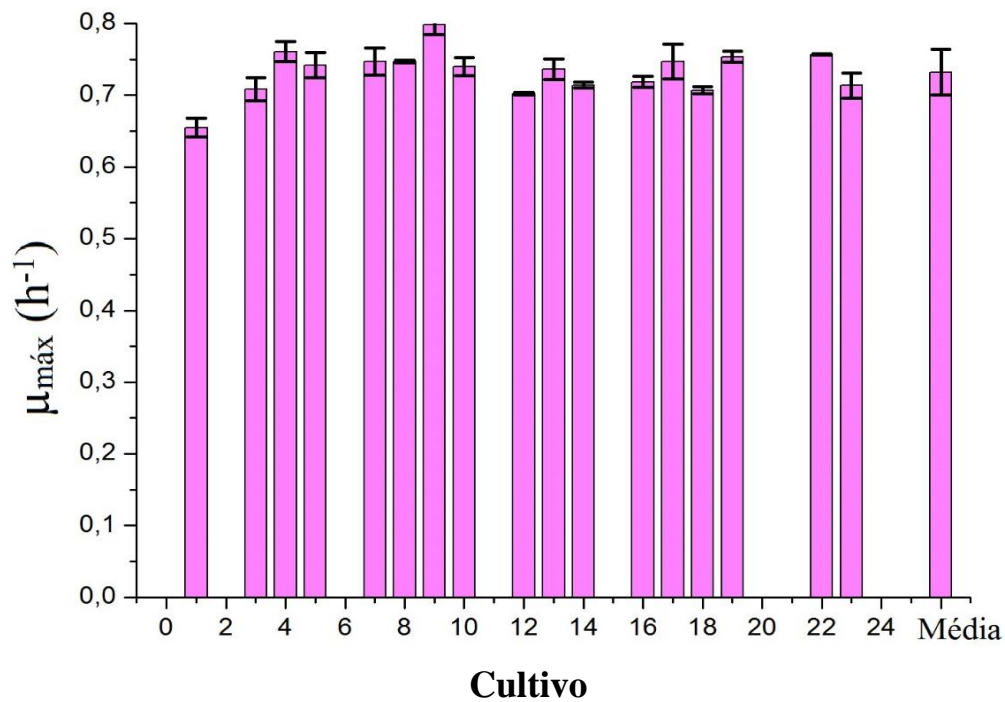
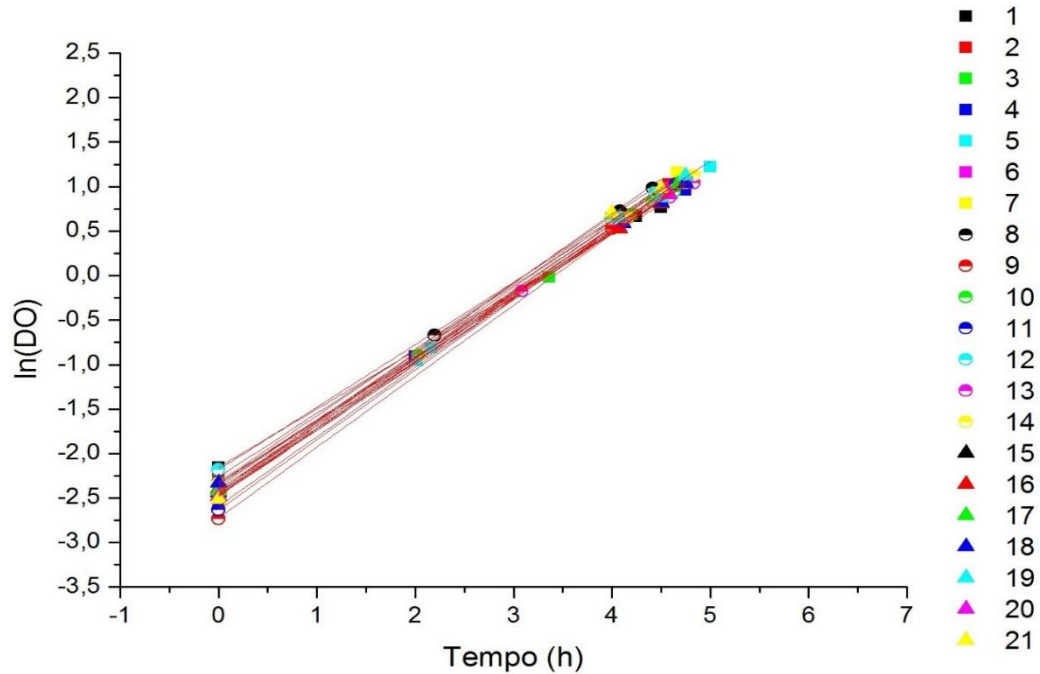


Figura 24 - Velocidade específica máxima de crescimento celular *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 4. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 2, 6, 11, 15, 20, 21 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$



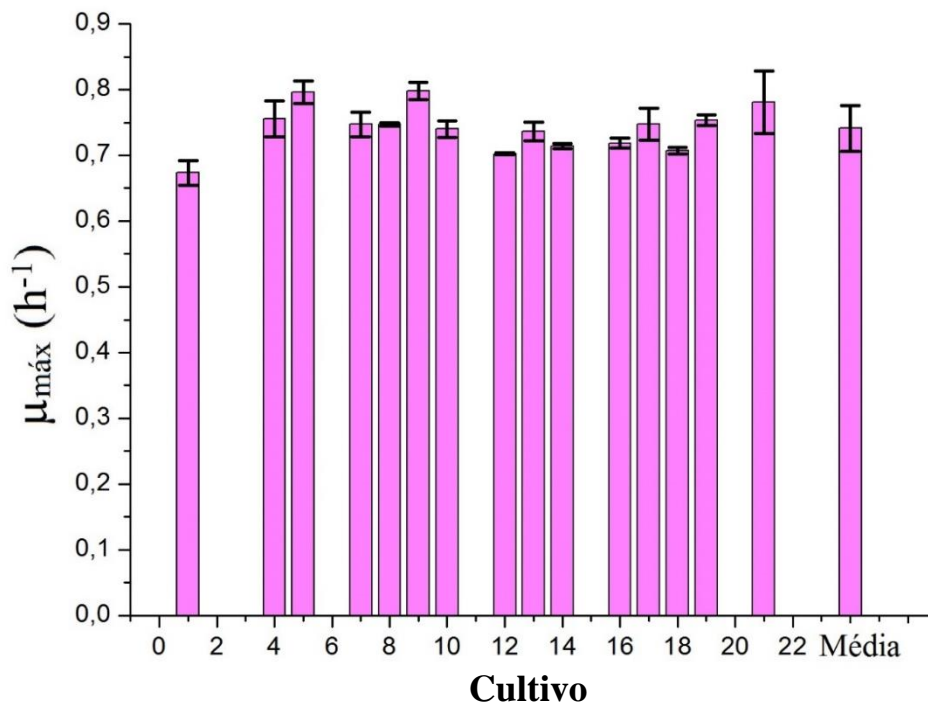
Os resultados apresentados na condição 5 consolidam as observações anteriores sobre a estabilidade e adaptação da população ao resíduo, conforme mostra a Figura 25.

Figura 25 - Crescimento *E. coli* – UMinho – Fexp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 5. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 22, 23: apresentavam pontos insuficientes para plotar o gráfico



Na Figura 26 apresenta-se todos os valores de $\mu_{\text{máx}}$ para essa condição, bem como a média da velocidade máxima de crescimento, $0,74 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$. Foram cultivadas 120 gerações.

Figura 26 - Velocidade específica máxima de crescimento celular *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 5. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 2, 3, 6, 11, 15, 20, 22, 23 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$.



A 6ª condição foi conduzida em concentração de glicerol mais alta (~30 g/L), o qual foi proveniente apenas do GBRota. A determinação da DO_{600nm} nesse meio foi feita conforme o item 3.6.4, usando a Equação 22. Com o aumento da concentração de glicerol bruto, as células foram expostas a uma concentração de impurezas, sais e etanol residual proporcionalmente mais elevada. Analisando os resultados apresentados na Figura 27 percebe-se que as células dos primeiros cultivos sentiram o aumento da concentração de resíduo no meio. Observou-se a ocorrência de uma fase de adaptação com início da fase exponencial apresentando um atraso de 2 a 3 horas. Na Figura 28 nota-se que os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ se apresentavam maiores nos cultivos iniciais devido à presença de células com alta viabilidade vindo da condição anterior. Entretanto nos cultivos seguintes, a viabilidade das células foi provavelmente afetada pela exposição prolongada às impurezas em concentração mais alta, levando à diminuição do $\mu_{m\acute{a}x}$. É importante destacar também que a correção da DO do meio pelo modelo do decaimento exponencial (Eq. 22) introduz imprecisões principalmente nas medidas de DO do início dos cultivos (leituras sem diluição), com reflexo na estimativa do $\mu_{m\acute{a}x}$. O valor médio do $\mu_{m\acute{a}x}$ encontrado para a condição 6 foi de $0,60 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$, resultado que apesar de ser inferior ao da condição anterior, ainda é superior ao da condição de referência. Na condição 6 foram obtidas 75 gerações de células.

Figura 27 - Crescimento *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 6. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 1, 5, 7, 15 apresentavam pontos insuficientes para plotar o gráfico

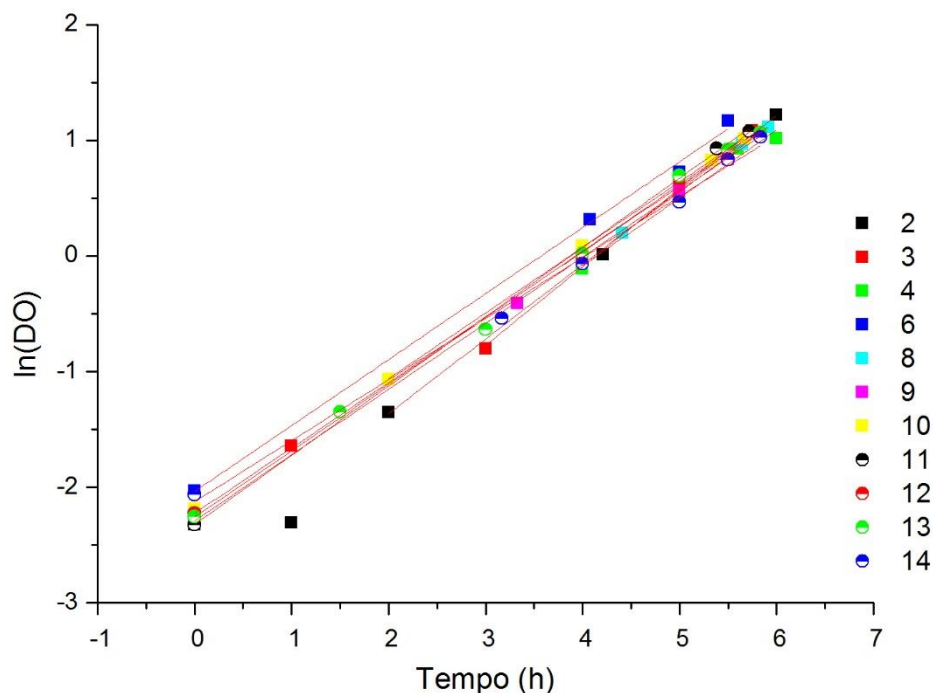
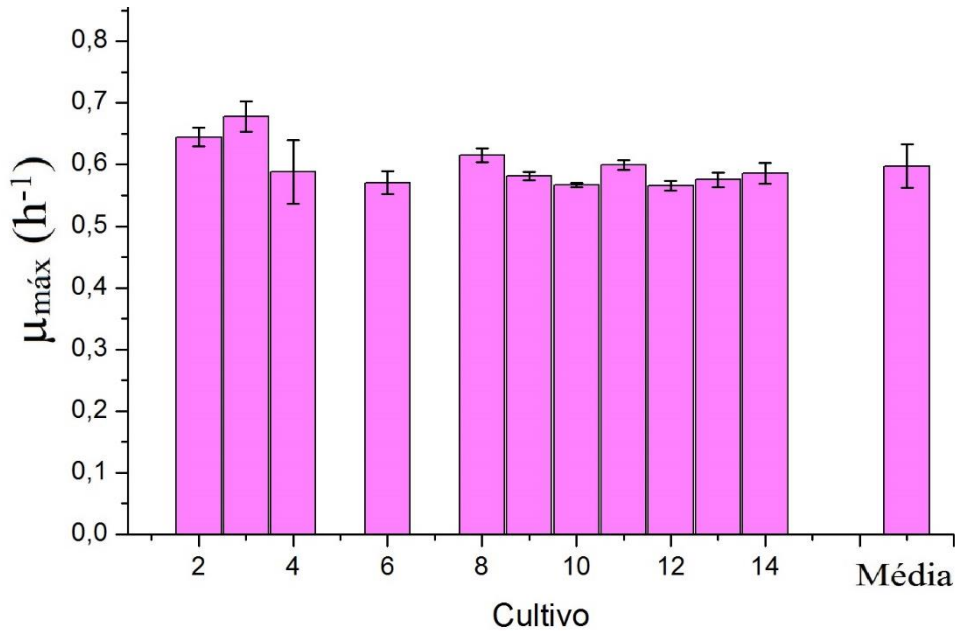


Figura 28 - Velocidade específica máxima de crescimento celular *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 6. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 1, 5, 7, 15 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$



A Figura 29 mostra o perfil de crescimento na fase exponencial da última condição estudada. Nesta etapa a concentração do glicerol foi dobrada e o GBRota diluído apenas 1,19 vezes. A determinação da $\text{DO}_{600\text{nm}}$ nesse meio foi feita conforme o item 3.6.4, usando a Equação 23. É possível notar que para os 2 primeiros cultivos, o crescimento exponencial da *E. coli* se inicia após 4,5 horas de incubação, caracterizando uma fase *lag* muito longa. A partir do terceiro cultivo, há um crescimento mais homogêneo sem fase *lag*. Analisando os valores de $\mu_{\text{máx}}$ mostrados na Figura 30, nota-se que houve uma queda significativa em relação às condições anteriores, com valor médio de $0,39 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$, correspondendo a 52 gerações. Conforme comentado para a condição 6, a correção da DO do meio pelo modelo do decaimento exponencial (Eq. 23) introduz imprecisões principalmente nas medidas de DO do início dos cultivos (leituras sem diluição), com reflexo na estimativa do $\mu_{\text{máx}}$, o que explica as oscilações presentes na Figura 30.

