

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**BIOPRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL EM MEIO MINERAL
CONTENDO GLICEROL DERIVADO DA INDÚSTRIA DE BIODIESEL**

Bruna Campos de Souza

Caxias do Sul
2018

Bruna Campos de Souza

**BIOPRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL EM MEIO MINERAL CONTENDO
GLICEROL DERIVADO DA INDÚSTRIA DE BIODIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Eloane Malvessi

Coorientadores: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Prof. Dr. Lademir Luiz Beal

Caxias do Sul, 2018.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

S729b Souza, Bruna Campos de
Bioprodução de 2,3-butanodiol em meio mineral contendo glicerol derivado da indústria de biodiesel / Bruna Campos de Souza. – 2018.
x, 126 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.
Orientação: Eloane Malvessi.
Coorientação: Mauricio Moura de Silveira, Lademir Luiz Beal.

1. Biodiesel - Indústria. 2. Bactérias anaeróbias. 3. Fermentação. I. Malvessi, Eloane, orient. II. Silveira, Mauricio Moura de, coorient. III. Beal, Lademir Luiz, coorient. IV. Título.

CDU 2. ed.: 662.75

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

Bruna Campos de Souza

**BIOPRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL EM MEIO MINERAL CONTENDO
GLICEROL DERIVADO DA INDÚSTRIA DE BIODIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Eloane Malvessi
Coorientadores: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira
Prof. Dr. Lademir Luiz Beal

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25 DE MAIO DE 2018.

Orientadora: Prof. Dra. Eloane Malvessi

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Coorientador: Prof. Dr. Lademir Luiz Beal

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva

Prof. Dr. Tito Lívio Moitinho Alves

Prof. Dra. Suelen Osmarina Paese

*Ao meu noivo por todo amor, carinho, paciência
e por estar sempre ao meu lado apoiando os
meus sonhos.*

*À minha família pela base para que eu pudesse
sonhar.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas oportunidades oferecidas para que eu pudesse evoluir como pessoa, profissional e pesquisadora.

À minha mãe, Ivete de Fátima Pereira Campos, pelo amor e dedicação, que me mantiveram no caminho do bem e da perseverança.

À minha irmã, Rubia Melissa Ramos, por sempre me incentivar.

Aos meus avós, Maria Leonor Pereira de Campos e Orides Pereira de Campos (*in memoriam*) por sempre me apoiarem e por serem meus exemplos.

Ao meu noivo, Adalton William Silvestre, por sempre acreditar no meu potencial, acima de tudo, quando eu não acreditava.

À Profa. Dra. Eloane Malvessi pela oportunidade, ensinamentos, orientação, paciência, incentivo, apoio, amizade e por ter me recebido de braços abertos para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira pela orientação, paciência, apoio, confiança, incentivo e amizade, além dos puxões de orelha.

Ao Prof. Dr. Lademir Luiz Beal pela orientação, amizade e por ter cedido a estrutura do Laboratório de Tecnologia Ambiental em uma etapa muito importante do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos pelo estímulo e incentivo diário, em especial aos bolsistas de iniciação científica Cristina Chies Bianco, Patrícia Deitos Adler, Mateus Giovanni Procedi Rizzotto, Flávia Frozza Bossardi e Greice Ribeiro Furlan, pela excelência e dedicação como pesquisadores e pela amizade construída.

À Ma. Sabrina Carra, por toda a ajuda, orientação, incentivo, ensinamentos e por não ter medido esforços para me auxiliar na realização desta pesquisa, e acima de tudo, pela nossa amizade.

À equipe da Central Analítica do Instituto de Biotecnologia, em especial ao Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva e a Dra. Fabiana Agostini.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo conhecimento compartilhado, em especial ao Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon por todas as contribuições, as quais foram essenciais para este trabalho.

Aos membros da banca de avaliação, Profa. Dra. Suelen Osmarina Paese, Prof. Dr. Tito Lívio Moitinho Alves e Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva, pelas importantes contribuições.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,

pela estrutura física e recursos humanos necessários para a realização desta pesquisa.

À PETROBRAS, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro à realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 2,3-Butanodiol: características e aplicações.....	4
2.2 Glicerol: características, produção e aplicações.....	7
2.3 Bactérias produtoras de 2,3-butanodiol.....	11
2.4 Metabolismo e conversão microbiológica de glicerol e glicose por Enterobactérias.....	13
2.5 Bioprodução de 2,3-butanodiol: parâmetros e aspectos dos processos fermentativos ...	17
2.5.1 Características dos meios de cultivo.....	17
2.5.2 Glicerol subproduto da síntese de biodiesel como substrato para produção de 2,3-butanodiol.....	19
2.5.3 Influência do pH do meio de cultivo.....	21
2.5.4 Efeito da temperatura na produção de 2,3-butanodiol.....	22
2.5.5 Efeito do suprimento de oxigênio.....	23
2.6 Planejamento experimental e otimização de processos.....	25
2.7 Metodologias analíticas para determinação de substratos e produtos em fermentação..	28
2.8 Metodologias analíticas para a determinação de fosfatos em fermentação.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Instalações.....	33
3.2 Microrganismos.....	33
3.3 Meios de cultivo.....	33
3.3.1 Meio de conservação e propagação.....	33
3.3.2 Meios de fermentação.....	34
3.4 Preparo dos inóculos.....	36
3.5 Métodos analíticos.....	37
3.5.1 Coleta e preparo das amostras.....	37
3.5.2 Determinação da concentração celular.....	37
3.5.3 Determinação da concentração de glicose por método espectrofotométrico.....	38

3.5.4	Determinação da concentração de glicerol por método espectrofotométrico	38
3.5.5	Determinação da concentração de substratos e produtos por cromatografia em fase líquida.....	40
3.5.6	Determinação da ácido fosfórico proporcionalmente a concentração de íons fosfato em fermentação por cromatografia em fase líquida.....	40
3.6	Determinação da concentração de oxigênio dissolvido no meio	40
3.7	Cálculos dos parâmetros de avaliação	41
3.7.1	Velocidade específica de crescimento celular.....	41
3.7.2	Fatores de conversão, produtividade volumétrica e rendimento.....	41
3.8	Ensaio fermentativos	43
3.8.1	Estudo comparativo entre linhagens: regime descontínuo alimentado.....	43
3.8.2	Ensaio em regime descontínuo com diferentes formulações de meios de cultivo .	44
3.8.3	Otimização de meio de cultivo: ensaios em frascos agitados	45
3.8.4	Comparação entre meio otimizado e meio controle.....	47
3.9	Validação de metodologias analíticas	47
3.9.1	Validação de metodologias adaptadas e/ou desenvolvidas.....	47
3.9.2	Seletividade	48
3.9.3	Linearidade e intervalo de concentração.....	49
3.9.4	Limites de detecção e quantificação	49
3.9.5	Repetibilidade e precisão intermediária.....	50
3.9.6	Exatidão e/ou recuperação	51
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Ensaio fermentativos	53
4.1.1	Comparação da produção de 2,3-butanodiol e acetoína por <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i>	53
4.1.2	Crescimento microbiano e formação de produtos por <i>Enterobacter aerogenes</i> em diferentes meios de cultivo.....	72
4.1.3	Otimização de meio de cultivo – Planejamento experimental <i>Box Behnken Design</i> – 3 ^k (BBD)	81
4.1.4	Cultivo de <i>Enterobacter aerogenes</i> em meio simplificado por otimização e meio controle.....	89
4.2	Validação de metodologias	94
4.2.1	Validação de metodologia cromatográfica para determinação de glicerol, acetoína, <i>meso</i> -2,3-butanodiol, 2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -(+)-2,3-butanodiol e etanol em amostras de fermentação....	95

4.2.2 Validação de metodologia espectrofotométrica para determinação de glicerol em amostras de fermentação	102
4.2.3 Validação de método cromatográfico para a determinação de ácido fosfórico proporcionalmente ao conteúdo de íons fosfato em amostras de fermentação	111
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	117
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

LISTA DE ABREVIATURAS

- μ_P – velocidade específica de formação de produto (h^{-1})
 μ_S – velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1})
 μ_x – velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
 μ_{xm} – máxima velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
 A_a – atividade de água
 AC – acetoína
 BDO - butanodiol
 f – fator estequiométrico de conversão
 MP_0 – massa inicial de produto (g)
 MP_f – massa final de produto (g)
 MS_{cons} – massa de substrato consumida (g)
 MX_0 – massa celular inicial (g)
 MX_f – massa celular final (g)
 P – concentração de produtos (2,3-BDO + AC)
 P_0 – concentração inicial de produto (g/L)
 P_f – concentração final de produto ou produtos da fermentação (g/L)
 rpm – rotações por minuto
 S_0 – concentração inicial de substrato (g/L)
 S_c – concentração de substrato consumido (g/L)
 S_{eq} – concentração de substrato equivalente (g/L)
 S_f – concentração final de substrato (g/L)
 t – tempo de fermentação (h)
 t_f – tempo final de fermentação (h)
 vvm – volume de ar por volume de meio por minuto
 X – concentração celular (g/L)
 X_f – concentração celular final (g/L)
 X_i – concentração celular inicial (g/L)
 $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produtos (g/g)
 $Y_{P/X}$ – produção específica em relação à biomassa (g/g)
 $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células (g/g)
 ρ – rendimento (%)
 p – produtividade (g/L/h)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estereoisômeros de 2,3-butanodiol (adaptado de Boutron, 1990; Celinska & Grajek, 2009; Ji et al., 2011; Białkowska, 2016) 5
- Figura 2.** Vias metabólicas de conversão do glicerol em piruvato. [A] maioria dos microrganismos; [B] *Klebsiella sp.* sob condições aeróbias, conforme Kaur et al. (2012). 1-glicerol-3-fosfato desidrogenase; 2- di-hidroxiacetona quinase; 3- glicerol quinase. Girardi (2014), adaptado de Kaur et al. (2012)..... 15
- Figura 3.** Vias metabólicas de conversão do piruvato em produtos. 1- piruvato desidrogenase; 2- acetaldeído desidrogenase; 3- etanol desidrogenase; 4- lactato desidrogenase; 5- piruvato-formato liase; 6- formato-hidrogênio liase; 7- α -acetolactato sintase; 8- acetolactato descarboxilase; 9- acetoína redutase; 10- acetato quinase. Girardi (2014), adaptado de Ji et al.(2011)..... 16
- Figura 4.** Variação das concentrações de biomassa celular, glicose e produto final com o tempo em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Ensaio P1 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S₀, 80 g/L. (▼) Glicose (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC) 54
- Figura 5.** Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e acetoína em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 com glicose. Ensaio P1 – 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S₀, 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoína 54
- Figura 6.** Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol puro e produto final com o tempo em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Ensaio P2 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S₀, 80 g/L. (▼) Glicerol puro (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC) 55
- Figura 7.** Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e acetoína em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 com glicerol puro. Ensaio P2 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S₀, 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoína 55
- Figura 8.** Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol subproduto e produto final com o tempo em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Ensaio P3 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S₀, 80 g/L. (▼) Glicerol subproduto (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC) 56
- Figura 9.** Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e acetoína em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 com glicerol subproduto. Ensaio P3 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S₀, 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoína 56
- Figura 10.** Variação das concentrações de biomassa celular, glicose e produto final com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Ensaio P4 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S₀, 80 g/L. (▼) Glicose (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC)..... 57
- Figura 11.** Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e acetoína em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com glicose. Ensaio P4 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S₀, 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoína..... 57