Figura 29 - Crescimento *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 7. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 4, 7, 12, 13 apresentavam pontos insuficientes para plotar o gráfico

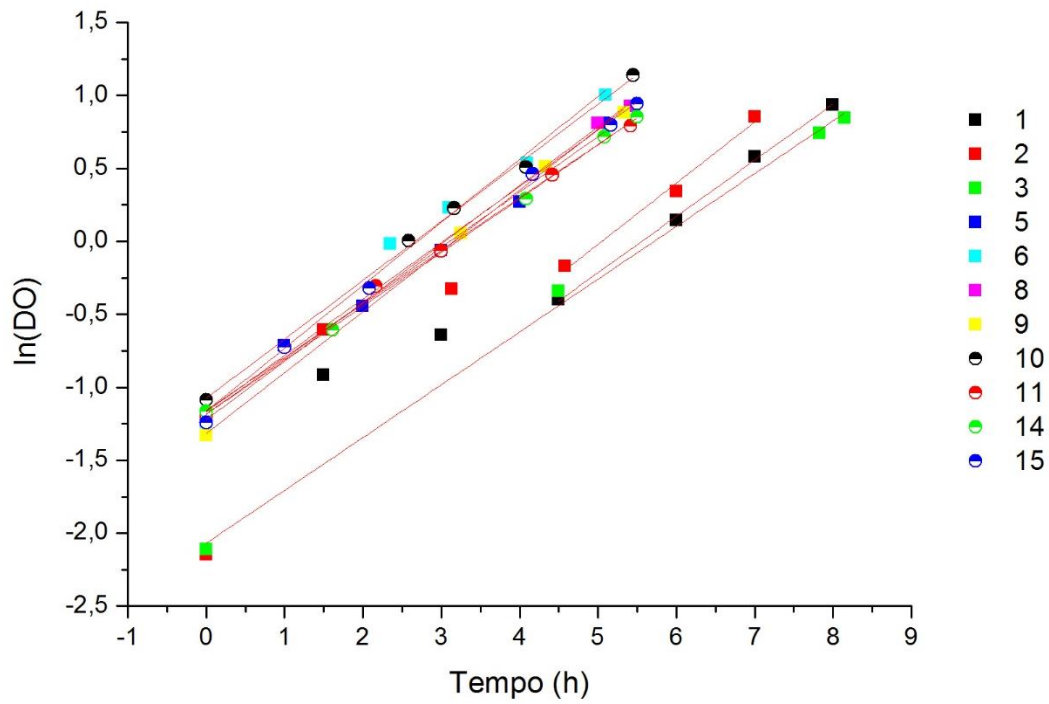
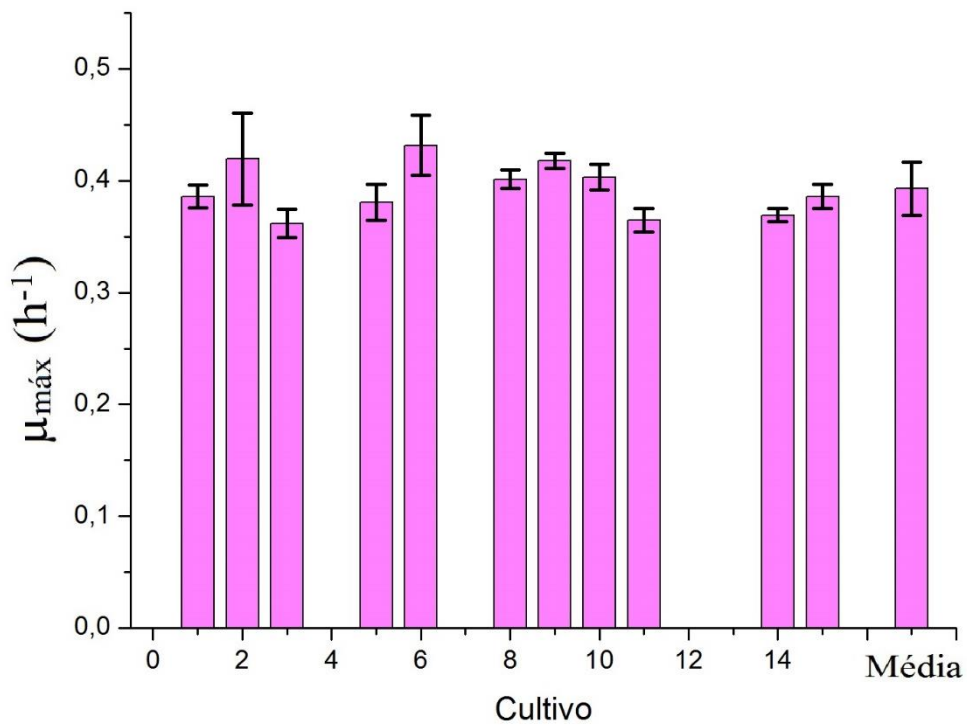


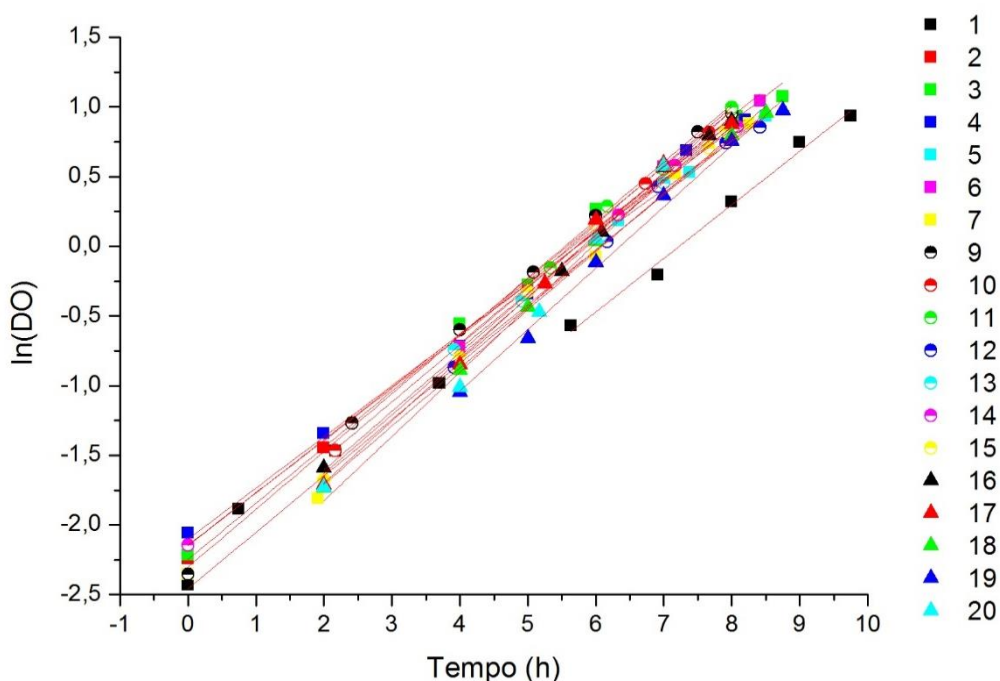
Figura 30 -Velocidade específica máxima de crescimento celular *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva condição 7. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivos: 4, 7, 12, 13 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$



Os resultados mostrados nas Figuras 29 e 30 sugerem que a estratégia de evolução adaptativa não foi bem sucedida na adaptação das células ao resíduo mais concentrado. Para confirmar (ou não) esse resultado, a estratégia de adaptação para a condição 7 foi repetida a partir do criotubo contendo as células adaptadas na condição 5, adotando a mesma metodologia descrita no item 3.5.3.1, porém foram utilizados 20 frascos de cultivo. O GBROta utilizado nesse cultivo foi o 9, com concentração inicial de glicerol de 60,44 g/L e de etanol de 11,3 g/L.

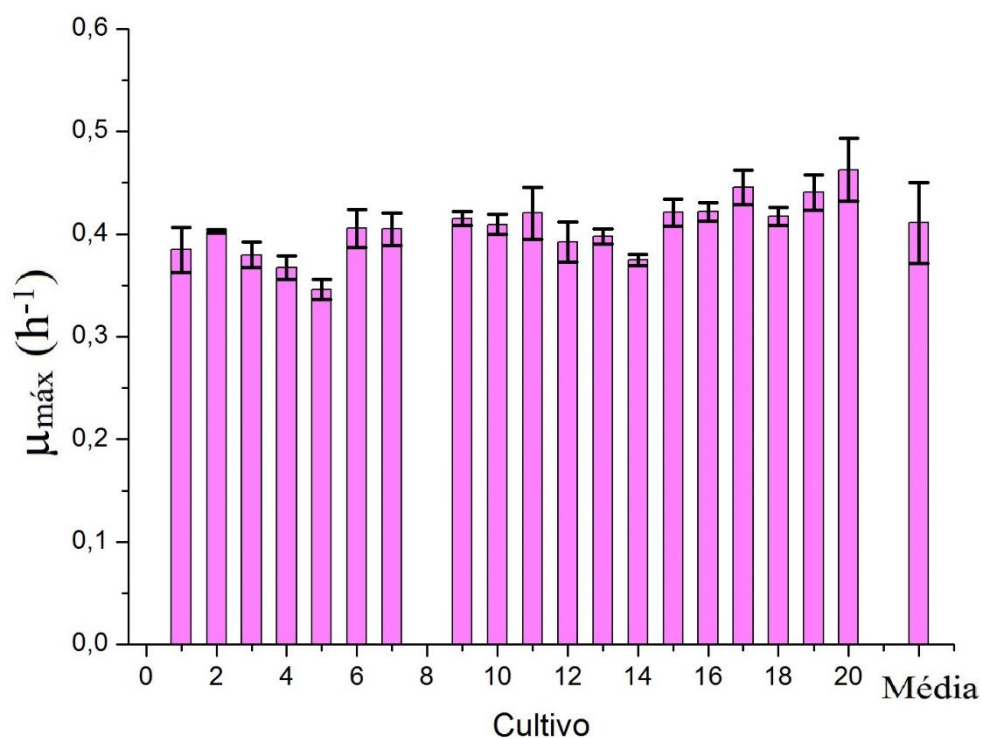
A Figura 31 mostra o crescimento das células. No primeiro cultivo percebe-se que houve uma dificuldade na adaptação, apresentando uma longa fase *lag*, que foi reduzida até sua eliminação nos próximos cultivos, indicando que os microrganismos conseguiram evoluir.

Figura 31 Crescimento *E. coli* – UMinho – Fexp. Estratégia de adaptação evolutiva repetição da condição 7. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivo: 8 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$



Como mostra a Figura 32, o $\mu_{\text{máx}}$ médio de $0,41 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, é estatisticamente semelhante ao obtido a partir dos dados apresentados na Figura 30 e ligeiramente inferior ao $\mu_{\text{máx}}$ de referência alcançado no primeiro cultivo em glicerol puro ($0,47 \text{ h}^{-1}$). Constatase, portanto, que as células evoluíram (o que explica o desaparecimento da fase lag nos 2 experimentos da condição 7), mas não conseguiram se adaptar ao elevado teor de impurezas presentes no GBROta a 60 g/L.

Figura 32 - Velocidade específica máxima de crescimento celular *E. coli* – UMinho - FExp. Estratégia de adaptação evolutiva repetição condição 7. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. Cultivo: 8 não foi possível quantificar $\mu_{\text{máx}}$



Ou seja, as altas velocidades de crescimento observadas na condição 6 e anteriores não foram alcançadas na condição 7 devido à inibição do crescimento pelas impurezas presentes no GBRota. Conforme discutido no item 2.2.1 o GBRota contém sais, etanol e MONG, além de glicerol. Dentre os sais, as maiores concentrações são de K e Na (6,3 e 4,5 g/L, respectivamente). Considerando que o soro fisiológico tem uma concentração de 9 g/L de NaCl (correspondendo a 3,5 g/L de Na), é pouco provável que as concentrações de K e Na presentes no GBRota sejam inibitórias. Da mesma forma, uma provável inibição por etanol também pode ser descartada, pois na repetição, a concentração de etanol presente no GBRota 9 foi quase o dobro da concentração presente no primeiro experimento de adaptação a 60 g/L, realizado com o GBRota 8 (Tabela 15). Apesar da grande variação na concentração de etanol, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ tiveram pouca variação. Esta análise sugere que o MONG seria o principal componente do GBRota com papel de inibidor devido à sua alta concentração. Porém, um outro fator que precisa ser investigado é a possibilidade de inibição pelo próprio glicerol na concentração de 60 g/L.

Os cultivos em shaker descritos no item 3.5.3.2, cujos resultados são discutidos no item 4.3.3, foram conduzidos para caracterizar as linhagens selvagem e evoluída assim como

para tentar identificar se a causa do desempenho inferior da condição 7 está associada a uma possível inibição por substrato ou pelas impurezas.

4.3.2 Estratégia de evolução adaptativa: transferências na fase estacionária

Os cultivos desse experimento ocorreram em paralelo com os da fase exponencial, sendo a condição 1 a mesma para os dois casos. As características de cada condição estão descritas na tabela 15, sendo que para a fase estacionária o processo de adaptação foi só até a 5ª condição. Para o cálculo do $\mu_{\text{máx}}$ são utilizados os valores da fase exponencial, mas a transferência entre os cultivos ocorreu na fase estacionária.

A Figura 33 apresenta o crescimento da *E. coli* na condição 2, e pode-se notar uma semelhança no perfil de crescimento para todos os cultivos que compõem a condição 2.

Na Figura 34 observa-se que os valores de $\mu_{\text{máx}}$ oscilaram ao longo do experimento, apresentando valor médio de $\mu_{\text{máx}}$ para essa condição de $0,47 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$, estatisticamente semelhante ao $\mu_{\text{máx}}$ da linhagem selvagem no glicerol puro e ao $\mu_{\text{máx}}$ médio encontrado para a mesma condição na fase exponencial. Constata-se com esse resultado que a *E. coli* não sofreu nenhuma perda no seu condicionamento, adaptando ao meio com os primeiros sinais de impurezas e sais vindos do GBRota.

Figura 33 - Crescimento *E. coli* – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 2. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 5, 6, 14 não determinado

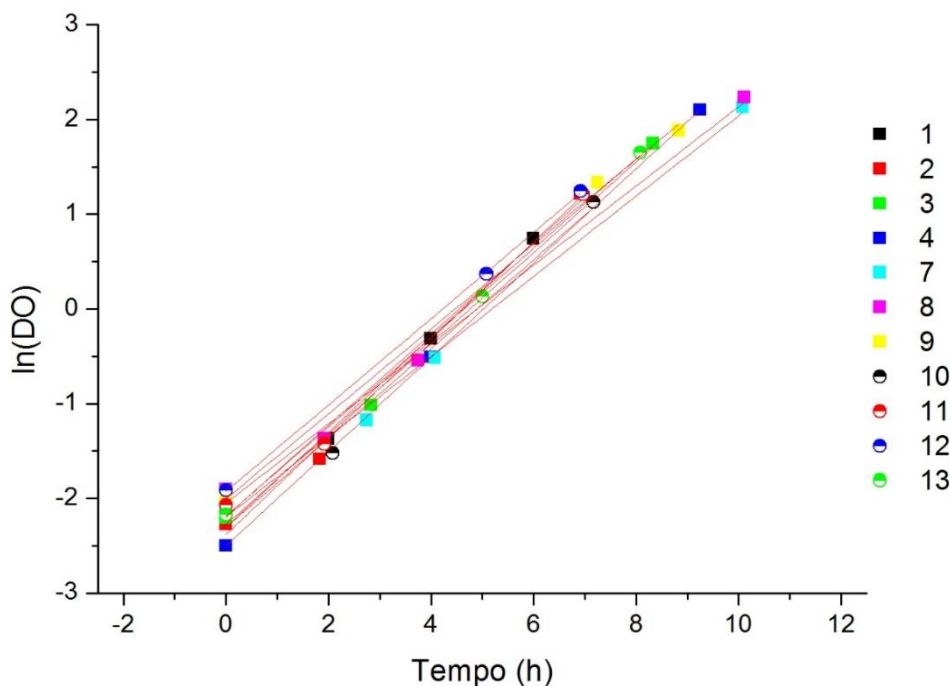
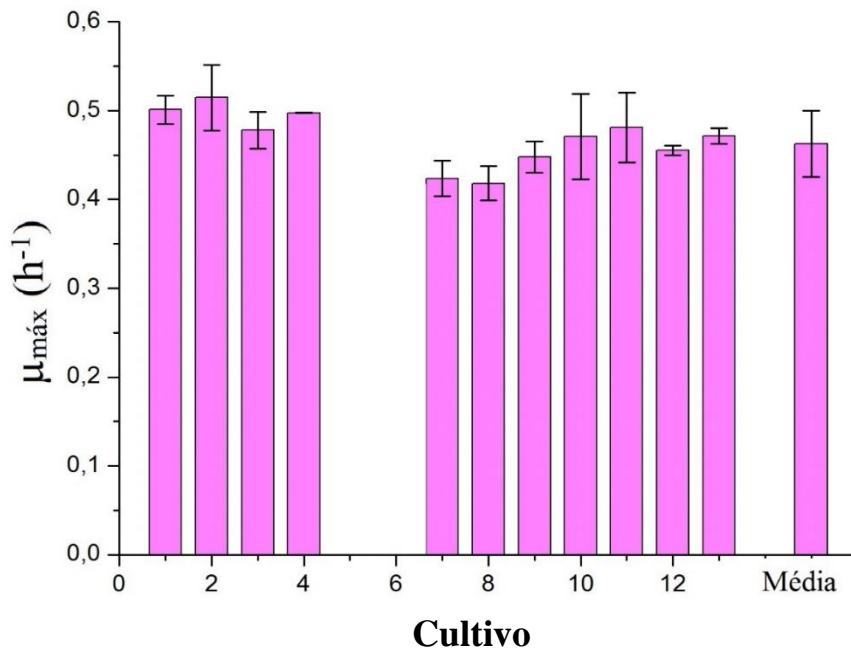


Figura 34 - Velocidade específica máxima de crescimento celular *E. coli* – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 2. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 5, 6, 12 não determinado



Assim como na condição 3 da Fexp, a terceira condição da Fest apresentou uma redução de tempo na fase exponencial de crescimento (Figura 35) indicando que o processo de adaptação ao meio estava ocorrendo. Na figura 36 é possível ver a evolução do $\mu_{\text{máx}}$ a cada transferência. O $\mu_{\text{máx}}$ médio dessa condição foi de $0,62 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$, resultado equivalente ao $\mu_{\text{máx}}$ médio da mesma condição na Fexp.