- Figura 12.** Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol puro e produto final com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Ensaio P5 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (▼) Glicerol puro (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC)..... 58
- Figura 13.** Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e acetoína em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com glicerol puro. Ensaio P5 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoína 58
- Figura 14.** Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol subproduto e produto final com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Ensaio P6 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (▼) Glicerol subproduto (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC) 59
- Figura 15.** Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e acetoína em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com glicerol subproduto. Ensaio P6 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoína 59
- Figura 16.** Perfil de crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos e concentração de oxigênio dissolvido nos cultivos com diferentes formulações de meio. $S_0 = 40$ g/L. [A] ensaio 1, meio PC; [B] ensaio 2, meio PC..... 73
- Figura 17.** Perfil de crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos e concentração de oxigênio dissolvido nos cultivos com diferentes formulações de meio. $S_0 = 40$ g/L. [C] ensaio 1, meio MA; [D] ensaio 2, meio MA 73
- Figura 18.** Perfil de crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos e concentração de oxigênio dissolvido nos cultivos com diferentes formulações de meio. $S_0 = 40$ g/L. [E] ensaio 1, meio PR; [F] ensaio 2, meio PR..... 74
- Figura 19.** Perfil de crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos e concentração de oxigênio dissolvido nos cultivos com diferentes formulações de meio. $S_0 = 40$ g/L. [G] ensaio1, meio MD4; [H] ensaio 2, meio MD4 76
- Figura 20.** Gráficos de contorno obtidos para a variável P_f a partir dos fatores $(NH_4)_2SO_4 - S_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O - S_5$ e $(NH_4)_2HPO_4 - F_8$ 85
- Figura 21.** Resultados de otimização obtidos para a função desejabilidade através de ensaios executados por planejamento experimental *Box-Behnken Design* visando a maximização das variáveis $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$ e P_f a partir do meio MD4 89
- Figura 22.** Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol subproduto e produto final com o tempo em cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em [A] meio MD5 e [B] meio PC, a 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC); (○) Oxigênio dissolvido (C) e (▼) glicerol subproduto (S)..... 90
- Figura 23.** Variação das concentrações de produto final com o tempo em cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em meio MD5 e meio PC, a 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (▲) produto final (2,3-BDO + AC) e (▲) produto final (2,3-BDO + AC)91
- Figura 24.** Variação das concentrações de biomassa celular, produto final e íons fosfato com o tempo em cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em [A] meio MD5 e [B] meio PC, a 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC) e PO_4^{-3} (◆) 92

- Figura 25.** Perfil de separação cromatográfica (CLAE) de amostras de glicerol (1), acetoína (2), *meso*-2,3-BDO (3), *R,R*-2,3-BDO (4) e etanol (5). Mistura das substâncias de referência [A], padrões puros: acetoína, *meso*-2,3-BDO e *R,R*-2,3-BDO [B], mistura das substâncias de referência (10 g/L) e padrões sobrepostos [C] e, mistura das substâncias de referência (1 g/L) e padrões de glicerol e etanol sobrepostos [D]..... 96
- Figura 26.** Curvas de calibração obtidas a partir da análise de soluções padrão de *meso*-2,3-butanodiol e *2R,3R*-(-)-2,3-butanodiol entre 1 e 8 g/L 97
- Figura 27.** Curvas de calibração obtidas a partir da análise de soluções padrão de glicerol em duplicata sob diferentes condições de pH das reações. [A] Sanchez (1998) – pH 3,0; [B] Adaptação 1 – reagente tamponado pH 3,0; [C] Adaptação 2 – reagentes separados, pH 5,5; [D] Adaptação 3 - reagente tamponado pH 5,5 105
- Figura 28.** Curva de calibração média obtida a partir da análise de soluções padrão de glicerol entre 100 e 800 mg/L..... 107
- Figura 29.** Perfil comparativo para concentrações de glicerol determinadas por cromatografia e espectrofotometria ao longo de um cultivo em batelada. $S_0 = 40$ g/L. Concentrações médias - CLAE e Espectrofotometria [A]; média e desvio padrão relativo (DPR) entre os métodos [B] 110
- Figura 30.** Perfil cromatográfico (CLAE) de amostras de fosfato de amônio (1) [A] e amostra de fermentação contendo metabólitos juntamente com padrão fosfato de amônio [B], utilizando detector IR, a 60°C, em fase móvel de H₂SO₄ 5 mmol/L e fluxo 0,6 mL/min..... 112
- Figura 31.** Curva de calibração média obtida a partir da análise de soluções padrão de fosfato de amônio com concentrações corrigidas para íons fosfato (PO₄³⁻) e expressos graficamente como ácido fosfórico 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos estereoisômeros de 2,3-butanodiol	5
Tabela 2. Derivados obtidos a partir de 2,3-butanodiol e aplicações	7
Tabela 3. Propriedades físico-químicas da molécula de glicerol	8
Tabela 4. Composição da solução rica em glicerol, oriundo da indústria de biodiesel, obtido a partir de diferentes matérias-primas	10
Tabela 5. Caracterização do glicerol subproduto resultante do processo de produção do biodiesel a partir de óleo de soja	34
Tabela 6. Composição dos meios minerais utilizados nas diferentes etapas de avaliação do processo de produção de 2,3-butanodiol	35
Tabela 7. Parâmetros da metodologia descrita por Sanchez (1998) e adaptações.....	39
Tabela 8. Matriz de planejamento experimental para otimização de meio de cultivo a partir de <i>Box Behnken Design</i> 3 ^k (BBD).....	46
Tabela 9. Resultados gerais obtidos em cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724 e <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 em meios contendo glicose, glicerol puro e glicerol subproduto como substratos em regime descontínuo alimentado (frequência de agitadores, 700 rpm, fluxo específico de ar, 0,5 vvm, 37°C, pH 5,5, S ₀ , 80 g/L). Ensaios P1 a P6	65
Tabela 10. Resultados gerais dos cultivos de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048, em biorreator de agitação mecânica, com o uso de glicerol subproduto adicionado aos meios com diferentes formulações (S ₀ 40 g/L). Ensaios M1 a M3.....	74
Tabela 11. Resultados gerais dos cultivos em biorreator de agitação mecânica com <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 em meio PC e MD4 contendo glicerol subproduto (S ₀ 40 g/L). Ensaios M1 e M4	77
Tabela 12. Resultados obtidos para análise de atividade de água (A _a) realizada para os meios PC, MA, PR e MD4. Ensaios M1 e M4	78
Tabela 13. Resultados obtidos para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio - K _{1a} inicial dos meios PC, MA, PR e MD4 (frequência de agitadores, 650 rpm, fluxo específico de ar, 0,5 vvm, 37°C, pH 5,5, S ₀ , 40 g/L). Ensaios M1 e M4	79
Tabela 14. Resultados gerais dos cultivos em biorreator de agitação mecânica com <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 em meio MD4 com a utilização NaOH e KOH 7 mol/L para o controle de pH (S ₀ 40 g/L). Ensaios M1 e M5	80
Tabela 15. Resultados gerais dos ensaios em agitador de bancada com <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 em diferentes formulações a partir do meio MD4 com glicerol subproduto. S ₀ 80 g/L (planejamento experimental – <i>Box Behnken Design</i>) (48).....	82
Tabela 16. Resultados gerais referentes aos diferentes produtos formados em ensaios de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 em agitador de bancada a partir de glicerol subproduto e meio MD4 (S ₀ = 80 g/L; planejamento experimental – <i>Box Behnken Design</i> ; 48 h de cultivo).....	86
Tabela 17. Resultados gerais obtidos com <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 em meio MD5 e PC contendo glicerol subproduto como substrato em regime descontínuo (frequência de agitadores, 700 rpm, fluxo específico de ar, 0,5 vvm, 37°C, pH 5,5, S ₀ 80 g/L).....	93

Tabela 18. Parâmetros de linearidade para as substâncias de referência - glicerol, acetoína, <i>meso</i> -2,3-butanodiol, 2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -(+)-2,3-butanodiol e etanol - analisadas por cromatografia em fase líquida.....	98
Tabela 19. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados para as substâncias de referência	98
Tabela 20. Resultados para repetibilidade do método cromatográfico para quantificação de glicerol, acetoína, 2,3-butanodiol e etanol, determinadas no mesmo dia.....	99
Tabela 21. Resultados para precisão intermediária do método cromatográfico para quantificação de glicerol, acetoína, 2,3-butanodiol e etanol, em três dias consecutivos.....	99
Tabela 22. Resultados para os testes de exatidão do método analítico por cromatografia líquida, relativo às análises de glicerol, acetoína, 2,3-butanodiol e etanol.....	100
Tabela 23. Resultados prévios obtidos para amostra de fermentação (matriz) em análise por cromatografia em fase líquida	101
Tabela 24. Resultados prévios obtidos para os padrões das substâncias de referência adicionados à matriz, em análise por cromatografia em fase líquida.....	101
Tabela 25. Exatidão do método correspondente à análise cromatográfica de uma amostra de fermentação contendo metabólitos, adicionada com diferentes concentrações das substâncias de referência (glicerol, acetoína, butanodiol e etanol).....	101
Tabela 26. Parâmetros da metodologia descrita por Sanchez (1998) e adaptações realizadas	103
Tabela 27. Tempos e volume de reação da metodologia descrita por Sanchez (1998) e adaptações realizadas.....	103
Tabela 28. Resultados de concentração obtidos para diferentes padrões em tempos de reação de 2, 3 e 4 minutos.....	106
Tabela 29. Cálculo dos parâmetros de regressão da equação linear – método de mínimos quadrados (valores médios de y)	107
Tabela 30. Resultados da análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão obtido a partir dos valores médios de y	108
Tabela 31. Resultados para repetibilidade, precisão intermediária e exatidão do método espectrofotométrico para quantificação de glicerol.....	108
Tabela 32. Resultados prévios obtidos para amostra de caldo fermentado em análise por cromatografia em fase líquida	109
Tabela 33. Resultados obtidos para análise espectrofotométrica de uma amostra de caldo fermentado contendo metabólitos microbianos e adicionada com diferentes concentrações do padrão glicerol	109
Tabela 34. Resultados para repetibilidade, precisão intermediária e exatidão do método cromatográfico para quantificação de ácido fosfórico	114
Tabela 35. Resultados prévios obtidos para amostra de fermentação (matriz) em análise por cromatografia em fase líquida	115
Tabela 36. Exatidão do método correspondente à análise cromatográfica de uma amostra de fermentação contendo metabólitos microbianos adicionada com diferentes concentrações do padrão fosfato de amônio	115