Figura 35 - Crescimento *E. coli* – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 3. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos: 2, 3, 5, 10 não determinados

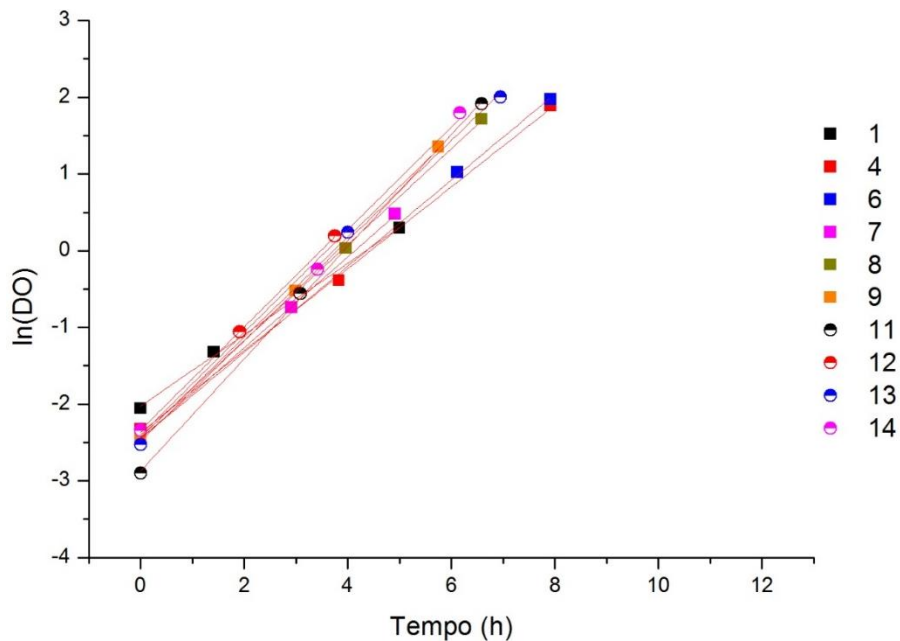
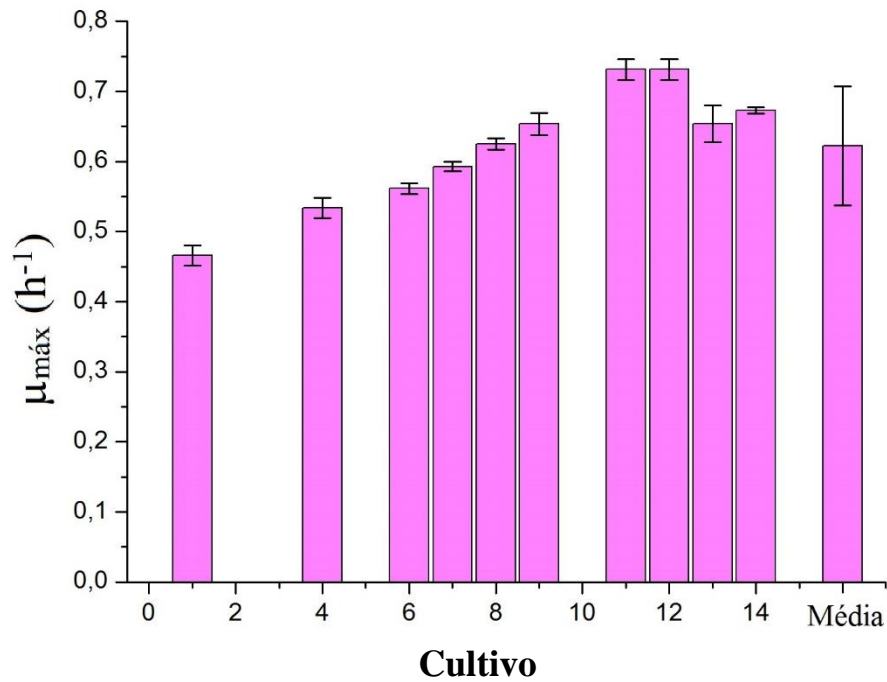


Figura 36 - Velocidade específica máxima de crescimento celular *E. coli* – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 3. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 2, 3, 5, 10 não determinado



Os resultados apresentados na Figura 37 são referentes à condição 4. É possível notar que o perfil de crescimento permanece semelhante em todos os cultivos, seguindo a mesma tendência que a condição 4 da FExp. Apesar das variações do $\mu_{\text{máx}}$ (Figura 38), o valor médio foi de $0,69 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$, ou seja, semelhante ao obtido por transferência na fase exponencial da condição 4 ($0,73 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$).

Figura 37 - Crescimento *E. coli* – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 4. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 13 não determinado

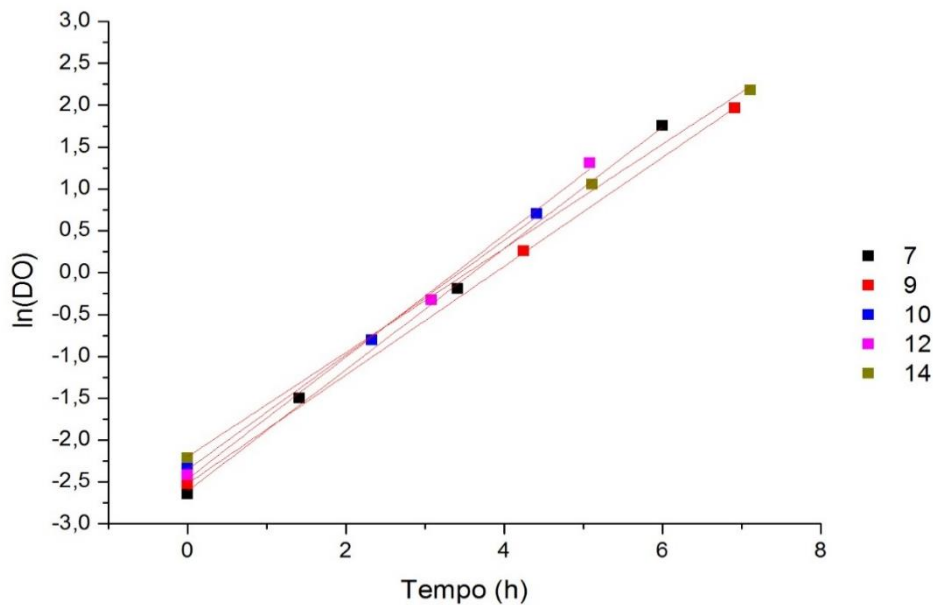
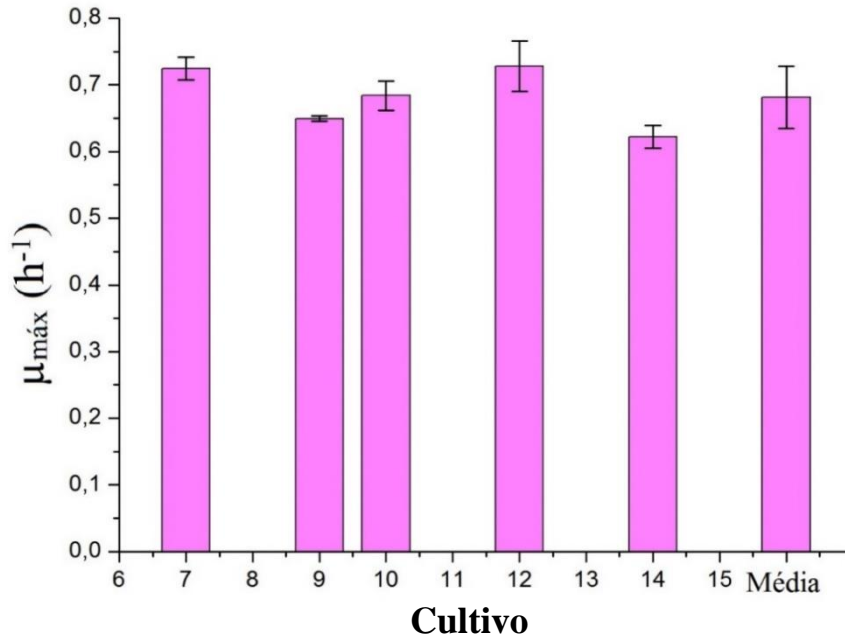


Figura 38 - Velocidade específica máxima de crescimento celular *E. coli* – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 4. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 13 não determinado



A condição 5 foi a última etapa estudada na estratégia de adaptação evolutiva por transferências sucessivas na fase estacionária. Os resultados são apresentados na Figura 39 e mostram que o perfil de crescimento também foi bastante semelhante em todos os cultivos, assim como observado nas condições anteriores. Consequentemente, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ (Figura 40) são similares. A 5ª condição teve o $\mu_{\text{máx}}$ médio igual à $0,66 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$.

Figura 39 - Crescimento *E. coli* – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 5. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 4, 8, 9, 11 não determinado

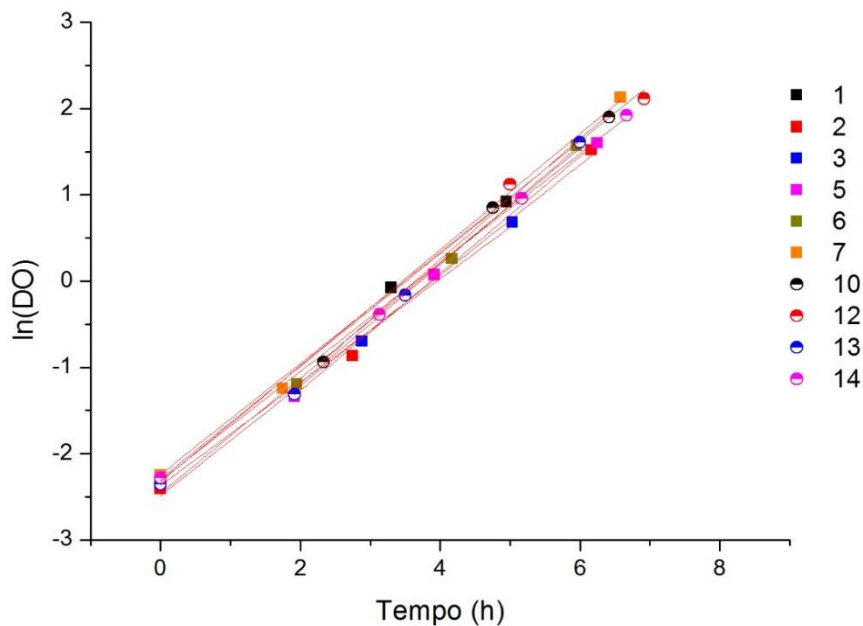
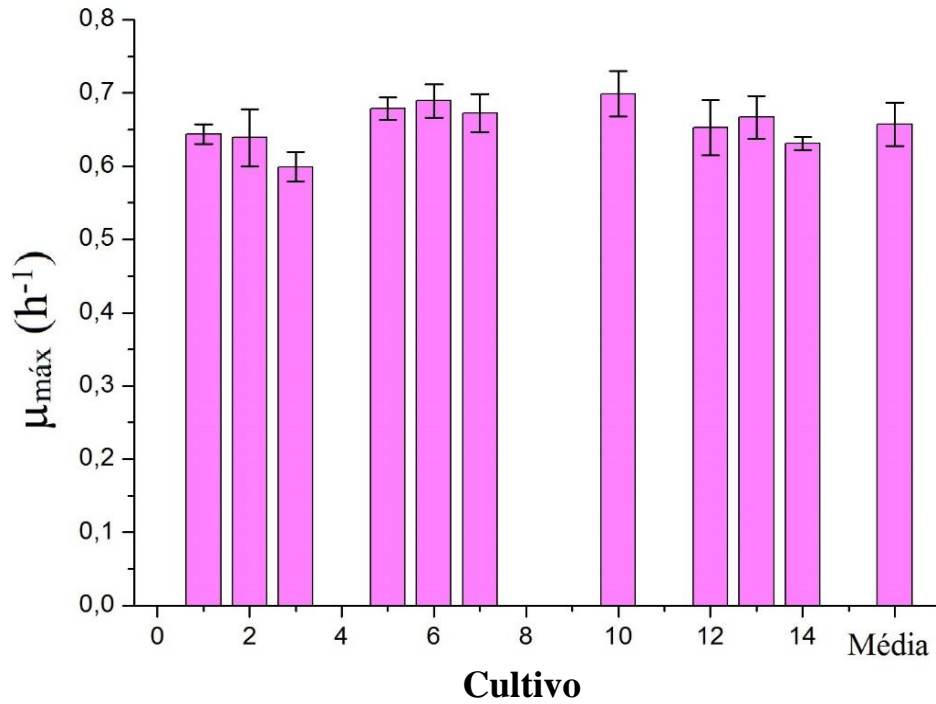
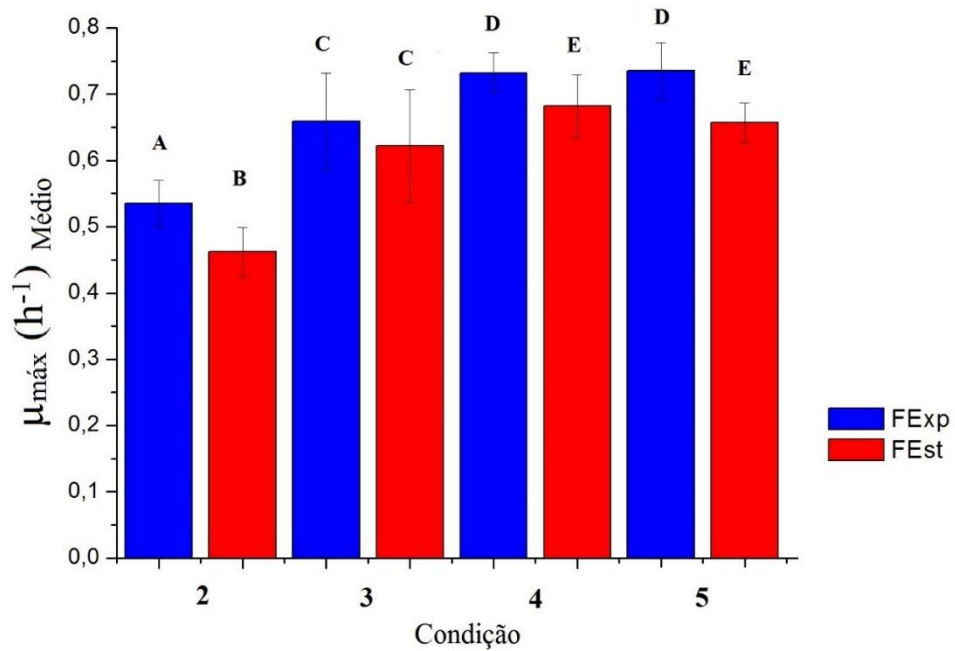


Figura 40 - Crescimento *E. coli* – UMinho - FEst. Estratégia de adaptação evolutiva condição 4. pH: 6,3. T: 37°C, 300 rpm. $\mu_{\text{máx}}$ dos cultivos 4, 8, 9, 11 não determinado



Na Figura 41 são apresentados todos os valores de $\mu_{\text{máx}}$ médio para FExp e FEst.

Figura 41 - Comparativo entre $\mu_{\text{máx}}$ médio da FExp com FEst



Nota: Teste de Tukey: letras iguais indicam resultados estatisticamente semelhantes, letras diferentes resultados estatisticamente diferentes.

A tendência geral observada na Figura 41 é que os valores da velocidade específica de crescimento na fase exponencial dos experimentos FEst são ligeiramente menores do que nos experimentos FExp. Uma análise estatística mais rigorosa, o teste de Tukey, foi realizada e obteve-se como resultado que os valores obtidos nos experimentos FEst e FExp para cada condição são estatisticamente diferentes. Apesar da sua facilidade de ser realizada em comparação com a metodologia convencional, a metodologia de transferência na fase estacionária levou à seleção de células com menor velocidade de crescimento. Por isso, os estudos foram continuados apenas com a metodologia tradicional de transferências sucessivas na fase exponencial.

Os resultados do teste de Tukey também permitem afirmar, comparando as transferências realizadas na fase exponencial, que a população estava estável e adaptada, na condição 5.

4.3.3 Cultivo em shaker com linhagem selvagem e linhagem evoluída - E. coli - UMinho

Os cultivos complementares em shaker foram divididos em 4 conjuntos e tiveram como objetivos caracterizar as linhagens e investigar possível inibição por substrato e/ou sais, conforme esquema apresentado na tabela 8 e Figura 11.

Para os conjuntos A-1, A-2 e A-4 foi utilizado o GBRota 8, apresentando uma diluição de 2 vezes. Para o cultivo A-1 com concentração 60 g/L, o meio foi preparado para 40 g/L e suplementado para 60 g/L com glicerol PA. A tabela 16, resume os $\mu_{\text{máx}}$ encontrados em cada cultivo.

Nos cultivos A-1 e A-2 com concentração de glicerol de 39 g/L a medida de DO foi corrigida conforme item 3.6.4 usando a Equação 22. E no cultivo A-1 com concentração de 54 g/L foi usada a Equação 23.

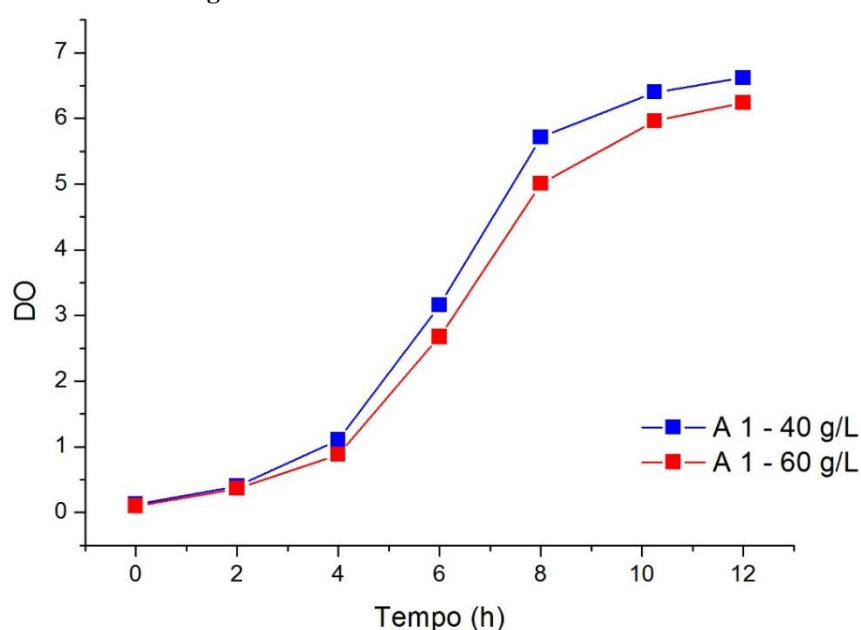
O conjunto A-1 (Figura 42) foi avaliado o crescimento da linhagem evoluída em meio contendo apenas o GBRota como fonte de carbono nas concentrações de 39 g/L e 54 g/L.

O cultivo conduzido na concentração 39 g/L tinha como objetivo caracterizar a linhagem obtida ao final dos cultivos sucessivos na condição 6 do experimento de adaptação. O valor do $\mu_{\text{máx}}$ encontrado nessa condição foi de $0,515 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$, 13,7% inferior ao apresentado pela linhagem evoluída durante os cultivos na condição 6, (média dos valores de $\mu_{\text{máx}}$ $0,60 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$). Novamente ressalta-se que essa diferença entre os valores obtidos nos diferentes experimentos pode estar relacionada à correção da DO do meio pelas mesmas razões já mencionadas anteriormente.

Tabela 16 - Valores de $\mu_{\text{máx}}$ encontrados nos cultivos em shaker com *E. coli* - UMinho

Conjunto	Condição – Concentração inicial	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Objetivo
A-1	Meio definido com GBRota – 39,05 g/L	$0,515 \pm 0,005$	Avaliar crescimento da linhagem evoluída no resíduo
	Meio definido com GBRota – 54,4 g/L	$0,50 \pm 0,03$	
A-2	Meio definido com GBRota – 39,05 g/L	$0,341 \pm 0,008$	Avaliar crescimento da linhagem selvagem no resíduo
A-3	Meio definido com GP – 19,56 g/L.	$0,457 \pm 0,009$	Avaliar inibição por substrato da linhagem selvagem.
	Meio definido com GP – 39,25 g/L.	$0,454 \pm 0,009$	
	Meio definido com GP – 59,3 g/L	$0,47 \pm 0,02$	
A-4	Meio definido com GP – 19,56 g/L	$0,63 \pm 0,02$	Avaliar crescimento da linhagem evoluída em meio definido com GP e inibição por substrato e sais
	Meio definido com GP – 39,25 g/L	$0,60 \pm 0,02$	
	Meio definido com GP – 59,3 g/L	$0,60 \pm 0,02$	

O cultivo a 54 g/L teve como objetivo investigar a ocorrência de inibição por substrato para essa concentração de glicerol. O $\mu_{\text{máx}}$ obtido nessa condição foi de $0,50 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, sugerindo que não há ocorrência de inibição por substrato.

Figura 42 - Curva de crescimento - Cultivo A-1

No cultivo A-2, a linhagem selvagem foi exposta sem nenhum processo adaptativo ao GBRota. A Figura 43 mostra o crescimento da linhagem nessa condição. O baixo valor de $\mu_{\text{máx}}$ apresentado pela linhagem selvagem em relação à evoluída demonstra a importância do processo de evolução adaptativa para obter microrganismos capazes de crescer mais rapidamente em condições desfavoráveis. Esse valor de $\mu_{\text{máx}}$ é inferior ao obtido pela linhagem em glicerol puro, cultivo A-3, reforçando a ocorrência de inibição (Figura 44).

Figura 43 - Curva de crescimento - Cultivo A-2

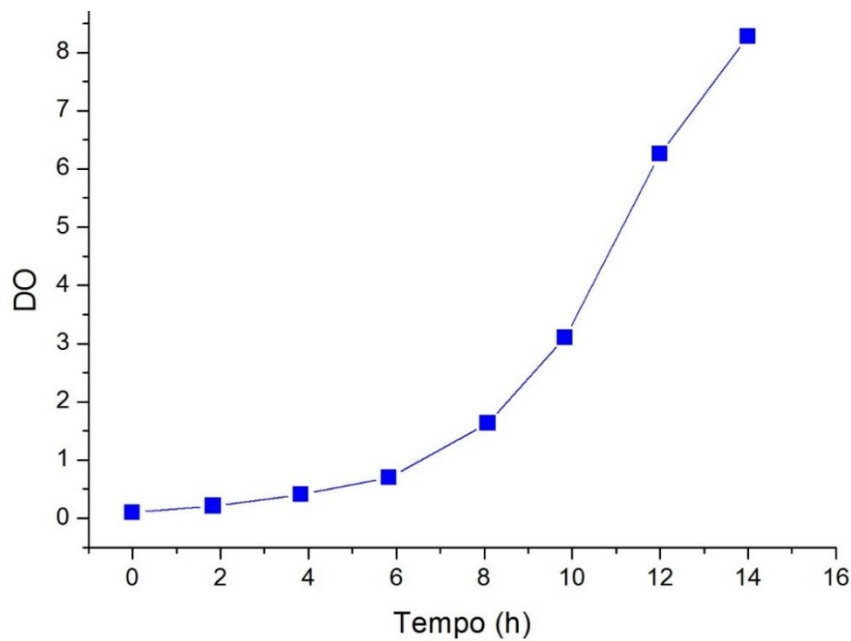
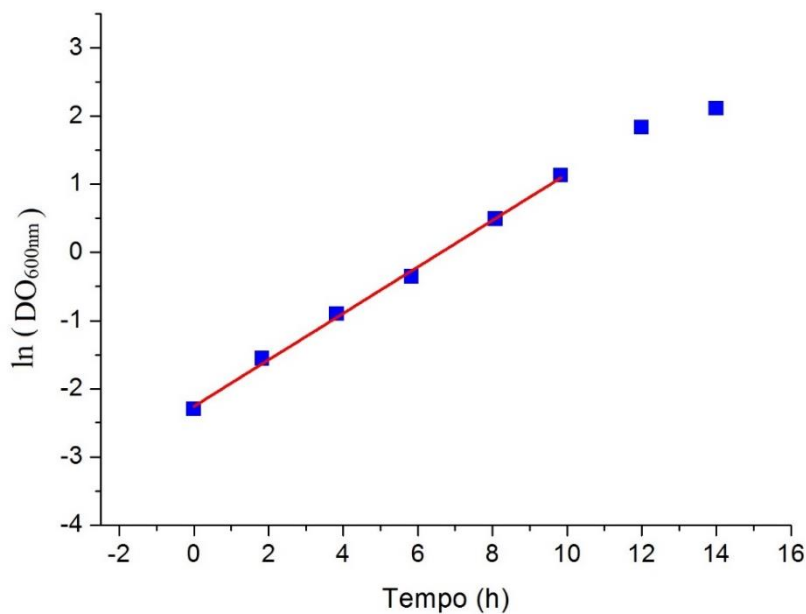
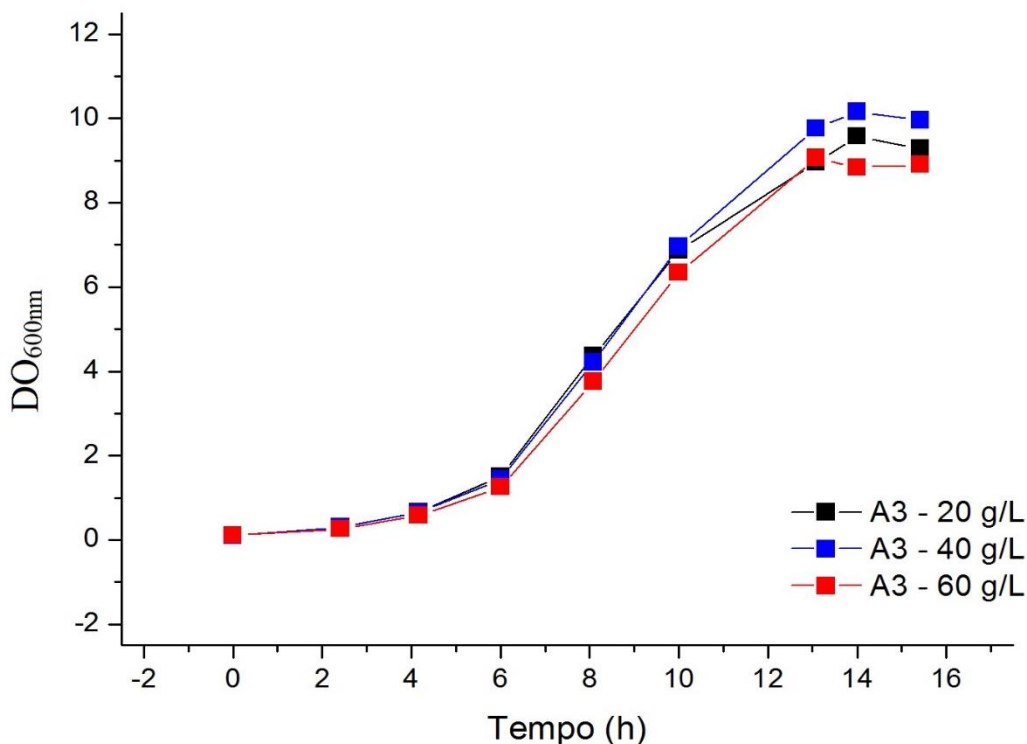


Figura 44 - Perfil logarítmico do crescimento – Cultivo A-2



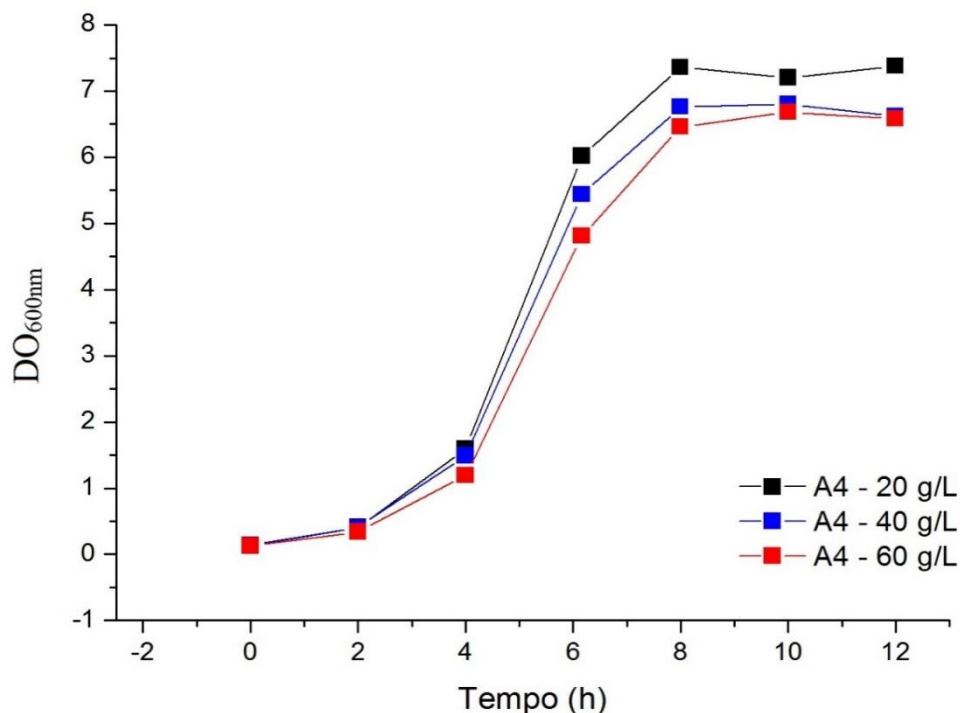
A partir dos resultados obtidos no conjunto de experimentos A-3 pode-se concluir que não houve inibição por substrato. Na tabela 16 observa-se valores de $\mu_{\text{máx}}$ similares para as diferentes concentrações de glicerol. Além disso, os perfis de crescimento nas 3 concentrações de glicerol foram semelhantes, como mostra a Figura 45.