RESUMO

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO) é um composto com potencial de uso em diferentes segmentos industriais, podendo ser obtido por síntese química tradicional ou via processos fermentativos a partir de diferentes fontes de carbono. Entre suas aplicações potenciais, destaca-se a utilização como precursor na indústria de polímeros, matéria-prima na produção de solventes, agente anticongelante, combustível líquido ou aditivo de combustíveis. A síntese de 2,3-BDO pela fermentação do glicerol subproduto da indústria de biodiesel por bactérias anaeróbias facultativas é particularmente atrativa, considerando-se a grande disponibilidade desta matéria-prima e a possibilidade de integração de processos e produtos no conceito de biorrefinaria. Entretanto, o uso do glicerol subproduto para este fim, deve ser ainda cuidadosamente avaliado, considerando a significativa quantidade de impurezas nele contidas. Neste trabalho, avaliou-se a utilização do glicerol subproduto em meio mineral, para o crescimento celular e produção de estereoisômeros de 2,3-BDO e acetoína por *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Os resultados foram comparados com os alcançados com o uso de glicerol puro e glicose, em ensaios em regime descontínuo alimentado com concentração inicial de substrato (S_0) de 80 g/L, em meio mineral padrão (PC), frequência dos agitadores de 700 rpm e fluxo específico de ar de 0,50 volumes de ar por volume de meio por minuto (vvm). Na sequência, foram realizados ensaios fermentativos com *E. aerogenes* com glicerol subproduto e diferentes meios de cultivo relatados na literatura, com $S_0 = 40$ g/L, variação da frequência dos agitadores (650 a 750 rpm) e do fluxo específico de ar (0,50 a 0,87 vvm). Para a otimização do meio de cultivo, realizou-se um planejamento experimental do tipo *Box-Behnken Design-3^k*, com a avaliação de três variáveis independentes - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -, em três níveis. A avaliação cinética do cultivo de *E. aerogenes* no meio definido foi realizada em regime descontínuo em comparação ao uso do meio mineral padrão (PC). As metodologias analíticas utilizadas no decorrer da pesquisa foram validadas. Como resultados, nos cultivos com *E. aerogenes* em regime descontínuo alimentado, empregando-se glicerol puro e subproduto como substratos, rendimentos (ρ) da ordem de 82 e 84%, respectivamente, foram atingidos, sendo superiores ao obtido com glicose (71%). Nos ensaios conduzidos com diferentes formulações de meios de cultivos, a produção de biomassa foi favorecida na primeira etapa da fermentação com o uso do meio MD4, sendo cerca de 38% superior em relação ao meio mineral padrão (PC). Nos ensaios de otimização, *E. aerogenes* foi capaz de adaptar-se frente às diferentes concentrações dos sais presentes no meio contendo glicerol subproduto. Visando maximizar os resultados em termos de produção específica em relação à biomassa ($Y_{P/X}$), fator de conversão de substrato em produtos ($Y_{P/S}$) e concentração final de produtos (P_f), a partir dos resultados da otimização, sugere-se a utilização de um meio de cultivo definido contendo (g/L): glicerol, 80; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7,71; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3,15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6; KOH, 0,45. Considerando o conjunto de características dos métodos cromatográficos e espectrofotométricos utilizados, ambos são adequados para aplicação nesta pesquisa, fornecendo resultados confiáveis das fermentações. De forma geral, os resultados alcançados indicam a aplicabilidade do glicerol subproduto como substrato para a produção fermentativa

de 2,3-BDO e acetoína pelas bactérias anaeróbias facultativas *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Além disso, também foi demonstrado que a produção de 2,3-BDO pode ser conduzida com *E. aerogenes* a partir de glicerol subproduto, empregando-se meios simplificados em comparação ao padrão descrito na literatura, significando um ganho econômico para esta fermentação.

Palavras-chave: *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, glicerol subproduto, 2,3-butanodiol, meios de cultivo, otimização, validação de metodologias analíticas.

ABSTRACT

2,3-butanediol (2,3-BDO) is a compound with potential to be used in different industrial segments, that can be obtained by traditional chemical synthesis or via fermentative processes from different carbon sources. Among its potential applications, it is included the use as chemical building blocks in polymer industries, raw material for the production of solvents, antifreeze agent, liquid fuel or fuel additive. The synthesis of 2,3-BDO by the fermentation of glycerol by-product of the biodiesel industry by facultative anaerobic bacteria is particularly attractive considering the high availability of this substrate and the possibility of integrating processes and products into the concept of biorefinery. However, the use of the by-product glycerol for this purpose is still to be carefully assessed considering the significant amount of impurities it contains. In this work, the use of by-product glycerol in mineral medium for the cell growth and the production of stereoisomers of 2,3-BDO and acetoin by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 was evaluated. The results were compared with those obtained with the use of pure glycerol and glucose, in fed-batch cultivations with initial substrate concentration (S_0) of 80 g.L⁻¹, standard mineral medium (PC), impeller speed of 700 rpm, and air flow rate of 0.50 volumes of air per volume of medium per minute (vvm). In order, cultivations with *E. aerogenes* with by-product glycerol and different culture media reported in the literature, with $S_0 = 40$ g.L⁻¹, variation of the impeller speed (650 to 750 rpm) and the specific air flow rate (0.50 to 0.87 vvm), were carried out. For the optimization of the culture medium, an experimental Box-Behnken Design -3^k was performed, with the evaluation of three independent variables – (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄ and MgSO₄.7H₂O –, at three levels. The kinetic evaluation of the cultivation of *E. aerogenes* in the defined medium was performed in batch fermentations in comparison to the use of the standard mineral medium (PC). The analytical methodologies used during the research were validated. As results, in fed-batch cultivations with *E. aerogenes*, using pure glycerol and by-product as substrates, yields (ρ) of the order of 82 and 84%, respectively, were reached, higher than that obtained with glucose (71%). In the trials conducted with different formulations of culture media, biomass production was favored in the first fermentation stage using the MD4 medium, about 38% higher than the standard mineral medium (PC). In the optimization experiments, *E. aerogenes* was able to adapt to the different concentrations of the salts present in the medium containing by-product glycerol. In order to maximize the results in terms of specific production factor in relation to biomass ($Y_{P/X}$), product from substrate conversion factor ($Y_{P/S}$) and final product concentration (P_f), from the optimization results, it is suggested the use of a defined medium containing (g.L⁻¹): glycerol, 80; (NH₄)₂SO₄, 7.71; (NH₄)₂HPO₄, 3.15; MgSO₄.7H₂O, 0.6, KOH, 0.45. Considering the set of characteristics of the chromatographic and spectrophotometric methods used, both are suitable for application in this research, providing reliable results of the fermentations. In general, the results indicate the applicability of by-product glycerol as a substrate for the fermentative production of 2,3-BDO and acetoin by the facultative anaerobic bacteria *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. In addition, it has also been demonstrated that the production of

2,3-BDO can be conducted by *E. aerogenes* from by-product glycerol, using simplified media in comparison to the standard one described in the literature, which would positively reflect in the costs for this fermentation.

Keywords: *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, glycerol byproduct, 2,3-butanediol, culture media, optimization, validation of analytical methodologies.

1. INTRODUÇÃO

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO) é um álcool que pode ser obtido via síntese química ou através de processos fermentativos. É um importante produto químico tendo em vista as aplicações em segmentos industriais distintos. Entre as potenciais aplicações de 2,3-BDO, citam-se as possibilidades de utilização como precursor nas indústrias de polímeros, de tintas de impressão, de produção de solventes, entre outras. O 2,3-BDO também pode ser utilizado como agente aromatizante, anticongelante, combustível líquido ou aditivo de combustível, pois pode ser empregado na obtenção de produtos como o diacetil e a metil-etil-cetona (MEK). Destaca-se ainda que compostos quirais como o 2,3-BDO poderiam ser aplicados como reagentes em diferentes sínteses químicas assimétricas, o que o torna especialmente importante para a química fina, sobretudo na produção de fármacos ou de carreadores para produtos farmacêuticos.

Embora a tecnologia para a utilização do 2,3-BDO como intermediário químico para diferentes finalidades não seja uma realidade consolidada, é importante salientar que, além de suas potenciais aplicações industriais, este álcool pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas renováveis. Entre os substratos que podem ser utilizados para a produção de 2,3-BDO por via fermentativa, pode-se citar o glicerol, subproduto da indústria do biodiesel, o qual pode ser biologicamente convertido em produtos de valor agregado pela ação de diferentes microrganismos, tais como bactérias e fungos. Bactérias da família Enterobacteriaceae metabolizam glicerol em condições aeróbias e anaeróbias e se caracterizam como produtoras de 2,3-butanodiol. Destacam-se os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*, que são capazes de produzir 2,3-BDO como principal produto da fermentação ácida-mista de glicerol, dependendo das condições de processo empregadas.