Figura 45 - Curva de crescimento - Cultivo A-3



No conjunto de experimentos A-4 pode-se observar valores de $\mu_{\text{máx}}$ superiores da cepa evoluída em relação aos obtidos para a linhagem selvagem nas mesmas condições (Tabela 16 e Figura 46). Confirma-se também que não ocorre a inibição pelo substrato assim como constatado pelos cultivos A-1, A-2 e A-3. Também verifica-se que há influência da presença das impurezas do GBRota sobre o crescimento, já que os resultados apresentados são superiores aos resultados da mesma faixa de concentração no cultivo A-1 com GBRota.

A partir da análise dos resultados obtidos no conjunto de experimentos A-1 a A-4 constata-se que em nenhuma condição empregada a linhagem evoluída apresentou crescimento similar ao observado ao final do processo de adaptação à condição 6. Por estarmos sempre tratando de populações de células, isso pode estar relacionado à escolha da colônia na placa para dar início aos experimentos ou a alguma degeneração causada pelo congelamento, apesar do curto tempo (23 dias) no qual a suspensão permaneceu congelada. A correção da DO do meio é outra possível explicação para as diferenças.

Figura 46 - Curva de crescimento - Cultivo A-4

A partir dos resultados obtidos nos ensaios complementares, pode-se afirmar com segurança que o desempenho inferior apresentado na condição 7 não está relacionado à inibição por substrato e sim pelos componentes presentes no resíduo, muito provavelmente pelo MONG. Retomando a análise da estratégia de evolução adaptativa, tabela 17, percebe-se que excelentes resultados foram obtidos na sequência de cultivos da condição 1 a condição 5.

Tabela 17 - Resumo dos resultados obtidos na evolução adaptativa

Condição	μ_{\max} (h ⁻¹)	Gerações
1	0,470±0,009	-
2	0,54±0,04	107
3	0,66±0,07	117
4	0,73±0,03	113
5	0,74±0,04	120
6	0,60±0,04	75
7	0,39±0,02	52
Repetição 7	0,41±0,03	96

Nesses experimentos, a exposição das células a concentrações crescentes de impurezas foi realizada ao longo de 457 gerações, para um fator de aumento de concentração de 4 vezes. Já na condição 6, o fator de aumento de concentração foi de 1,5 vezes (em relação à condição 5) num total de 75 gerações e na condição 7, a concentração de GBROta no meio dobrou (em relação à condição 6) e a exposição se deu ao longo de 52 gerações. Tomando como base a estratégia adotada na sequência de cultivos da condição 1 a 5, seria recomendável manter as transferências sucessivas por aproximadamente 170 gerações na condição 6 ($457/4 \times 1,5$) e por 230 gerações na condição 7 ($457/4 \times 2$). Outra alternativa seria conduzir a adaptação evolutiva com aumentos mais graduais na concentração de GBROta, passando de 20 para 30, 40, 50 e 60 g/L, por exemplo, com transferências sucessivas correspondentes a 85 gerações em cada concentração.

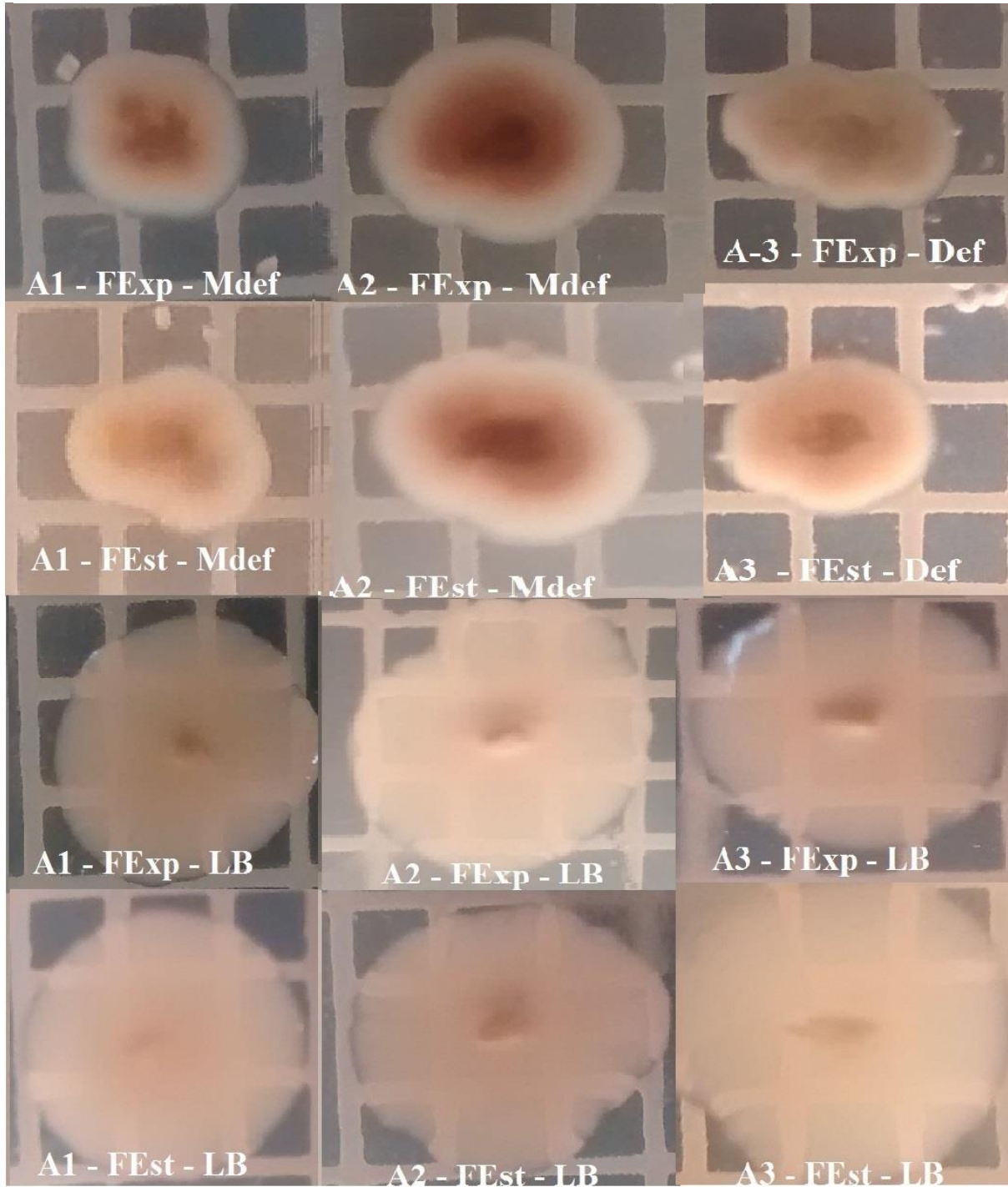
Assim, acredita-se que a adaptação completa à condição 7 dependa apenas da exposição ao resíduo concentrado pelo número suficientemente alto de gerações. Diante da impossibilidade de investir nessa proposta de continuidade devido à falta de tempo, a condição 6 (GBROta ~40 g/L) foi escolhida para os estudos mais detalhados em biorreator por apresentar alto valor de μ_{\max} e concentração de glicerol compatível aos valores geralmente empregados em cultivos em batelada.

4.3.4 Análise de morfologia das colônias

Nos cultivos em shaker A-1, A-2 e A-3, para as concentrações de 40 g/L, foram realizadas as análises de morfologia das colônias em placa com meio LB e em placa com 1,5% ágar contendo o meio de origem do cultivo (definido com GP ou GBROta). O crescimento das colônias foi acompanhado diariamente e registrado em fotos, conforme mostra a Figura 47. As placas em meio LB dos cultivos A-2 e A-3 ficaram incubadas por 3 dias e a do cultivo A-1 por 4 dias. As placas com meio definido ficaram incubadas por 5 dias.

Analisando a figura 47 pode-se ver que as colônias crescidas no meio LB, apesar do menor tempo de incubação, apresentaram tamanho maior e mais homogeneidade em relação às cultivadas em meio definido que, por sua vez, apresentaram um aspecto mais irregular e com um halo mais claro ao redor da colônia. Não foram notadas diferenças em relação à linhagem evoluída comparada à selvagem, nem em relação à fase exponencial com a estacionária.

Figura 47 - Análise de morfologia das colônias *E. coli* - UMinho. A legenda nas fotos corresponde ao cultivo (A1, A2, A3), à fase do crescimento na qual a amostra da suspensão foi plaqueada (FExp, FEst) e ao meio da placa (Def., LB).

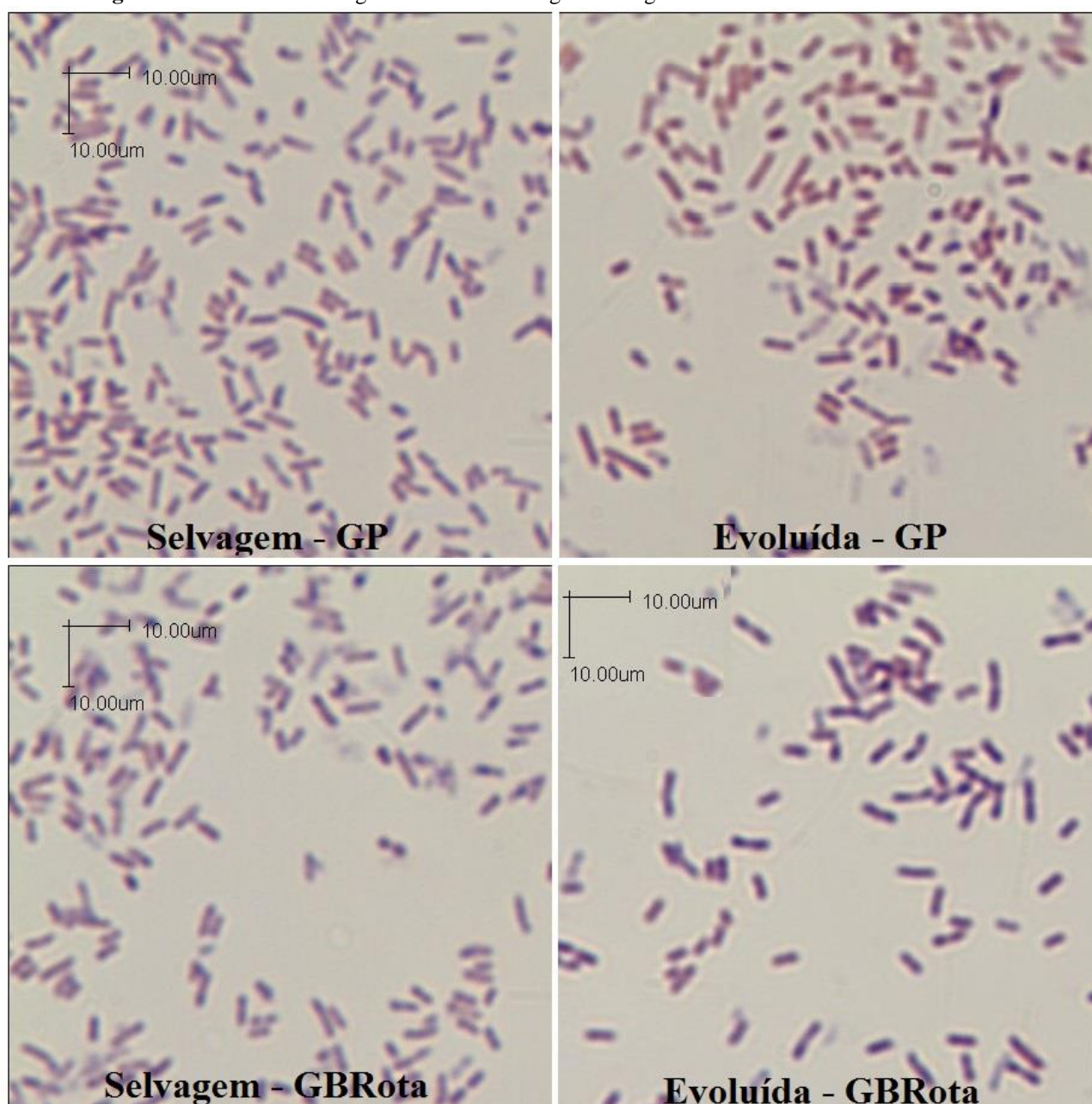


4.3.5 Análise de morfologia celular

A comparação da morfologia celular foi feita para a linhagem selvagem e evoluída, crescidas em placa 1,5% ágar com meio definido usando somente glicerol puro, 40 g/L ou GBRota 40g/L, com 3 dias de incubação. Os registros estão reunidos na Figura 48.

A análise morfológica das imagens não apresenta diferenças significativas entre as células, já que a população de células parece ter tamanho e contorno visualmente semelhantes nas 4 situações.

Figura 48 - Análise morfológica celular das linhagens selvagem e evoluída da *E. coli* - UMinho



4.4 Cultivos em batelada empregando biorreator de bancada

A Tabela 18 resume as concentrações iniciais de glicerol e etanol no início dos cultivos em reator.

Tabela 18 - Concentrações iniciais de glicerol e etanol em cultivos em reator com linhagens selvagem e evoluída usando GBROta como fonte de carbono

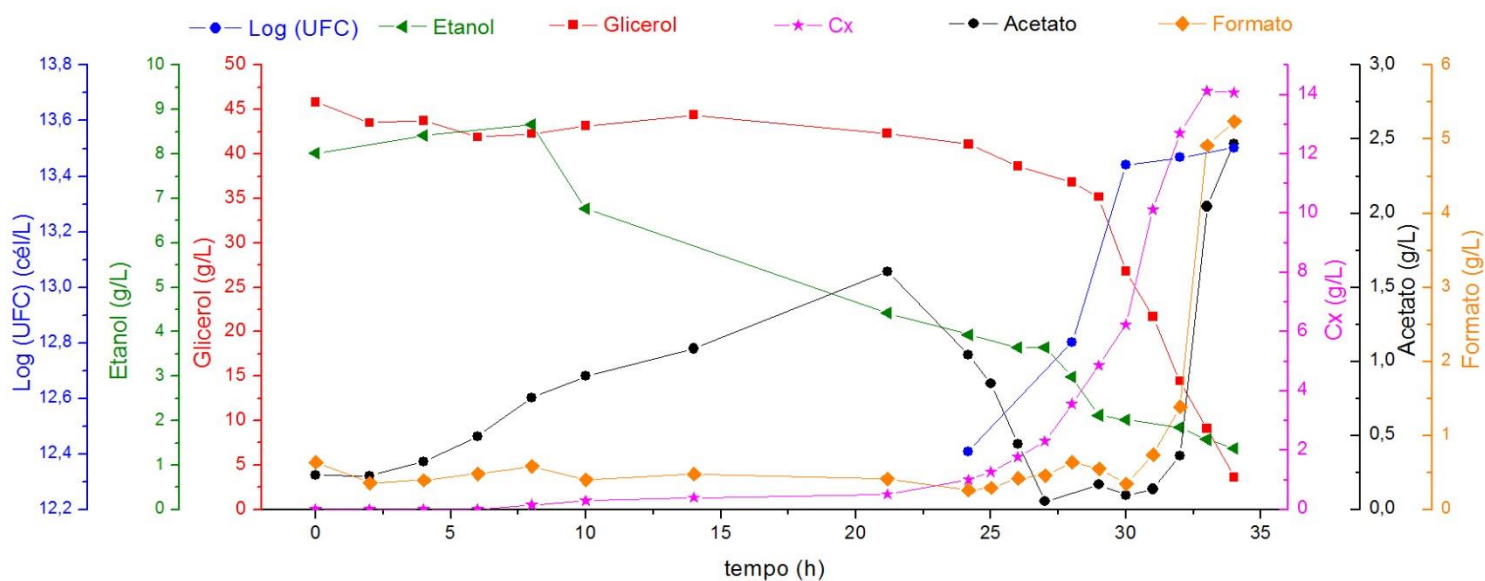
Condição	Concentração inicial de glicerol (g/L)	Concentração inicial de etanol (g/L)	GBROta usado	Diluição GBROta
Selvagem	45,85	8,01	10	1,55
Evoluída	44,06	11,7	11	1,59

4.4.1 Cultivo 1 – Linhagem selvagem em meio com GBROta à 40 g/L

O cultivo 1 avaliou o crescimento da linhagem selvagem da *E. coli* – UMinho em meio definido usando o GBROta 10 como fonte de carbono, com a concentração inicial de glicerol de 45,85 g/L. As condições de operação do reator foram apresentadas no item 3.5.3.3 deste trabalho.