No Brasil, a produção de biodiesel acumulada no ano de 2017 foi de 4.291.294 m³ (ANP, 2018) e, sendo o glicerol subproduto representado por cerca de 10% (v/v) no processo, estima-se a produção aproximada de 430.000 m³ deste composto. Atualmente, o Brasil possui 51 usinas produtoras de biodiesel, sendo que o Estado do Rio Grande do Sul tem nove usinas em operação, e detem a maior capacidade produtiva instalada no país, de 6.283,33 m³/dia (ANP, 2018). Importante salientar que a produção de biodiesel no país, e conseqüentemente a de glicerol, é estabelecida por demanda obrigatória em atendimento à legislação correlata. Destaca-se também que a região Sul, por questões geográficas, climáticas e por possuir uma matriz agrícola bem definida, carece de substratos convencionais (açucarados) para processos

fermentativos, podendo ser suprida pela utilização do glicerol como fonte de carbono, no caso da produção do 2,3-BDO.

Contudo, a aplicabilidade dos bioprocessos está atrelada a diferentes fatores, incluindo questões relacionadas aos parâmetros operacionais do processo, ao tipo de fonte de carbono e composição dos meios de cultivo, os quais afetam a eficiência, os custos e a competitividade das fermentações frente à síntese química tradicional.

O glicerol subproduto é um composto com cerca de 60-80% de glicerol na composição e contém impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual. Esta composição, quando considerada a utilização em processos fermentativos, pode influenciar tanto o crescimento microbiano quanto a produção de metabólitos de interesse, uma vez que são relatados efeitos inibitórios para determinados microrganismos. Contudo, também pode apresentar efeito benéfico em função das características do glicerol subproduto, devido à disponibilidade de diferentes íons, resultantes do uso dos catalisadores, das diferentes matérias-primas ou do processo produtivo empregado na obtenção do biodiesel.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral estudar o crescimento microbiano e a obtenção de 2,3-butanodiol por bactérias anaeróbias facultativas em meios de cultivo formulados com glicerol subproduto da produção de biodiesel – neste trabalho referido apenas como glicerol ou glicerol subproduto - e sais minerais. Adicionalmente, as metodologias analíticas utilizadas no decorrer da pesquisa foram adaptadas e validadas.

Em estudos anteriores do grupo de pesquisa foram empregados métodos analíticos que consideravam a soma global dos estereoisômeros de BDO e acetoína, tendo em vista que a separação total dos respectivos picos dos compostos não é alcançada por cromatografia em fase líquida. Neste trabalho, optou-se pela validação da metodologia cromatográfica considerando-se a altura dos respectivos picos como resposta, a fim de obter resultados referentes às parcelas correspondentes aos estereoisômeros de BDO e a produção de acetoína.

Para alcançar o objetivo geral, são relacionados abaixo os objetivos específicos:

- comparar o desempenho das linhagens *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 quanto ao consumo de substrato e a formação dos diferentes estereoisômeros de 2,3-BDO e a produção de acetoína, utilizando meio mineral contendo glicerol subproduto, em comparação ao uso de glicose e glicerol puro, em cultivos em regime descontínuo alimentado;
- avaliar a influência da composição de diferentes formulações de meios minerais sobre o crescimento, o consumo de substrato e formação de produtos (2,3-BDO e acetoína) em

cultivos descontínuos com um dos microrganismos, com o uso de glicerol subproduto como substrato;

- otimizar um meio de cultivo contendo glicerol subproduto e sais minerais em ensaios fermentativos conduzidos em regime descontínuo;
- avaliar de forma comparativa o cultivo em regime descontínuo com um dos microrganismos, com o emprego do meio otimizado e do meio mineral controle;
- validar as metodologias analíticas adaptadas e/ou desenvolvidas, as quais foram utilizadas para determinar as concentrações de produtos, substratos e componentes do meio de cultivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 2,3-Butanodiol: características e aplicações

O 2,3-butanodiol é um produto químico que pode ser obtido por síntese química ou via bioprocessos, sendo um composto de grande interesse econômico com potencial de uso em diversas aplicações industriais (Celinska & Grajek, 2009; Ji et al., 2011; Białkowska, 2016). A sua produção microbiológica apresenta vantagens em relação à síntese química tradicional, possibilitando a substituição dos recursos fósseis por matérias-primas renováveis (Białkowska, 2016).

A produção de 2,3-BDO a partir de processos fermentativos tem uma história de mais de 100 anos, sendo que o interesse no processo começou em 1906, quando Harden e Walpole desenvolveram estudos de obtenção de 2,3-BDO por *Bacillus lactis aerogenes* em meio contendo glicose e manitol como substratos (Harden & Walpolle, 1906). Durante a Segunda Guerra Mundial, com a escassez do composto 1,3-butadieno, intermediário na produção de borracha sintética, houve um estímulo nas pesquisas sobre a fermentação de 2,3-BDO para convertê-lo em 1,3-butadieno (Celinska & Grajek, 2009; Ji et al., 2011). No entanto, o interesse foi descontinuado, uma vez que a obtenção do 1,3-butadieno a partir de derivados do petróleo passou a ter um custo reduzido após o término do conflito (Celinska & Grajek, 2009). Na década de 1970, o aumento no preço do petróleo fez com que o empenho na produção de 2,3-BDO a partir de matérias-primas renováveis voltasse a aumentar (Voloch et al., 1985; Ji et al., 2011).

O álcool 2,3-BDO é um composto quirais, apresentando-se como um líquido incolor e inodoro, também conhecido como 2,3-butilenoglicol, 2,3-dihidroxi-butano e dimetileno glicol, principal produto da fermentação ácida-mista ou butileno-glicólica (Celinska & Grajek, 2009). Sua massa molar é 90,12 (g/mol) e sua fórmula molecular é $C_4H_{10}O_2$ (Celinska & Grajek, 2009).

Devido à presença de dois centros quirais na molécula de 2,3-BDO, são descritas três formas estereoisoméricas para o composto, as formas levógiro, dextrógiro e *meso*, as quais são mostradas na Figura 1 (Clendenning, 1946; Boutron, 1990; Ji et al., 2011; Sabra et al., 2015).

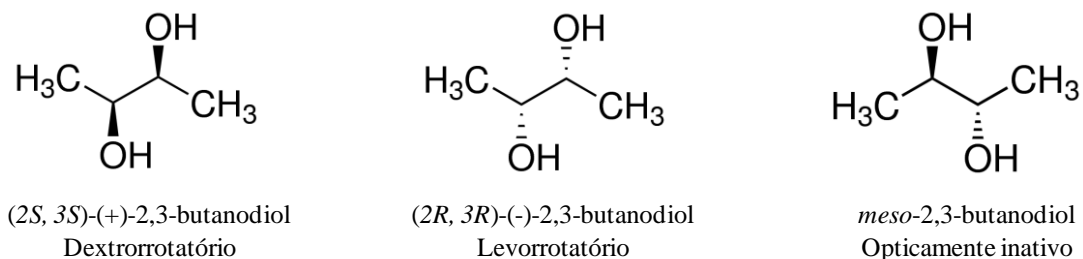


Figura 1. Estereoisômeros de 2,3-butanodiol (adaptado de Boutron, 1990; Celinska & Grajek, 2009; Ji et al., 2011; Białkowska, 2016).

As formas dextrorrotatório e levorrotatório são opticamente ativas, desviando o plano da luz polarizada para a direita (+) e esquerda (-), respectivamente, e a forma *meso* é opticamente inativa (Boutron, 1990; Utille & Boutron, 1999; Sabra et al., 2015). Ambos os estereoisômeros de BDO podem ser produzidos em cultivos microbianos, sendo dependentes do microrganismo empregado na fermentação (Ji et al., 2011; Zeng & Sabra, 2011; Wang et al., 2014). Exceto pela atividade óptica dos isômeros, as formas *2R,3R*- e *2S,3S*- apresentam as mesmas propriedades físicas, as quais diferem das propriedades do *meso*-2,3-BDO (Boutron, 1990). Ainda, segundo Boutron (1990), apenas *meso*-2,3-BDO é capaz de formar hidratos (cristaliza), com fortes ligações de hidrogênio. O autor acrescenta que a mistura racêmica de BDO, em soluções aquosas, tem propriedades físicas muito semelhantes em relação aos seus isômeros separados (Boutron, 1990; 1992).

Os pontos de ebulição dos estereoisômeros são ligeiramente diferentes e muito superiores ao ponto de ebulição da água (Celinska & Grajek, 2009). Este elevado ponto de ebulição dificulta o processo de recuperação por destilação, porém o baixo ponto de congelamento do isômero *2R,3R*-, de -60°C , proporcionaria sua utilização como agente anticongelante (Celinska & Grajek, 2009). Um resumo sobre as propriedades físico-químicas do 2,3-BDO é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos estereoisômeros de 2,3-butanodiol.

Propriedade	<i>2S,3S</i> -(+)	<i>2R,3R</i> -(-)	<i>meso</i>
Ponto de ebulição ($^{\circ}\text{C}$)	178	178	182
Ponto de congelamento ($^{\circ}\text{C}$)	--	-60	0
Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	19	19	33,7

Fonte: adaptado de Clendenning, 1946; Boutron, 1990; Utille & Boutron, 1999; Berbert-Molina, 1995; Ji et al., 2011.

O calor de combustão do 2,3-BDO (27,198 J/g) pode ser comparado ao de outros compostos como o metanol (22,081 J/g) e o etanol (29,055 J/g), indicando a possibilidade de sua utilização como combustível líquido (Flickinger, 1980). Além de seu alto valor calorífico, a possibilidade de sua conversão em metil-etil-cetona (MEK) e sua capacidade de aumentar a octanagem de combustíveis o torna um potencial combustível ou aditivo de combustíveis (Białkowska, 2016).

Em função da característica de biodegradabilidade, a sua utilização como um solvente ou agente de ligação para a produção de tintas e polímeros resultaria em produtos menos agressivos ao meio ambiente (Afschar et al., 1993). O 2,3-BDO também pode ser utilizado na fabricação de perfumes, como *carriers* de produtos farmacêuticos e como agente aromatizante altamente valorizado em produtos alimentares, entre outras aplicações (Celinska & Grajek, 2009; Zeng & Sabra, 2011; Białkowska, 2016).

As formas opticamente ativas de 2,3-BDO são substâncias químicas muito valorizadas na síntese assimétrica dirigida de produtos químicos quirais (Sabra et al., 2015). Na indústria farmacêutica, compostos quirais como o 2,3-BDO são especialmente importantes por fornecerem grupos quirais em medicamentos e em produtos farmacêuticos de alto valor agregado (Sabra et al., 2015). Segundo McConathy & Owens (2003), os enantiômeros de uma droga quiral podem diferir significativamente na sua biodisponibilidade, taxa de metabolismo, metabólitos, excreção, eficácia, toxicidade e seletividade para os receptores, transportadores ou enzimas do organismo. McConathy & Owens (2003) ressaltam que o uso de drogas com apenas um enantiômero poderiam fornecer um medicamento superior, com melhorados índices terapêuticos, perfis farmacológicos mais simples e seletivos e diminuição das interações medicamentosas.

Boutron (1990; 1992) avaliou a utilização dos estereoisômeros de BDO como agentes de criopreservação. O autor destaca que tanto os enantiômeros, *2S,3S*- e *2R,3R*-, quanto a mistura racêmica, a qual é constituída de quantidades equimolares das formas *2S,3S*- e *2R,3R*-, devido às suas propriedades físico-químicas, são excelentes agentes crioprotetores para técnicas de vitrificação de órgãos, tecidos e células.

Apesar das possibilidades de aplicação do 2,3-BDO de forma direta, muitos autores o consideram como um importante intermediário químico (*chemical building block*) na produção de diversos compostos, principalmente em substituição aos derivados do petróleo. Na Tabela 2 são apresentados alguns compostos, os quais podem ser obtidos a partir de 2,3-BDO como intermediário químico.

Tabela 2. Derivados obtidos a partir de 2,3-butanodiol e aplicações.

Produto	Processo de obtenção	Aplicação
Metil-etil-cetona (MEK)	Desidratação catalítica	Solvente orgânico; combustível; aditivo para combustível
Diacetil	Desidrogenação catalítica	Aditivo de alimentos com propriedades antissépticas
Acetoína	Desidrogenação catalítica	Aromatizante de alimentos
2,3-butanodiol diéster	Esterificação com ácido monobásico	Precusores de poliuretanos para drogas; plastificantes de polímeros termoplásticos
1,3-butadieno	Desidratação	Monômero na produção de borracha sintética e plásticos
Éter tetrametílico	Reação com acetona	Aditivo à gasolina
2-etil-2,4,5-trimetil-1,3 dioxolano (TMED)	Desidratação com ácido sulfúrico	Potencial combustível renovável e solvente

Fonte: adaptado de Voloch et al., 1985; Magee & Kosaric, 1987; Ji et al., 2011; Zeng & Sabra, 2011; Białkowska, 2016; Harvey et al., 2016.

2.2 Glicerol: características, produção e aplicações

Glicerol é o nome comum do composto orgânico que pertence a função álcool, 1,2,3-propanotriol (nomenclatura IUPAC) descoberto pelo farmacêutico Carl W. Scheele em 1779, resultado da saponificação do azeite de oliva com óxido de chumbo (Rivaldi et al., 2008; Mota et al., 2009; Kong et al., 2016). Em 1857, Pasteur relatou a formação de glicerol como um subproduto durante a fermentação alcoólica de açúcares (Kong et al., 2016). Como sinônimos para este triálcool tem-se os nomes glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano (Rivaldi et al., 2008).

O glicerol puro apresenta-se, em temperatura ambiente, como uma substância líquida, incolor, inodora, viscosa, higroscópica e com sabor levemente adocicado (Kong et al., 2016; Pradima et al., 2017). A presença de três grupos funcionais hidroxilas (-OH), as quais são hidrofílicas, conferem à molécula de glicerol propriedades como a higroscopicidade e a solubilidade em água (Tan et al., 2013; Kong et al., 2016; Pradima et al., 2017; Haron et al., 2018). Além da água, o glicerol é miscível em etanol, metanol, isopropanol, n-butanol e isobutanol. Porém, é pouco solúvel em acetona (5 % em massa) e acetato de etila (9 % em massa), levemente solúvel em dioxano, parcialmente insolúvel em hexano, benzeno e clorofórmio e, insolúvel em éter e hidrocarbonetos, entre outros solventes estudados por

diferentes autores (Kong et al., 2016). Um resumo sobre as propriedades físico-químicas do glicerol é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas da molécula de glicerol.

Propriedades	Valores
Fórmula molecular	$C_3H_5(OH)_3$
Massa molecular	92,09 g/mol
Ponto de fusão	17,8 °C
Ponto de ebulição	290 °C
Ponto de fulgor	177 °C
Viscosidade	1,5 Pa.s
Pressão de vapor à 20°C	< 1 mm Hg
Densidade à 20 °C	1,261 g/cm ³

Fonte: adaptado de Kong et al., 2016, He et al., 2017 e Haron et al., 2018.

O glicerol está naturalmente presente em vegetais, a exemplo da soja, mamona, babaçu, girassol e algodão; em tecidos animais, em formas combinadas de glicerol com ácidos graxos, formando os triglicerídeos (Thompson & He, 2006; Rivaldi et al., 2008; Umpierre & Machado, 2012; Dobson et al., 2012). Pode ser considerado fundamental dentro do sistema metabólico de microrganismos, onde atua como precursor de compostos, tais como os fosfolípidos, e como agente regulador de mecanismos bioquímicos intracelulares (Rivaldi et al., 2008; Almeida et al., 2012).

A estrutura molecular e propriedades físico-químicas do glicerol fazem dele um composto com potencial para uma variedade de reações químicas, podendo ser esterificado, reduzido, halogenado, oxidado, entre outros, permitindo a obtenção de diferentes produtos químicos (Umpierre & Machado, 2012; Pradima et al., 2017).

Segundo Kong et al. (2016), até a década de 1930 o glicerol era produzido principalmente por meio de um processo de hidrólise de óleos (*fat-splitting*) na indústria oleoquímica. Entretanto, uma vez que a demanda pelo glicerol foi excedida à época da Primeira Guerra Mundial, sua produção por via fermentativa foi viabilizada por ser considerado um composto estratégico, sendo importante na fabricação de explosivos à base de nitroglicerina (Wang et al., 2001 apud Ciriminna et al., 2014; Kong et al., 2016).

A partir de 1943, o álcool também passou a ser produzido por síntese química pela companhia alemã IG Farben, a partir de matéria-prima petroquímica, consistindo de uma cloração a alta temperatura do propeno para a produção do cloreto de alila (Mota et al., 2009; Kong et al., 2016). No entanto, a partir de 2003, o glicerol sintético perdeu popularidade

frente ao glicerol derivado de fontes renováveis devido à crescente disponibilidade do composto produzido a partir das indústrias de biodiesel e oleoquímica (Ciriminna et al., 2014; Kong et al., 2016). Neste sentido, a indústria de biodiesel é apontada como a principal contribuinte para o excesso de glicerol disponível no mercado (Tan et al., 2013).

O biodiesel é produzido pela reação de transesterificação de triglicerídeos (óleos vegetais ou gorduras animais) com um álcool (etanol ou metanol), na presença de um catalisador (NaOH ou KOH) (Knothe et al., 2006; Luo et al., 2016). Nesse processo, o glicerol, é representado por um volume de aproximadamente 10% (v/v) da reação (Amaral et al., 2009). Entre os principais países produtores de biodiesel encontram-se os Estados Unidos, Brasil, Alemanha, França, Argentina, Holanda e Indonésia (Pradima et al., 2017).

Segundo Garlapati et al. (2016), a estimativa para o mercado mundial de biodiesel até 2016 era de cerca de 140 bilhões de litros, tendo crescimento anual de 42%, fato que, indiretamente, levaria à geração de aproximadamente 14 bilhões de litros de glicerol como subproduto.

Quanto ao Brasil, a partir de 2005, em atendimento à Lei nº 11.097/2005 - que dispõe sobre a introdução do biodiesel à matriz energética brasileira -, o país começou a desenvolver uma produção consistente de biodiesel. Em 2016, através da Lei nº 13.263/2016- que dispõe sobre os novos percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional -, a previsão era de que demanda obrigatória fosse aumentada a um percentual de 9% até março de 2018 e 10% até março de 2019, contudo, o percentual de 10% entrou em vigor em março de 2018.

Sabe-se que o país conta com uma indústria de biodiesel consolidada, composta por 51 usinas produtoras de biodiesel autorizadas para operação pela Agência Nacional de Petróleo - ANP, o que corresponde a uma capacidade total de produção de 22.620,02 m³/dia (ANP, 2018). O Estado do Rio Grande do Sul se destaca como principal produtor de biodiesel do país, obtendo a maior produção acumulada no ano de 2017 (1.135.976 m³) e mantendo-se nesta posição entre os meses de janeiro a maio de 2018 (518.173 m³), representando a região com maior produção de glicerol (ANP, 2018).

O glicerol oriundo da produção de biodiesel é uma mistura que contém, além de glicerol, impurezas como água, óleos, ácidos graxos, metanol ou etanol, sabão, matéria orgânica - não glicerol - e sais, entre outros (Dobson et al., 2012; Tan et al., 2013; Ciriminna et al., 2014; Lou et al., 2016). Os níveis destas impurezas variam de acordo com a matéria prima empregada no processo de transesterificação, o processo de produção do

biodiesel e os métodos de pós-tratamento utilizados (Dobson et al., 2012; Lou et al., 2016). Na Tabela 4 é apresentada a composição do glicerol subproduto obtido a partir de diferentes matérias-primas.

Tabela 4. Composição da solução rica em glicerol, oriundo da indústria de biodiesel, obtido a partir de diferentes matérias-primas.

Composição	Mostarda - Ida Gold*	Mostarda - Pac Gold*	Canola	Óleo de soja	Óleo de fritura
Glicerol (%)	82,8	83,8	75,2	76,2	26,9
Gorduras (%)	2,03	1,11	13,91	7,98	7,98
Proteínas (%)	0,14	0,18	0,08	0,05	0,23
Cinzas (%)	2,8	1,90	0,65	2,73	5,5
Ca (ppm)	11,7	23,0	19,7	11,0	ND
K (ppm)	ND	ND	ND	ND	ND
Mg (ppm)	3,9	6,6	5,4	6,8	0,4
P (ppm)	25,3	48,0	58,7	53,0	12
S (ppm)	21,0	16,0	14,0	ND	19
C (ppm)	24,0	24,3	26,3	26,0	37,7
Na (ppm)	1,17	1,23	1,07	1,2	1,4

Fonte: Modificado de Thompson & He (2006)

* diferentes espécies de mostarda

O glicerol puro é um componente muito utilizado nas indústrias de alimentos, de cosméticos, têxtil e farmacêutica, sobretudo nesta última onde é empregado na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes, emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e antissépticos (Arruda et al., 2007; Pradima et al., 2017). Porém, a utilização do composto para estas aplicações requer uma alta qualidade e pureza, o que limita o aproveitamento do glicerol subproduto para aplicações convencionais (Amaral et al., 2009; Tan et al., 2013).