As análises de DO_{600nm} foram corrigidas conforme Equação 22 devido à concentração do meio. A DO inicial do cultivo foi de 0,186 e sua duração total foi de 34 horas, apresentando uma fase *lag* de 24 horas. Durante a fase *lag*, o etanol é o substrato preferencialmente consumido (Figura 49). Pode-se observar o crescimento da linhagem selvagem após a fase *lag*. O consumo das fontes de carbono também se intensifica com o início da fase exponencial. O glicerol só passa a ser consumido mais intensamente após aproximadamente 26 horas de cultivo, juntamente com o etanol.

Figura 49 - Perfil de crescimento, consumo da fonte de carbono e etanol, UFC durante o cultivo 1 (*E. coli* Selvagem em GB Rota 40 g/L)



A partir dos dados da concentração celular estimou-se a velocidade máxima específica de crescimento durante a fase exponencial, que alcançou $0,276 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$, 41,3% inferior ao obtido pela linhagem selvagem no meio definido preparado com glicerol puro (cultivo em shaker, condição 1, $0,470 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$). Esse resultado significa que as células de linhagem selvagem conseguem crescer na presença das impurezas após um longo período de adaptação, mas o crescimento é inibido.

Apesar dos cultivos em reator apresentarem melhores condições de controle operacional e parâmetros, a linhagem selvagem apresentou um $\mu_{\text{máx}}$ inferior ao obtido em cultivo em shaker utilizando GB Rota, cultivo A-2 ($0,341 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$) discutido no item 4.3.3. Essa diferença pode estar relacionada à concentração inicial de glicerol no cultivo em reator, 15% superior à do cultivo em shaker, o que indica uma concentração maior de impurezas.

Foi observada a formação de vários ácidos orgânicos durante o cultivo (Figura 49 e Tabela 19), destacando-se os ácidos acético, fórmico e propiônico. O acetato foi produzido durante a fase *lag* do cultivo, o que não pode ser atribuído pelo metabolismo *overflow*, já que a velocidade de crescimento era muito baixa. Pode ser que a produção de ácido acético seja uma resposta das células ao estresse celular causado pela exposição às impurezas, mas essa hipótese necessita de comprovação. Porém, ao entrar na fase exponencial de crescimento nota-se que ocorre uma queda na concentração de acetato, sugerindo que o ácido está sendo assimilado, voltando a ser produzido quando a fase estacionária se inicia, chegando a concentrações de 2,5 g/L.

O ácido propiônico tem sua presença constante, porém em baixas concentrações ao longo do cultivo, atingindo uma concentração máxima de 0,2 g/L. Os ácidos succínico e láctico apresentam concentrações significativas apenas nas últimas horas de cultivo. Já o acúmulo de formato é crescente durante a fase exponencial, chegando a atingir uma concentração de 5,2 g/L, sendo a maior concentração de ácido encontrada nesse cultivo. A formação de ácido fórmico é inesperada em um cultivo conduzido em condições plenamente aeróbias tendo em vista que as vias metabólicas de formação de ácido fórmico só são ativadas em condições anaeróbias ou microaerófilas. Porém, o acúmulo de ácido fórmico já foi relatado em cultivos de *E. coli* conduzidos em condições aeróbias, sendo atribuído à lise e à formação de uma película de DNA em volta da célula, o que acaba limitando a difusão do oxigênio (CASTAN e ENFORS, 2002). É importante ressaltar ainda que nos cultivos de *E. coli* K12 MG1655 conduzidos por Beg e colaboradores (2007) em meio definido M9 e glicerol, não foi observada formação de nenhum metabólito. Portanto, o acúmulo de ácido fórmico e acético observados no presente cultivo pode estar relacionado com uma resposta fisiológica da célula ao estresse da exposição a alta concentração de impurezas.

Os dados de concentração de células viáveis também apresentados na Figura 49 permitem avaliar a influência do acúmulo de metabólitos no perfil de crescimento. Nota-se que o aumento de concentração de células viáveis acompanha o crescimento celular (medido pela DO) até 30 h de cultivo. A partir desse momento, apesar da disponibilidade de substratos (etanol e glicerol), o perfil da curva (UFC/mL) muda de inclinação, indicando uma diminuição da velocidade de crescimento. Isso ocorre devido à inibição pelos ácidos orgânicos (acético e fórmico principalmente) presentes no final do cultivo.

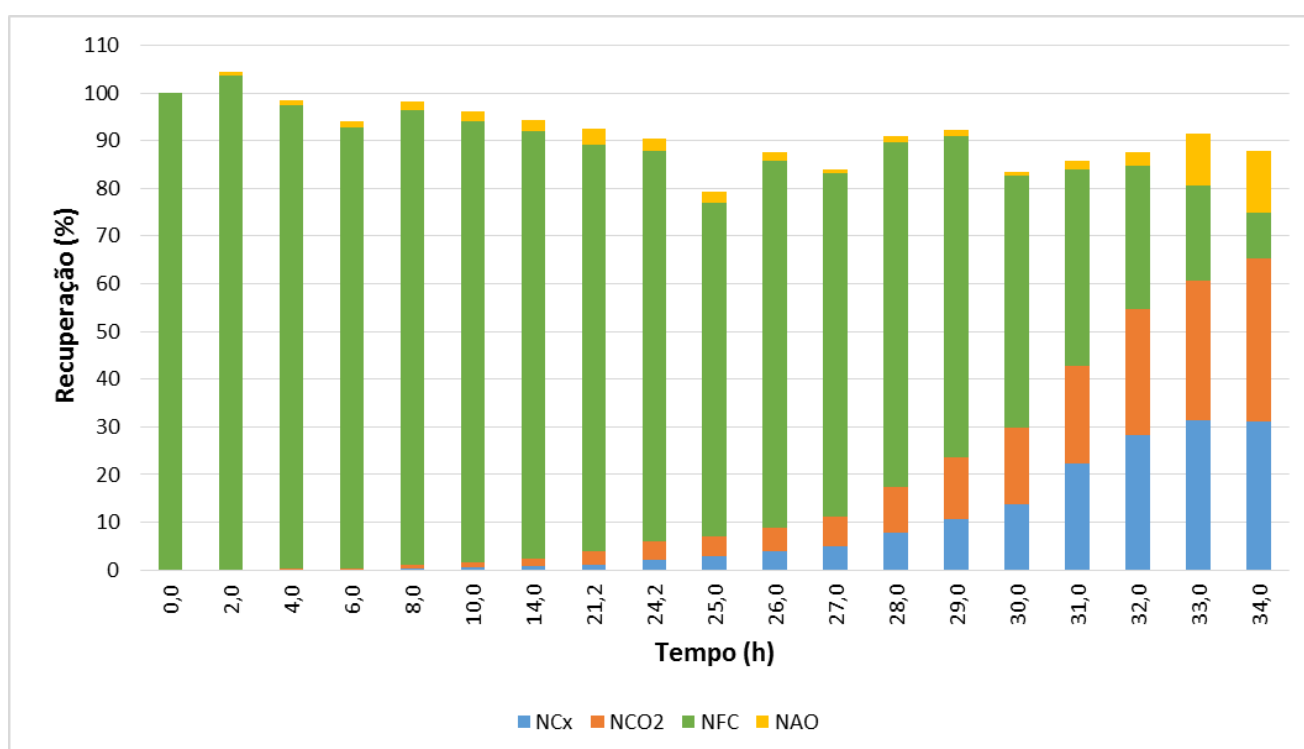
Tabela 19 - Produção de ácidos orgânicos no Cultivo 1

Tempo (h)	Ácidos Orgânicos (g/L)			Tempo (h)	Ácidos Orgânicos (g/L)		
	Succínico	Láctico	Propiônico		Succínico	Láctico	Propiônico
0	0	0	0	26	0	0	0,172
2	0	0	0,16	27	0	0	0,172
4	0	0	0,168	28	0	0,03	0,236
6	0	0	0,192	29	0	0,03	0,19
8	0	0	0,236	30	0,033	0,03	0,142
10	0	0	0,216	31	0,096	0,045	0,184
14	0	0	0,184	32	0,099	0,048	0,13
21,17	0	0	0,214	33	0,15	0,402	0,236
24,17	0	0,027	0,15	34	0,207	0,816	0,17
25	0	0	0,186				

4.4.1.1 Balanço de carbono no cultivo em biorreator com linhagem selvagem – Cultivo 1

O cultivo 1 teve uma boa recuperação de carbono até as 24 horas, como mostra a Figura 50, ficando entre 90 e 100%. Porém ao iniciar a fase exponencial de crescimento essa recuperação oscila entre 80 e 90%. A menor recuperação de carbono após as 24 horas de cultivo precisa ser melhor investigada. Novas análises de CLAE ajudarão a identificar algum outro metabólito que pode ter sido formado. É importante realizar também a quantificação de proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos que podem ter sido liberados no meio devido à lise celular (SILVA, 2015), apesar dos dados de UFC não mostrarem tendência de queda da densidade ótica (apenas de desaceleração do crescimento), que indique a ocorrência de lise.

Figura 50 - Recuperação de carbono no Cultivo 1



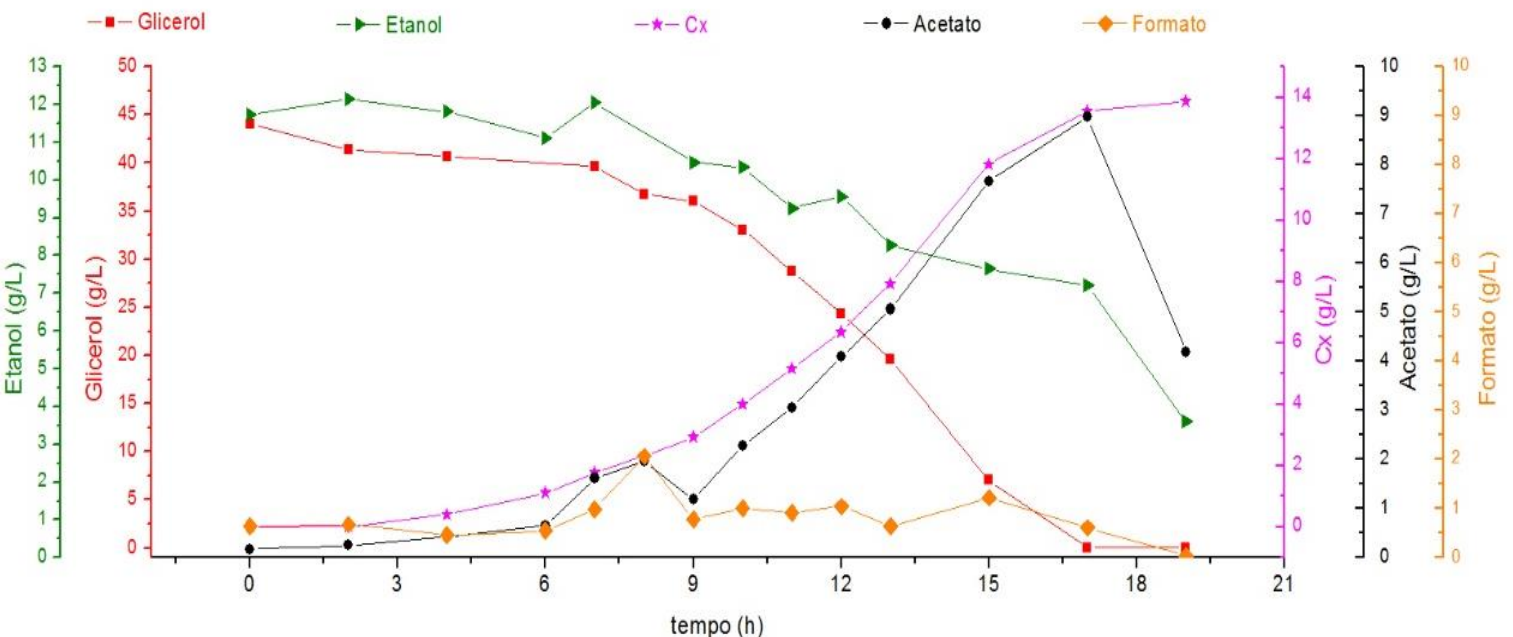
Nota: Número de C-mol de carbono presentes forma de: ácidos orgânicos (NAO); fontes de carbono (NFC); CO₂ (NCO₂) e biomassa (N_{Cx}).

4.4.2 Cultivo 2 – Linhagem evoluída em meio com GBRota à 40 g/L

No cultivo 2 foi utilizada a linhagem evoluída obtida a partir dos cultivos de estratégia adaptativa na condição 6. As condições de operação do reator foram as mesmas adotadas no cultivo 1, o GBRota usado foi o 11 e a concentração inicial de glicerol igual a 44 g/L. A DO_{600nm} medida ao longo do cultivo também foi obtida conforme Equação 22.

Na Figura 51 observa-se o crescimento da linhagem adaptada ao longo das 19 horas de cultivo. Como esperado, devido à estratégia de adaptação, não houve ocorrência de fase *lag*. A linhagem evoluída mostra um padrão de assimilação de substratos diferente da linhagem selvagem. Enquanto a selvagem apresentou preferência pelo etanol, a linhagem evoluída consome os dois substratos desde o início do cultivo, com preferência pelo glicerol, que foi totalmente assimilado pelas células. Já a velocidade de assimilação de etanol diminui a partir das 10 h de cultivo e ao final restam 3,6 g/L desse substrato.