Diversos autores citam a purificação do glicerol como uma alternativa, com a aplicação de métodos que incluem a filtração convencional, microfiltração, ultrafiltração, destilação simples, destilação a vácuo, tratamentos químicos e físicos, descoloração, técnicas de troca iônica ou adsorção, o que torna o seu uso pouco rentável, devido aos custos associados com as tecnologias empregadas na purificação, que com exceção das usinas de grande porte, são relatados como inviáveis para usinas pequenas e médias (Tan et al., 2013; Luo et al., 2017).

Segundo Tan et al., (2013), o glicerol purificado poderia ser vendido como uma *commodity* por ser uma importante matéria-prima, especialmente na indústria química. No

entanto, ressalta-se que o aumento na produção de biodiesel resultou em uma oferta de glicerol em excesso, causando uma redução em seus preços de mercado, o que reflete no interesse pela purificação do produto devido ao custo operacional associado, desta forma, muitas indústrias passaram a tratá-lo como um resíduo, não sendo atrativa sua purificação para a comercialização (Almeida et al., 2012; Ciriminna et al., 2014).

Por via química é possível converter o glicerol em produtos - os quais tem aplicação em diferentes setores industriais - como: acroleína, monoglicerídeos, poliglicerol, polióis, poliuretanos e ácido láctico, entre outros, através da utilização de catalisadores (Mota et al., 2009; Luo et al., 2016). Segundo Luo et al. (2016), o glicerol subproduto também poderia ser quimicamente convertido em produtos químicos e polímeros de valor agregado, contudo, os autores salientam que as impurezas contidas no glicerol podem impactar na conversão, podendo ter participação nas reações de obtenção dos produtos.

Considerando sua alta geração, como alternativa, o glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono em processos fermentativos industriais, pois tanto o glicerol puro, quanto o glicerol subproduto podem ser biologicamente convertidos por diferentes microrganismos em produtos de valor agregado. Bactérias, leveduras e fungos, em condições aeróbias e anaeróbias, podem obter energia metabólica a partir do glicerol, produzindo metabólitos como: 2,3-butanodiol, hidrogênio, 1,3-propanodiol, etanol, n-butanol, ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico, ácido oxálico, polihidroxialcanoatos (PHA), di-hidroxiacetona (DHA), ácido glicérico, entre outros (Almeida et al., 2012; Tan et al., 2013; Luo et al., 2016; Pradima et al., 2017).

2.3 Bactérias produtoras de 2,3-butanodiol

A biossíntese de 2,3-BDO em células bacterianas é consequência da fermentação ácida-mista característica da maioria dos membros da família Enterobacteriaceae (Białkowska, 2016). Entre os microrganismos produtores de 2,3-BDO encontram-se as bactérias dos gêneros *Klebsiella* (Jansen et al., 1984; Ramachandran et al., 1990; Silveira et al., 1998; Berbert-Molina et al., 2001; Romio, 2014) e *Enterobacter* (Perego et al., 2000; Converti & Perego, 2002; Girardi, 2014).

Historicamente, o gênero *Klebsiella*, foi nomeado por Trevisan em 1885, enquanto o gênero *Enterobacter* foi proposto por Hormaeche e Edwards em 1960, a fim de solucionar problemas com a classificação de linhagens anteriormente identificadas como *Aerobacter*

aerogenes e *Aerobacter cloacae* (Brisse et al., 2006; Grimont & Grimont, 2006; Brady et al., 2013).

Especificamente, as linhagens *K. oxytoca* ATCC 8724 e *E. aerogenes* ATCC 13048 são bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, sem capacidade de esporulação, apresentando-se na forma de bastonetes isolados ou em duplas (Madigan et al., 2016). Ambas são capazes de metabolizar glicerol (Sarma et al., 2013; Metsoviti et al., 2012; Girardi, 2014; Romio, 2014) tendo entre os produtos da fermentação: 2,3-BDO, etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido lático, ácido succínico, acetil-metil-carbinol (acetoína), 1,3-propanodiol, dióxido de carbono e hidrogênio. Porém, a formação destes metabólitos também é dependente das condições de processo aplicadas.

K. oxytoca ATCC 8724 foi anteriormente referida em estudos sobre fermentações como *Aerobacter aerogenes* (Sablayrolles & Goma, 1983), *Klebsiella oxytoca* (Jansen et al., 1984) e *Klebsiella pneumoniae* (Berbert-Molina, 1995). Posteriormente, métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizados em Biologia Molecular permitiram a observação de diferenças entre as linhagens *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, passando esta última denominação a vigorar em trabalhos recentes (Brisse et al., 2006; Romio, 2014).

E. aerogenes ATCC 13048, reclassificada por Hormaeche e Edwards em 1960, foi anteriormente pertencente ao gênero *Klebsiella*, sendo também referida como *Bacillus aerogenes* (Kruse, 1896 apud Grimont & Grimont, 2006), *Aerobacter aerogenes* (Hormaeche & Edwards 1958 apud Grimont & Grimont, 2006) e *Klebsiella mobilis* (Bascomb et al., 1971 apud Grimont & Grimont, 2006). Para Grimont & Grimont (2006), as características e os padrões de utilização de fontes de carbono de *E. aerogenes* são mais próximos àqueles das linhagens de *Klebsiella* do que das linhagens de *Enterobacter*.

Estas linhagens foram empregadas em estudos utilizando açúcares convencionais, como glicose, xilose ou sacarose visando a produção de 2,3-BDO (Pirt & Callow, 1958; Jansen et al., 1984; Ramachandran et al., 1990; Silveira et al., 1998; Berbert-Molina et al., 2001).

A utilização de outras fontes de carbono, como o glicerol é uma alternativa a ser explorada, representando, principalmente, a substituição de insumos. Em fermentações, tanto na via metabólica de *Klebsiella oxytoca*, quanto de *Enterobacter aerogenes*, o glicerol é preferencialmente convertido em 2,3-BDO (Almeida et al., 2012; Girardi, 2014; Romio, 2014).

Diferentes microrganismos produzem distintos estereoisômeros de 2,3-BDO, porém, em cultivos microbianos, geralmente uma mistura de dois estereoisômeros é obtida (Celinska & Grajek, 2009; Białkowska, 2016). Os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* são relatados como produtores dos isômeros 2*S*,3*S*-(+) e *meso*-2,3-BDO (Ji et al., 2011; Jurchescu et al., 2013).

Recentemente, a LanzaTech, empresa que atua no desenvolvimento de tecnologias para produção de combustíveis e químicos renováveis, estabeleceu um processo para produção de 2,3-BDO a partir de monóxido de carbono (CO) atuando em uma instalação piloto com capacidade de 15.000 galões/ano em Glenbrook, Nova Zelândia (Guzman & Chang, 2012; Baumgarten, 2015). A empresa tem como foco a conversão do 2,3-BDO em metil-etil-cetona (MEK) e 1,3-butadieno, um importante monômero na indústria de borracha e plásticos (Guzman & Chang, 2012; Baumgarten, 2015). O processo utilizado pela LanzaTech foi proposto por Kopke et al., (2011). No referido estudo, três bactérias acetogênicas do gênero *Clostridium* (*C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* e *C. ragsdalei*) são relatadas como produtoras de 2,3-BDO a partir da utilização de gases residuais, tais como o monóxido de carbono (CO) ou uma mistura de hidrogênio (H₂) e monóxido de carbono (CO), os quais são empregados como fonte de carbono e energia. Os autores demonstraram que *C. ljungdahlii* é capaz de realizar a biossíntese de 2,3-BDO a partir de monóxido de carbono (Kopke et al., 2011).

2.4 Metabolismo e conversão microbiológica de glicerol por Enterobactérias

O processo fermentativo é um processo de obtenção de energia, ocorrendo como uma forma de reoxidar as coenzimas reduzidas que são formadas durante a glicólise a fim de manter o balanço de redução-oxidação dentro da célula (Madigan et al., 2016). Os elétrons são transferidos das coenzimas para um composto orgânico, fornecendo NAD⁺ (forma oxidada) suficientes para a continuação da glicólise, sendo o composto reduzido geralmente eliminado para o meio externo (Madigan et al., 2016).

Na fermentação de açúcares, a degradação do substrato é normalmente realizada pela via glicolítica, com a produção de piruvato, pois no metabolismo bacteriano, monossacarídeos são primeiro convertidos em piruvato antes da geração dos principais produtos (Ji et al., 2011). Para o crescimento de microrganismos utilizando compostos com baixo número de carbonos, como o glicerol, é requerida a capacidade de sintetizar hexoses necessárias para a produção de mucopeptídeos da parede celular, glicogênio e outros compostos derivados de hexoses (Moat et al., 2002 apud Barbosa, 2009).

O glicerol é considerado uma fonte de carbono assimilável por bactérias sob condições aeróbias e anaeróbias, isto porque trata-se de uma molécula reduzida, abundante e simples, atuando como regulador do potencial redox e na reciclagem de fosfato inorgânico (Rivaldi et al., 2008). Pode ser absorvido pela célula microbiana por difusão facilitada e por ser uma molécula reduzida poderia, teoricamente, resultar em rendimento em produto - no caso, metabólitos microbianos, como o 2,3-BDO -, superior ao obtido quando a glicose é utilizada na fermentação (Dobson et al., 2012; Garlapati et al., 2016). Segundo Kaur et al. (2012), entre as vantagens do uso do glicerol como substrato pode ser considerada a natureza altamente reduzida da molécula, produzindo mais equivalentes redutores do que a glicose ou xilose.

O metabolismo de glicerol em microrganismos inclui duas rotas, oxidativa e redutora (Drozdzyńska et al., 2014). Neste processo, a geração de energia na forma de ATP e equivalentes redutores, na forma de NADH, ocorre na via oxidativa, enquanto a regeneração para NAD^+ ocorre na via redutora (Kaur et al., 2012).

Em condições de anaerobiose, através da via redutora, o glicerol sofre desidratação pela ação da enzima glicerol desidratase dependente da coenzima B_{12} , levando à formação de 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA), posteriormente, este intermediário é convertido pela enzima NADH dependente 1,3-propanodiol desidrogenase em 1,3-propanodiol (Kaur et al., 2012; Wojtusik et al., 2015).

As reações da glicólise até a formação do piruvato são comuns a todos os microrganismos (Biebl et al., 1999), sendo que, ainda em anaerobiose, na via oxidativa, há geração de duas moléculas de piruvato, formando uma molécula de 2,3-BDO. De qualquer maneira, em ambas as vias o objetivo é a regeneração do NAD^+ . No processo de conversão do glicerol a piruvato, há uma produção líquida de duas moléculas de NADH e uma molécula de ATP (Kaur et al., 2012).

Na rota oxidativa, o glicerol pode ser desidrogenado a di-hidroxiacetona (DHA) pela ação da NAD-dependente glicerol-3-fosfato, sendo depois fosforilado a di-hidroxi-acetona-fosfato (DHAP) pela enzima di-hidroxiacetona quinase, podendo ser convertido em alcoóis e ácidos, tais como 2,3-butanodiol, etanol, ácido acético, ácido succínico, ácido láctico e ácido fórmico (Wojtusik et al., 2015; Drozdzyńska et al., 2014). Na via oxidativa, quando o fluxo de carbono é direcionado para a formação de ácidos, ocorre um excesso na disponibilidade de NADH (Drozdzyńska et al., 2014).

Sob condições de disponibilidade de oxigênio, as bactérias irão priorizar o crescimento microbiano e a formação de compostos precursores em seus sistemas metabólicos. Nestas

condições, uma rota alternativa é seguida, em que o glicerol é fosforilado para glicerol-3-fosfato, em reação catalisada pela glicerol quinase (Kaur et al., 2012). Glicerol-3-fosfato é convertido em di-hidroxiacetona fosfato pela glicerol-3-fosfato desidrogenase NAD-dependente (Metsoviti et al., 2012; Silva et al., 2009; Kaur et al., 2012). Após, a produção de 2,3-BDO ocorre com objetivo de reoxidar o NADH produzido na conversão de glicerol em piruvato e prover o microrganismo com energia para a atividade celular (Amaral et al., 2009). Na figura 2 são mostradas as etapas das rotas oxidativas de glicerol a piruvato.

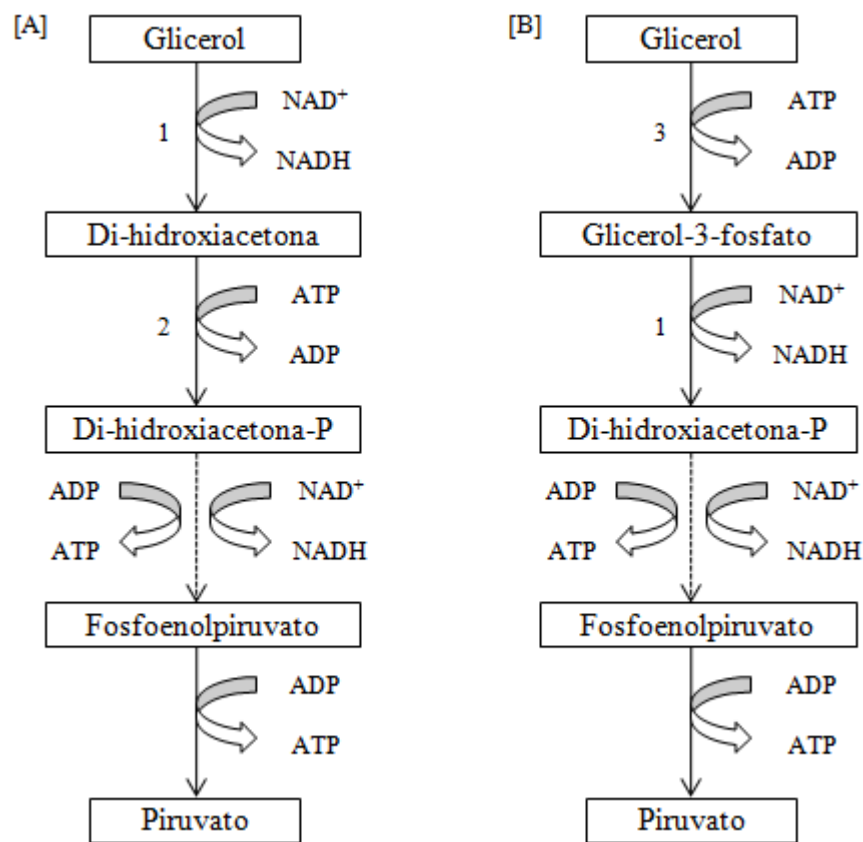


Figura 2. Vias metabólicas de conversão do glicerol em piruvato. [A] maioria dos microrganismos; [B] *Klebsiella sp.* sob condições aeróbias, conforme Kaur et al. (2012). 1-glicerol-3-fosfato desidrogenase; 2-di-hidroxiacetona quinase; 3-glicerol quinase. Girardi (2014), adaptado de Kaur et al. (2012).

A biossíntese de 2,3-BDO envolve três enzimas: α -acetolactato sintase e acetolactato descarboxilase são responsáveis pela formação de acetoína e a NADH-desidrogenase, também conhecida como acetoína redutase, catalisa a conversão de acetoína em 2,3-BDO (Ji et al., 2011). Sob limitação de oxigênio, a α -acetolactato sintase catalisa a condensação de duas moléculas de piruvato com uma única descarboxilação para formar α -acetolactato que é

convertido em acetoína pela ação da acetolactato descarboxilase (Sabra et al., 2015). A acetoína é então reduzida a 2,3-BDO pela ação da acetoína redutase. Sob baixa concentração de oxigênio, o α -acetolactato também pode sofrer uma descarboxilação espontânea, levando à formação de diacetil (Sabra et al., 2015).

Alguns autores consideram que a produção de 2,3-BDO tem significados fisiológicos vitais para os microrganismos, podendo desempenhar um papel importante na prevenção da acidificação intracelular, pela alteração do metabolismo de produção de ácido para a formação de compostos neutros (Booth, 1985 apud Celinska & Grajek, 2009; Ji et al., 2011).

Durante a fermentação, além de 2,3-BDO, outros produtos finais são sintetizados como o lactato, etanol, acetato, formato, succinato, dióxido de carbono e hidrogênio, sendo que a formação destes irá depender das condições impostas, como meio de cultivo, pH, tipo de substrato, microrganismo e suprimento de oxigênio (Zeng & Sabra, 2011; Celinska & Grajek, 2009; Metsoviti et al., 2012). A prevenção da formação de produtos secundários indesejados é importante para o rendimento do produto e para o processamento *downstream* (Zeng & Sabra, 2011). Na Figura 3 são apresentados os produtos que podem ser obtidos a partir de piruvato.

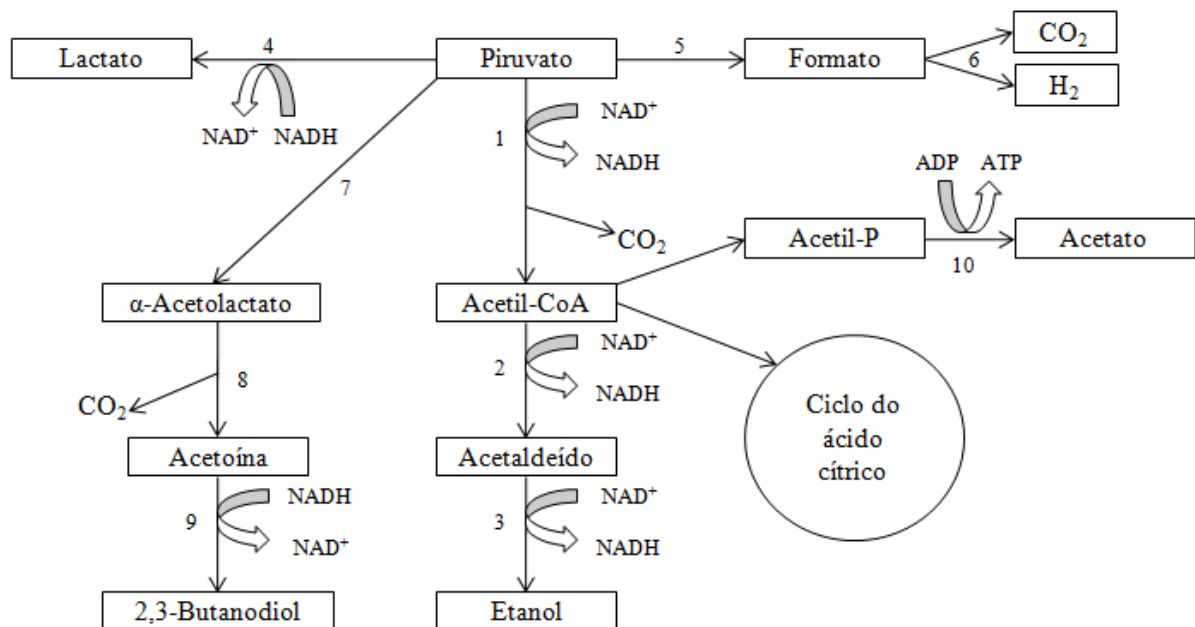


Figura 3. Vias metabólicas de conversão do piruvato em produtos. 1- piruvato desidrogenase; 2- acetaldeído desidrogenase; 3- etanol desidrogenase; 4- lactato desidrogenase; 5- piruvato-formato liase; 6- formato-hidrogênio liase; 7- α -acetolactato sintase; 8- acetolactato descarboxilase; 9- acetoína redutase; 10-acetato quinase. Girardi (2014), adaptado de Ji et al. (2011).

2.5 Bioprodução de 2,3-butanodiol: parâmetros e aspectos dos processos fermentativos

Diversos fatores influenciam a produção fermentativa de 2,3-BDO e, entre estes, a composição do meio de cultivo e o tipo de fonte de carbono afetam diretamente o crescimento microbiano, a ação das enzimas envolvidas no metabolismo e obtenção dos metabólitos de interesse. Além destes, outros parâmetros relacionados à produção de 2,3-BDO também são relatados na literatura, tais como o efeito do pH, temperatura, suprimento de oxigênio e formas de operação do processo, os quais podem estar relacionadas às condições de aeração, agitação e concentração de substrato (Ji et al., 2011).

2.5.1 Características dos meios de cultivo

Em geral, para o favorecimento do crescimento microbiano, o meio de cultivo deve conter água, fornecer uma fonte de energia, assim como fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e quaisquer outros fatores orgânicos de crescimento, como vitaminas e oligoelementos, sendo a escolha dos elementos do meio dependente do microrganismo ou do produto de fermentação desejado (Garg & Jain, 1995; Tortora et al., 2012). Componentes como as peptonas e os extratos de carne e de levedura podem fornecer energia, fatores de crescimento, compostos de carbono e nitrogênio orgânico (Tortora et al., 2012).