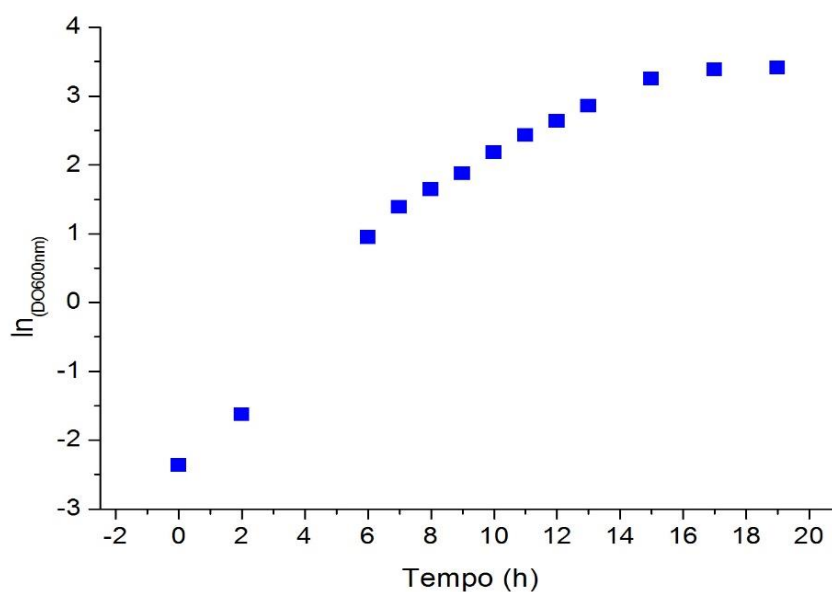
Figura 51 - Perfil de crescimento, consumo da fonte de carbono e etanol, formação de metabólitos durante o Cultivo 2 (*E. coli* Evoluída em GBRota 40 g/L)



Para a determinação do $\mu_{m\acute{a}x}$ nesse cultivo foi preciso usar os dados da massa de CO_2 produzido, conforme Equação 14, pois houve uma fase exponencial muito curta, nas primeiras 6 horas, com coleta insuficiente de dados da DO para permitir sua estimativa pela Eq. 10, como mostra a Figura 52. Essa fase exponencial curta é consequência da intensa produção de metabólitos. Como mostra na Figura 51, em 7 h de cultivo a concentração de ácido acético

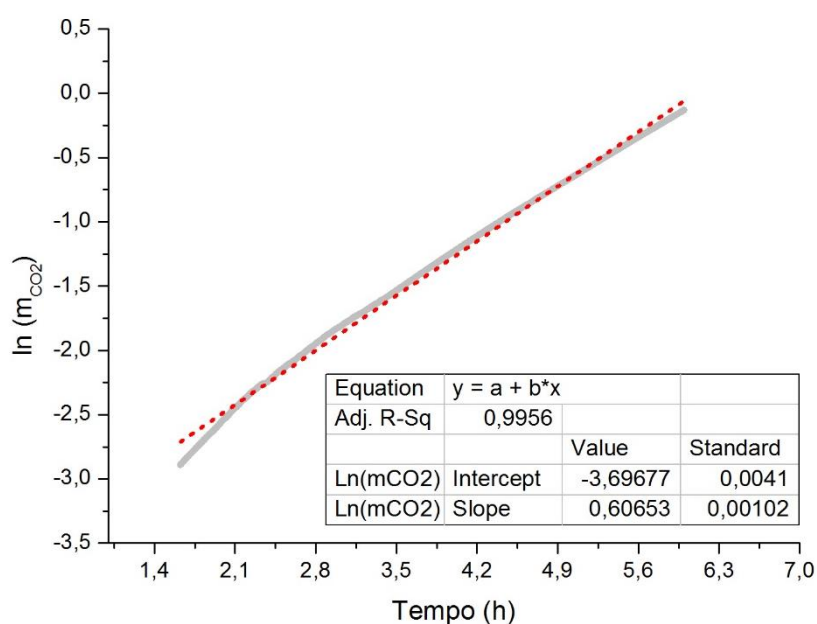
e de ácido fórmico alcançam 1,6 e 1,0 g/L, respectivamente. De acordo com a literatura, concentrações de ácido acético de 1,0 g/L já são inibitórias (CONTIERO et al., 2000; DE MEY et al., 2007). Assim, após 7 h de cultivo, ocorre desaceleração da velocidade específica de crescimento devido à inibição por produto e apenas os dados obtidos até 6 h podem ser empregados no cálculo de $\mu_{\text{máx}}$.

Figura 52 - Crescimento da linhagem evoluída obtida na condição 6 em cultivo em biorreator



Os dados integrados da produção de CO_2 de acordo com a equação 14 para essa fase do cultivo são apresentados na Figura 53 e o valor de $\mu_{\text{máx}}$ estimado foi $0,607 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$.

Figura 53 - $\mu_{\text{máx}}$ obtido a partir dos dados do CO_2



Esse valor foi superior ao obtido no cultivo A-1 no item 4.3.3 ($0,515 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$), confirmando a importância do controle das condições de cultivo como pH e oxigenação, que é mais eficiente em biorreator do que em shaker.

Em relação ao resultado obtido pela linhagem durante o cultivo de adaptação na condição 6 ($0,60 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$), os valores são semelhantes, o que indica que as células conseguiram manter a adaptação mesmo diante de um meio mais concentrado em relação a fonte de carbono como, conseqüentemente, as impurezas contidas no GBRota.

Como mostra a Figura 51, devido à alta velocidade específica de crescimento, houve intensa formação de metabólitos durante o cultivo. As concentrações de ácido fórmico e acético alcançam o patamar de inibição em 7 h de cultivo e, conseqüentemente, observa-se uma expressiva diminuição da velocidade específica de crescimento (μ), que passa a $0,247 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$. O metabólito com produção mais significativa foi o ácido acético, chegando a atingir ao final do cultivo quase 9 g/L. Portanto, a diminuição na velocidade específica de crescimento pode ser atribuída à inibição pelo acetato (CONTIERO et. al., 2000; DE MEY et. al., 2007). Ao contrário da linhagem selvagem, a reassimilação de ácido acético só ocorre após o esgotamento do glicerol. A formação de ácido láctico e propiônico também ocorreu desde o início, porém as concentrações se mantiveram abaixo de 0,2 g/L. A produção dos metabólitos estão resumidos na Tabela 20.

Tabela 20 - Produção de ácidos orgânicos no Cultivo 2.

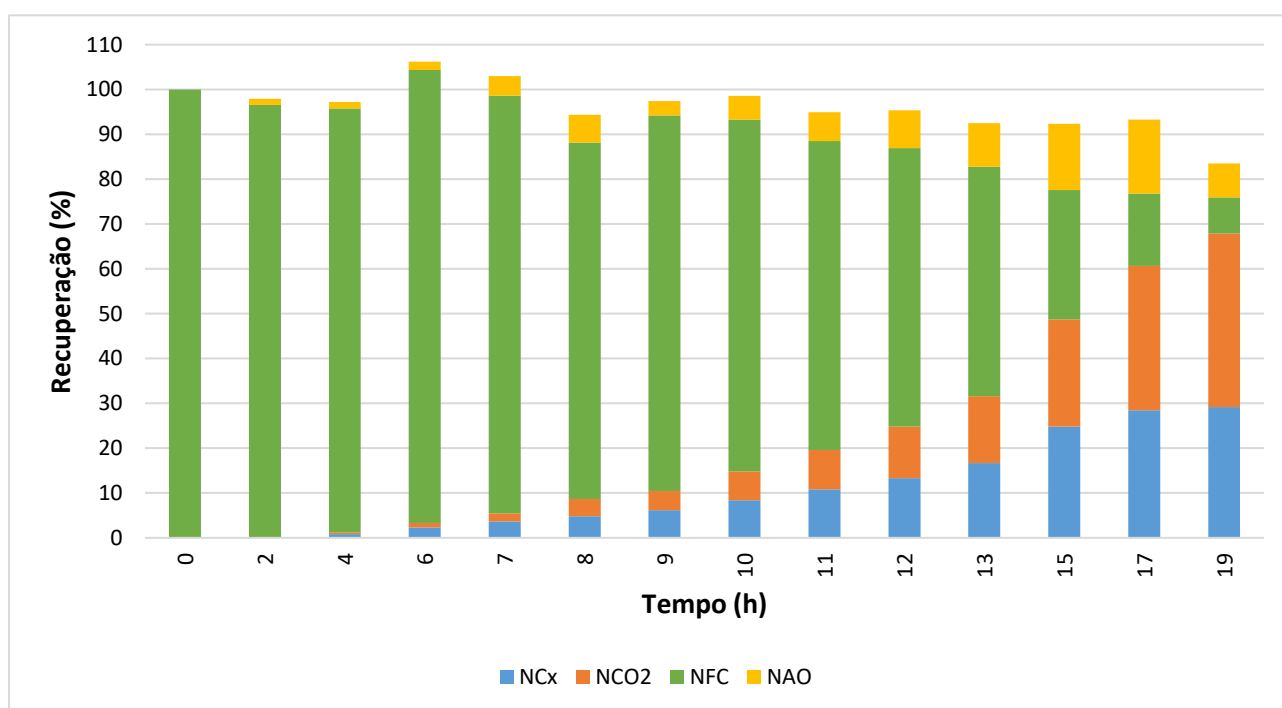
Tempo (h)	Ácidos orgânicos (g/L)	
	Lático	Propiônico
0	0,045	0,064
2	0,051	0,052
4	0,033	0,052
6	0	0,052
7	0,132	0,118
8	0,198	0,096
9	0,102	0,062
10	0,057	0,082
11	0,021	0,088
12	0,015	0,104
13	0,018	0,112
15	0,012	0,13
17	0,045	0,15
19	0,039	0,156

4.4.2.1 Balanço de carbono no cultivo em biorreator com linhagem evoluída – Cultivo 2

O presente cultivo obteve uma excelente recuperação de carbono, com valores superiores a 90 %, até 17 horas. Na última amostra coletada, a recuperação cai a 83 % (Figura 54).

No caso do cultivo 2, a exposição das células a altas concentrações de inibidores certamente é fator de estresse assim como o esgotamento da fonte de carbono preferencial (glicerol) em 17 h de cultivo pode levar a lise e liberação de proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos para o meio de cultivo (SILVA, 2015).

Figura 54 - Recuperação de carbono no Cultivo 2



Nota: Número de C-mol de carbono presentes forma de: ácidos orgânicos (NAO); fontes de carbono (NFC); CO₂ (NCO₂) e biomassa (N_{Cx}).

4.4.3 Comparação do crescimento, formação de biomassa e produtos das linhagens selvagem e evoluída em cultivo no biorreator.

Os principais parâmetros de desempenho estimados a partir dos dados obtidos nos cultivos em biorreator para as duas linhagens estão resumidos na Tabela 21. Como era

esperado, o valor do $\mu_{\text{máx}}$ para a linhagem selvagem foi baixo, já que a mesma foi exposta a uma condição desfavorável ao seu crescimento em um meio contendo impurezas como sais, sabão, óleo residual, que inibem o crescimento celular. A linhagem evoluída mantém o $\mu_{\text{máx}}$ adquirido a partir da estratégia de evolução, porém houve a formação de metabólitos que inibiram seu crescimento, desacelerando-o.

Tabela 21 - Principais resultados em biorreator: linhagem selvagem e evoluída

Cultivo	Microrganismo	μ (h^{-1})	$Y_{X/S}$ (gMS/g)	$Y_{P/S}$ (gacetato/g)
1	Selvagem	$\mu_{\text{máx}} : 0,276 \pm 0,009$	$0,39 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,06$ (fase lag) $0,19 \pm 0,02$ (final do cultivo)
2	Evoluída	$\mu_{\text{máx}} : 0,607 \pm 0,001$ $0,247 \pm 0,006$ (após inibição)	$0,264 \pm 0,005$	$0,190 \pm 0,002$

Como observado nos dados da Tabela 21, o $\mu_{\text{máx}}$ elevado logo no início do cultivo favoreceu a formação de subprodutos pela linhagem evoluída, que manteve a elevada conversão em substrato mesmo após a desaceleração do crescimento. Como o metabolismo foi direcionado para a formação de subprodutos, conseqüentemente o rendimento em biomassa foi menor para linhagem evoluída. Já a linhagem selvagem apresentou um crescimento mais lento desde o início, produzindo menos metabólitos e assim apresentou um rendimento maior.

A alta produção de ácidos orgânicos pela linhagem evoluída afeta o crescimento e a formação de biomassa e não é uma característica desejada para uma linhagem industrial, que deve apresentar alto rendimento em biomassa. Porém, recursos da Biologia Molecular permitem resolver esse problema, estudando a estrutura da *E. coli* BL21 que produz menos acetato (PHUE J-N., SHILOACH, 2004; SHILOACH et. al., 1996, LEONE et al., 2015) e aplicando a modificação na *E. coli* K12 MG1655. Outra possibilidade para diminuir a produção de acetato é modificar a estratégia de cultivo, mantendo a temperatura do biorreator em valor mais baixo enquanto a concentração de glicerol estiver acima de 10 g/L, por exemplo.

4.4.4 Comparativo com outros trabalhos

Os dados obtidos nesse trabalho podem ser comparados a trabalhos semelhantes descritos na literatura, conforme Tabela 22.

Tabela 22 - Cultivos com *E. coli* K12 MG 1655

Linagem	Característica do cultivo	Fonte de Carbono	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Y _(X/S) (g/g)	Y _(P/S) (g/g)	Descrição e Fonte	
Selvagem	Shaker, 37 °C, pH 6,3	GP	0,454±0,009	*	*	As concentrações da fonte de carbono foram de aproximadamente 40 g/L.	
		GBRota	0,341±0,008	*	*		
Selvagem	Reator, batelada, 37 °C, pH 6,3	GBRota	0,276±0,009	0,39±0,01	0,19±0,06 (lag) 0,19±0,02 (final)		
Evoluída	Shaker, 37 °C, pH 6,3	GP	0,60±0,02	*	*		Este trabalho.
		GBRota	0,60±0,04	*	*		
Evoluída	Reator, batelada, 37 °C, pH 6,3	GBRota	0,607±0,001	0,264±0,005	0,190±0,002		
Selvagem	Reator, batelada, 37 °C, pH 7,0±0,02, fonte de carbono: 5 g/L	GP	0,32±0,02	0,519	0,0324	As linhagens mutantes foram obtidas após cultivo contínuo de 126 dias usando meio mínimo e 0,5% de glicerol como fonte de carbono. Foram obtidas 217 gerações. Weikert, Sauer e Bailey (1997)	
Mutante – CWML2			0,39±0,02	0,586	0,0108		
Selvagem		Glicose	0,52±0,05	0,419	0,0384		
Mutante – CWML2			0,67±0,03	0,507	0,0312		
Selvagem	Shaker, 37 °C, fonte de carbono: 0,25 g/L	GP	0,48	**	**	Ibarra, Edwards, e Palsson (2002)	
Evoluída	Shaker, 37 °C, fonte de carbono: 2 g/L		0,7	**	**		
Selvagem	Shaker, 37 °C, fonte de carbono: 2 g/L	Glicose	0,62	**	**		
Evoluída			0,73	**	**		
Selvagem	Reator, batelada. Fonte de carbono: 0,4 g/L	GP	0,42	~0,7 ⁺	0	Beg e colaboradores (2007)	
		Glicose	0,74	~0,6 ⁺	~0,2 ⁺		

* Valores não determinados nos cultivos. ** Valores não fornecidos pelos autores.

⁺ Valores estimados a partir de dados experimentais fornecidos pelos autores.

Pode-se observar que o valor de $\mu_{\text{máx}}$ obtido no cultivo da linhagem selvagem em glicerol puro é coerente com os relatados na literatura para cultivos em meio definido utilizando esta fonte de carbono (IBARRA, EDWARDS e PALSSON, 2002; BEG et al., 2007). Já para a linhagem evoluída obtida no presente trabalho, cultivada na presença de GBRota a 30 e a 40 g/L de glicerol, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ são próximos ao melhor valor relatado na literatura por Ibarra e colaboradores para a adaptação da *E. coli* K12 em meio contendo glicerol puro. A Tabela 22 também mostra que os valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos pela linhagem selvagem em glicose são sempre superiores aos alcançados em glicerol. Isso reflete a preferência da *E. coli* K12 pela glicose (e outros substratos, como galactose, maltose, lactato etc). De fato, os experimentos realizados por Beg e colaboradores (2007), utilizando misturas de 5 fontes de carbono diferentes, mostraram que o glicerol é o último substrato assimilado pela *E. coli* K12. Assim, tanto os nossos resultados como os relatados por Ibarra e colaboradores mostram que é possível tornar essa bactéria mais apta a assimilar o glicerol por meio da Engenharia Evolutiva. No caso do presente trabalho, além da adaptação ao glicerol, foi gerada uma linhagem mutante capaz de manter alta velocidade específica de crescimento em resíduo industrial da produção de biodiesel contendo várias impurezas, fato ainda não relatado na literatura para *E. coli* K12, até onde vai o nosso conhecimento.

A Tabela 22 também permite comparar os rendimentos em biomassa e acetato com os relatados na literatura para o glicerol puro como substrato e meio definido. Constata-se que o presente trabalho apresentou os maiores valores de rendimento em acetato e, conseqüentemente, os menores em biomassa. Essa alta produção de acetato não era esperada, tendo em vista que o glicerol normalmente não apresenta um metabolismo *overflow* tão acentuado como o da glicose em bactérias (SILVA, 2015; SARGO, 2011; SARGO, 2015). Por outro lado, os estudos disponíveis na literatura não permitem avaliar a ocorrência do metabolismo *overflow* com glicerol em *E. coli* K12 devido às baixas concentrações iniciais de glicerol empregadas. Assim, experimentos adicionais são necessários para esclarecer se a produção de acetato observada ocorre naturalmente para a *E. coli* K12 selvagem em meio definido contendo altas concentrações de glicerol puro, se foi intensificada como uma resposta fisiológica das células ao estresse da exposição às impurezas presentes no glicerol não refinado ou ainda se a linhagem evoluída apresenta metabolismo *overflow* mais acentuado que a selvagem.

O esclarecimento das questões relacionadas à formação de acetato é importante para uma melhor compreensão da influência de contaminantes no metabolismo celular ou das mudanças no metabolismo durante o processo de evolução adaptativa. Do ponto de vista

prático, a redução da formação de acetato pode ser realizada por meio de manipulações genéticas comumente empregadas na Biologia Molecular. Portanto, pode-se afirmar que a linhagem evoluída identificada no presente trabalho tem grande potencial como plataforma para a síntese de produtos de valor agregado a partir do subproduto gerado na produção industrial de biodiesel.

5 CONCLUSÕES FINAIS

Os avanços na Biologia de Sistemas têm disponibilizado uma série de novas ferramentas que podem ser aplicadas no melhoramento do metabolismo de microrganismos visando sua utilização como fábricas celulares. A Engenharia Evolutiva, uma dessas ferramentas, foi empregada no presente trabalho para adaptar as células da bactéria *Escherichia coli* K12 MG1655 ao glicerol bruto, concentrado por rotaevaporação, subproduto da produção industrial de biodiesel.

O emprego da metodologia de evolução adaptativa, na qual o microrganismo é exposto de maneira gradativa às impurezas do GBRota permitiu obter uma linhagem evoluída a partir da linhagem selvagem da *E. coli* K12 MG1655, que apresentou $\mu_{\text{máx}}$ médio 27,6% superior ao da linhagem selvagem no glicerol puro e 51% superior ao da *E. coli* selvagem cultivada em meio contendo a mesma concentração de resíduo. Observou-se ainda que o aumento da concentração de glicerol bruto de 20 para 30 g/L levou a uma diminuição de cerca de 20% no valor do $\mu_{\text{máx}}$ médio. Esse resultado sugere que a exposição das células à concentração mais elevada de impurezas causou inibição do crescimento. Esse problema pode ser contornado adotando-se uma estratégia de adaptação mais gradual de aumento da concentração do resíduo rotaevaporado.

A linhagem evoluída apresentou um perfil totalmente diferente da selvagem na hierarquia de assimilação de substratos, transformando o glicerol em seu substrato preferencialmente assimilado, mesmo na presença de etanol e acetato. A adaptação ao resíduo é reafirmada pela diferença nos valores da velocidade máxima específica de crescimento, passando de 0,28 h⁻¹ (selvagem) para 0,6 h⁻¹ (evoluída) nos cultivos em reator. O desempenho exibido pela linhagem evoluída em termos de velocidade de crescimento no meio elaborado com o resíduo é semelhante aos melhores resultados relatados na literatura para adaptação da mesma bactéria ao meio definido contendo glicerol puro.

Também foi constatado que o etanol não foi um composto tóxico para os microrganismos já que o mesmo foi assimilado nos cultivos. A formação de metabólitos foi inesperada, principalmente de formato e acetato, sendo este último bastante expressivo na linhagem evoluída. Como a sua formação em cultivos de *E. coli* utilizando glicerol puro não é tão significativa, a elevada formação de acetato pode estar associada ao stress causado às células devido as impurezas do meio, principalmente as derivadas do MONG, que poderia intensificar o direcionamento do carbono pela rota metabólica de formação do acetato.

Considerando que a produção de acetato pode ser atenuada por técnicas de manipulação genética, pode-se afirmar que o resíduo rico em glicerol originado na produção de biodiesel tem grande potencial de aproveitamento em cultivos com a linhagem evoluída, contribuindo para reduzir seu impacto ambiental.

6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

A partir da análise dos resultados obtidos, sugerem-se os seguintes estudos para a continuidade do trabalho:

- Obter nova linhagem evoluída mais tolerante as impurezas pela retomada dos cultivos de adaptação evolutiva com aumentos mais graduais na concentração de GBRota, passando de 20 para 30, 40, 50 e 60 g/L, com transferências sucessivas correspondentes a 85 gerações em cada concentração.
- Realizar novas análises em CLAE para investigação de formação de algum outro metabólito assim como a quantificação da concentração de proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos nas amostras dos cultivos em biorreator, visando identificar compostos que podem estar contribuindo para o não fechamento do balanço de de carbono.
- Realizar cultivos em biorreator com as linhagens selvagem e evoluída usando o glicerol puro e o meio definido para comparar com os resultados obtidos nos cultivos já realizados e avaliar a influência das impurezas presentes no meio com GBRota sobre o metabolismo e a formação de ácidos orgânicos.
- Repetir a estratégia de evolução adaptativa com a *E. coli* BL21(DE3), que apresenta menor formação de acetato em comparação com a K12

7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. F. G. **Tratamento do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel visando a geração de metano.** 86f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em nov. 2014.

ANTUNES, F. A. F. et al. Condições de pré-tratamento do glicerol proveniente da produção de biodiesel utilizando planejamento experimental plackett burman. In: XI ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2011, São José dos Campos. Anais...CD.

APOLINÁRIO, F. D. B.O.; PEREIRA, G. F.; FERREIRA, J. P. Biodiesel e alternativas para utilização da glicerina resultante do processo de produção de biodiesel. Bolsista de Valor: **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 2, n. 1, p. 141-146, 2012.

ATSUMI, S. et al. Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. **Mol. Syst. Biol.**, v. 6, n. 449, 2010.

BACHMANN, B. J. Derivations and Genotypes of Some Mutant Derivatives of *Escherichia coli* K-12. 1987. Disponível em: <<http://bio.classes.ucsc.edu/bio1051/RESOURCES/bachmann%2066.PDF>> Acesso em: mar. 2016.

BEG, Q. K. et al. Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by *Escherichia coli* and constrains its metabolic activity. **PNAS**, v. 104, n. 31, p. 12663-12668, 2007.

BIODIESELBR. Biodiesel: combustível renovável e ambientalmente correto. 2005. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/destaques/2005/combustivel-renovavel.htm>> Acesso em: dez. 2015.

BLATTNER, F. R. et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453-1462, 1997.

BOHON, M. D. et al. Glycerol combustion and emissions. **Proc. Combust. Inst.**, v. 33, p. 2717-2724, 2011.

BUENO, L. S. R. **Estudo da influência da composição do óleo vegetal sobre algumas propriedades do biodiesel.** 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Pontifícia Universidade Católica, Paraná. 2007.

CAMPANI, G. **Reator airlift operado em sobrepressão: construção, caracterização da transferência de oxigênio e aplicação em cultivos de *Escherichia coli* recombinante.** 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

CASTAN, A.; ENFORS, S.O. Formate accumulation due to DNA release in aerobic cultivations of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 77, p. 324-328, 2002.

CHATTERJEE, R.; YUAN, L. Directed evolution of metabolic pathways. **Trends Biotechnol.** v.24, p.28-38, 2006.

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3- propanediol production of *Clostridium butyricu* VPI 1718. **Biotechnol. Bioeng.**, v.107, p.76-84, 2010.

COCKS, L. V.; DEVIN, J. E; GIBBS, F. B. Determination of MONG in place of organic residue for glycerine analysis. **Analyst**, v. 95, p. 278-283, 1970.

CONTIERO, J. et al. Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 421–430, 2000.

CORRÊA, F. A. F. **Características dos patótipos de *E. coli* e implicações de *E. coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos.** 30f. Seminários Aplicados (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás. Goiana, 2012.

COSTA, J. B. **Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir do glicerol da reação de formação de biodiesel.** 84f. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

DAEGELEN, P. et al. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). **J. of Mol. Biol.**, v. 394, n. 4, p. 634-643, 2009.

DE MEY, M. et al. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.34, p. 689-700, 2007.

DRAGOSITS, M.; MATTANOVICH, D. Adaptive laboratory evolution - principles and applications for biotechnology. **Microb. Cell Fact.**, v. 12, n. 1, p. 64, 2013.

EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. **Trends in biotechnol.**, v. 24, p. 530-536, 2006.

FONG, S. S. et al. In silico design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 91, p. 643-648, 2005.

GANCEDO, C; GANCEDO, J.M; SOLS, A. Glycerol Metabolism in Yeasts. **Eur. J. Biochem.**, v.6, n.2, p.165-172, 1968.

GONÇALVES, B. R. L.; PEREZ, L.; ÂNGELO, A. C. D. Glicerol: Uma Inovadora Fonte de Energia Proveniente da Produção de Biodiesel. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION. Anais... p.1-6, 2009.

GONZALEZ, A; BELL, G. Evolutionary rescue and adaptation to abrupt environmental change depends upon the history of stress. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.**, v. 368, n. 1610, 2013.

HORTA, A. C. L. **Sistema automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de *E. coli* recombinante.** 170f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

HORTA, A. C. L. et al. Intensification of high cell-density cultivations of *rE. coli* for production of *S. pneumoniae* antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, n. 35, p. 1269-1280, 2012.

HU, H; WOOD, T.K. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 39, p. 1033-1038, 2010.

IBARRA, R.U., EDWARDS, J.S., PALSSON, B.O. *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. **Nature.** v. 420, p. 186–189, 2002.

ITO, T. et al. Hydrogen ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **J. of Biosci. and Bioeng.**, v.100, p.260–265, 2005.

KUHNERT, P.; NICOLET, J.; FREY, J. Rapid and accurate identification of *Escherichia coli* K-12 Strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 11, p. 4135-4139, 1995.

KYLE, S., JAMES, K. A. R., MCPHERSON, M. J., Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. **Microb. Cell Fact.**, v. 11, n. 1, p. 28, 2012.

KWON, Y. D. et al. Long-term continuous adaptation of *Escherichia coli* to high succinate stress and transcriptome analysis of the tolerant strain. **J. Biosci. Bioeng.**, v.111, p.26-30, 2011.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiol.**, v.45, p.2577-2585, 1999.

LEE, S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Tib. Tech.**, v. 14, p. 98-105, 1996.

LEE, D. H.; PALSSON, B. O. Adaptive evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 during growth on a non-native carbon source, L-1,2-propanediol. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p.4158-4168, 2010.

LEONE, S. et al. Acetate: friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. **Microb. Cell Fact.**, v. 4, p. 106, 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 4 ed. New York: Worth Publisher, 2006. 1216 p.

LI, N. et al. Directed pathway evolution of the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* for improved aerobic succinate production from glycerol. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 1461-1475, 2013.

LIMA, J. R. O. et al. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007.

LIMA, W. J. N. **Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular**. 158f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

MAAHEIMO, H. et al. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional (¹³C) labeling of common amino acids. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 2464-2479, 2001.

MAINKA, C. P. **Avaliação de diferentes tipos de substrato para produção de P(3HB) por *B. megaterium***. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

MAMAT, U. et al. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. **Microb. Cell Fact.**, v.14, p.57, 2015.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, K. et al. New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. **Microb. Cell Fact.**, v. 11, p. 46, 2012.

MATTOS, A. P. Caracterização termoquímica do glicerol bruto e aproveitamento energético em uma planta de médio porte de produção de biodiesel. f. 184. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Mecânica) – Instituto de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, 2013.

MME, Ministério de Minas e Energia. Resenha Energética Brasileira. Junho, 2015. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/documents/1138787/1732840/Resenha+Energ%C3%A9tica+-+Brasil+2015.pdf/4e6b9a34-6b2e-48fa-9ef8-dc7008470bf2>> Acesso em: 01 dez. de 2015.

MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M. Co-produtos da Produção de Biodiesel. **Rev. Virtual Quim.** v. 3, n. 5, p. 416-425, 2011.

MU, Y. et al. Microbial production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumonia* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, p. 1755-1759, 2006.

OOI, T. L. et al. Glycerol Residue - A Rich Source of Glycerol and Medium Chain Fatty Acids. **J. of Oleo Sci.**, v. 53, n. 1, p. 29–33, 2004.

PAJUELO, M. G. et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Metab. Eng.**, v. 7, p. 329-336, 2005.

PAULA, F. C. **Polihidroxicanoatos (PHAs): Bioprospecção de micro-organismos e produção a partir de glicerol.** 220 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2012.

PHUE, J.N., SHILOACH, J. Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). **J. Biotechnol.** v. 109, p. 21–30, 2004.

PHITHAKROTCHANAKOON, C. et al. Production of polyhydroxyalkanoates from crude glycerol using recombinant *Escherichia coli*. **J. Polym. Environ.**, v. 23, n. 1, p. 38-44, 2015.

PORTNOY, V. A.; BEZDAN, D.; ZENGLER, K. Adaptive laboratory evolution —harnessing the power of biology for metabolic engineering. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, p. 590-594, 2011.

POSADA, J. A. et al. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochem.** v. 46, n. 1, p. 310-317, 2011.

PLANALTO. Lei nº 13.033, de 24 setembro de 2014. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2014/lei/113033.htm> Acesso em: nov. 2014.

RIESENBERG, D. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 2, p. 380-384, 1991.

RIVALDI, J. D **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos**. 125f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. DA. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Rev. Biotec. Ciênc. & Desenvolv.**, v. 37, p. 44-51, 2007.

ROCHA, R. P. **Processos de purificação/valorização do glicerol proveniente da produção de biodiesel**. 111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto – Portugal, 2009.

SANTOS, M. P. **Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante**. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de *rE. coli* utilizando glicerol como fonte de carbono**. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

SARGO, C. R. **Estudo do metabolismo de *Salmonella typhimurium*: da abordagem tradicional à análise dos fluxos metabólicos**. 181f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

SHULER, M.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2 ed. Upper Saddle River. Prentice – Hall, 2002. 553 p.

SHILOACH, J. et al. Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (hDE3) and *Escherichia coli* JM 109. **Biotechnol.**, v. 49, p. 421–428, 1996.

SILVA, G .P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnol. Adv.**, v.27, p.30-39, 2009.

SILVA, G. G. **Aspectos morfológicos, reológicos e fisiológicos dos cultivos de *Escherichia coli* recombinante**. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

SPIEGELEER, P. et al. Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. **J. of Appl. Microbiol.**, v.97. p.124-133. 2004.

SUAREZ, C. A. G. Otimização da produção de etanol 2G a partir de hexoses e pentoses. 165f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

THOMPSON, J.C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Appl. Eng. Agric.** v. 22, p. 261-265, 2006.

VASCONCELOS Y. (2012). “Glicerina”. Revista Fapesp Disponível em < <http://revistapesquisa.fapesp.br/2012/06/14/residuos-bem-vindos/>>. Acesso em dez. 2014.

VÉLEZ, A. M. et al. High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *rE. coli* fed-batch cultivations. **BMC Biotechnol.**, v. 14, p. 6, 2014.

VIANA, M. B. **Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel**. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

VILLADSEN, J., NIELSEN, J., LIDÉN, G. **Bioreaction Engineering Principles**. New York: Springer Science Business Media, 2011. 561 p.

von STOCKAR, U., IJU, J.-S. Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1412, p. 191-211. 1999.

YAHYA, P. P. P. et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, v. 488, p. 320-328, 2012.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. **Biotechnol. for Biofuels**. v. 5, n.13, 2012.

YONG, K. C. et al. Refining of crude glycerine recovered from glycerol residue by simple vacuum distillation. **J. of Oil Palm Res.**, v. 13, n. 2, p. 39-44, 2001.

WANG, Y. et al. Adaptive evolution of nontransgenic *Escherichia coli* KC01 for improved ethanol tolerance and homoethanol fermentation from xylose. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 38, p. 1371-1377, 2010.

WEIKERT, C.; SAUER, U.; BAILEY, J. Use of a glycerol-limited, long-term chemostat for isolation of *Escherichia coli* mutants with improved physiological properties. **Microbiol.**, n. 143, p. 1567–1574, 1997.

WRIGHT, J. et al. Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.** v. 11, n. 3, p. 299-306, 2011.