Outro aspecto sobre os meios de cultivo a ser considerado é a necessidade de conter substâncias com a função de neutralizar a ação de produtos excretados pelos próprios microrganismos. Um exemplo está relacionado às alterações no meio que podem levar à perda do efeito de tamponamento, como é o caso do metabolismo microbiano com a consequente formação de compostos ácidos, ocasionando quedas do pH, que podem desfavorecer ou até inviabilizar o crescimento microbiano e a formação de produtos (Tortora et al., 2012; Romio, 2014). Assim, a escolha dos componentes do meio deve ser realizada buscando-se obter uma alta produtividade e rendimento com o menor custo possível, contemplando, de forma geral, aspectos biológicos e econômicos.

Os nutrientes utilizados pelos microrganismos podem ser divididos em macro e micronutrientes, sendo necessários em quantidades variáveis (Tortora et al., 2012; Madigan et al., 2016). Os macronutrientes, como C, N, S e P são utilizados para a síntese de macromoléculas como carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Os micronutrientes como Fe, Mg, Mn, Ca, Zn, K, Na, Cu, Cl, entre outros, atuam como componentes de

proteínas, cofatores de enzimas, componentes de estruturas e agentes osmorreguladores, sendo necessários em pequenas quantidades (Tortora et al., 2012; Madigan et al., 2016).

Segundo Li et al. (2013), processos da indústria alimentícia, geram matérias-primas ou resíduos ricos nutricionalmente, como o bagaço de cana de açúcar, água de maceração de milho, palha de trigo, cevada e farelos (arroz, soja, trigo, etc.), que poderiam ser utilizados em bioprocessos de maneira complementar, dependendo do requerimento nutricional do microrganismo.

Diferentes autores abordam a utilização de fontes de nitrogênio orgânico - incluindo a utilização de matérias-primas alternativas - para aumentar a taxa de utilização do glicerol subproduto como substrato na produção de metabólitos (Ito et al., 2005; Sarma et al., 2013; Li et al., 2013). Ito et al. (2005) ao utilizarem o glicerol subproduto para a produção de hidrogênio (H_2) e etanol em cultivo de *E. aerogenes*, identificaram a necessidade da suplementação de alguns nutrientes para a fermentação do glicerol. A adição de 5 g/L de extrato de levedura ou triptona se mostrou eficaz para o aumento da taxa de consumo do glicerol, sugerindo que aminoácidos e vitaminas específicas sejam necessárias para melhorar o crescimento de *E. aerogenes* e a consequente obtenção de produtos.

Sarma et al. (2013) avaliaram a suplementação de diferentes nutrientes em meio contendo glicerol subproduto com o objetivo de aumentar a produção de H_2 por *E. aerogenes* NRRL B407. Entre as matérias-primas selecionadas, resíduos de frigoríficos, resíduos de cervejaria e uréia levaram à obtenção dos melhores resultados de produção de H_2 . No caso da uréia (10 mg/L), a produção cumulativa foi de $116,41 \pm 3,72$ mmol H_2 /L meio, segundo os autores, comparável com outros estudos desenvolvidos com glicerol subproduto. Conforme Sarma et al. (2013), o estudo realizado demonstrou a substituição da grande quantidade de nutrientes de custo elevado e de agentes tamponantes por quantidade insignificantes de diferentes matérias-primas sem comprometer o rendimento de H_2 .

Para a produção de 2,3-BDO também é relatado o uso de fontes de nitrogênio. No estudo de Li et al. (2013) milhocina em pó (CSLP), uma fonte de nitrogênio de baixo custo, foi utilizada para produção de 2,3-BDO pela bactéria *Bacillus licheniformis* a partir de glicose. No entanto, quando as concentrações, previamente estabelecidas, de extrato de levedura, peptona e extrato de carne foram totalmente substituídas por CSLP, foi observada a redução da concentração de 2,3-BDO de 30 para 19 g/L. Para a obtenção de maior concentração de 2,3-BDO a partir de CSLP, os autores associaram a utilização do extrato de levedura. Nesta condição, para concentrações de glicose de 90 g/L suplementada com 5,8 g/L

de extrato de levedura e 14,7 g/L de CSLP, foram alcançadas concentrações de 42 g/L de 2,3-BDO em regime descontínuo.

Ma et al. (2009) realizaram a otimização de um meio de cultivo a base de glicose para aumentar a produção de 2,3-BDO por *K. pneumoniae* SDM. Milhocina em pó (CSLP) e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ foram identificados como os fatores mais significativos em um planejamento Plackett & Burman (1946) em dois níveis. Posteriormente, a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) com um planejamento baseado no delineamento composto central (DCC) foi empregada para determinar os níveis ideais dos dois elementos. Os autores relataram a obtenção de 150 g/L de 2,3-BDO, atingida em 38 h de fermentação, com uma produtividade de 4,21 g/L/h. Os resultados foram alcançados com a estratégia de alimentação contínua em processo conduzido em regime descontínuo alimentado com S_0 de 70 g/L em meio de cultivo definido como (g/L): glicose, 70; CSLP 8,27; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 4,91; CH_3COONa , 3; KCl , 0,4; MgSO_4 , 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01.

Embora existam estudos que abordam o uso de fontes de nitrogênio orgânico e/ou fatores de crescimento para a utilização do glicerol ou para a produção de 2,3-BDO (Ito et al., 2005; Sarma et al., 2013; Li et al., 2013), em geral, espécies do gênero *Klebsiella*, podem crescer em meios relativamente simples, contendo íons amônio ou nitrato como única fonte de nitrogênio e uma fonte de carbono, sem a necessidade da adição de fatores de crescimento (Grimont et al., 2006). Além disso, linhagens do gênero *Enterobacter* possuem padrões de utilização de fontes de carbono e nutrientes muito semelhantes às linhagens de *Klebsiella* (Grimont et al., 2006).

Berbert-Molina et al. (2001) estabeleceram o processo para obtenção de 2,3-BDO por fermentação com *K. pneumoniae* em meio contendo sacarose - proveniente do caldo de cana-de-açúcar - e fosfato de amônio como o único suplemento nutricional. O meio continha cerca de 180 g/L de sacarose e 8,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, sendo obtidos 70 g/L de 2,3-BDO/acetoina no processo em regime descontínuo. Os resultados gerais do estudo conduzido somente com sacarose e fosfato de amônio foram semelhantes aos resultados obtidos com o meio controle utilizado, o qual se tratava de um meio mineral com diversos sais constituintes.

2.5.2 Glicerol subproduto da síntese de biodiesel como substrato para produção de 2,3-butanodiol

O uso do glicerol subproduto tem sido apontando como uma possibilidade de redução de custos em fermentações em substituição a outros substratos convencionais

(Dobson et al., 2012; Koutinas et al., 2016). Os autores têm estudado a utilização, tanto, do glicerol puro, quanto, subproduto, incluindo estudos comparativos a fim de estabelecer as condições ideais para a condução de processos fermentativos e a produção de diferentes metabólitos, entre eles o 2,3-BDO (Ito et al., 2005; Girardi, 2014; Romio, 2014; Metsoviti et al., 2012; Yang et al., 2013; Sarma et al., 2013).

Girardi (2014) e Romio (2014) destacaram a obtenção de resultados de produção de 2,3-BDO e acetoína análogos aos obtidos com outras fontes de carbono - como glicose, xilose e sacarose - com o uso de glicerol puro em cultivos em regime descontínuo e descontínuo alimentado de *E. aerogenes* e *K. oxytoca*, respectivamente.

O glicerol subproduto contém várias impurezas, como álcoois, sais, metais e sabões, sendo a sua composição o principal problema associado à utilização como substrato (Dobson et al., 2012). O impacto destas características deve ser adequadamente investigado, sendo necessário - e também vantajoso - que o microrganismo utilizado mostre pouca sensibilidade frente às impurezas presentes no meio (Dobson et al., 2012).

Thompson & He (2006) caracterizaram o glicerol subproduto proveniente da fabricação de biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas. Os autores observaram a presença de íons como cálcio (Ca^{2+}), potássio (K^+), magnésio (Mg^{2+}), fósforo (P^{3-}) e enxofre (S^{2-}) em pequenas quantidades, além de um total de 60 a 70% de glicerol e quantidades de sódio (Na^+) usualmente elevadas, relacionadas à utilização deste composto como catalisador.

Yang et al. (2013) avaliaram a capacidade de crescimento e formação de 2,3-BDO por *B. amyloliquefaciens* em meios de cultivo contendo glicerol puro e subproduto. A concentração inicial da fonte de carbono foi 40 g/L para evitar a inibição pelo substrato. Os resultados obtidos foram semelhantes, tanto para o consumo do glicerol puro, quanto glicerol subproduto, quanto para produção de BDO, ficando entre de 38,6 e 36,7 g/L para consumo do glicerol e 11,47 e 11,86 g/L para formação de produto. Os autores concluíram que na concentração estudada o crescimento e metabolismo não foram afetados pelo tipo de glicerol fornecido.

Metsoviti et al. (2012) em seu estudo sobre a produção de 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol e etanol por *K. oxytoca*, também avaliaram o impacto de concentrações crescentes de glicerol subproduto na composição final de metabólitos microbianos. Foi destacado que a presença de 150 a 170 g/L de glicerol subproduto não foi suficiente para cessar o crescimento microbiano, porém houve redução da formação de produtos. A concentração de 120 g/L de glicerol foi considerada como o limite acima do qual o consumo de glicerol e a formação de produtos foram limitados pela linhagem utilizada no estudo. Os

autores também relataram que o acúmulo de impurezas provenientes do glicerol subproduto pode ter impedido o consumo deste ou a linhagem utilizada pode não ter sido capaz de assimilar quantidades superiores a 100 g/L de glicerol.

Koutinas et al. (2016) apresentaram uma avaliação econômica sobre a produção de 2,3-BDO a partir de diferentes substratos, entre eles, o glicerol. Para a avaliação, foi proposta uma planta com capacidade produtiva de 10.000 t/ano de 2,3-BDO, operando continuamente, por cerca de 8.300 h/ano. O preço dos substratos avaliados - na data do estudo - ficava em torno de 300 US\$/t para o glicerol puro e 400 US\$/t para sacarose e melação de cana. Os autores relataram que, considerando os custos totais dos suplementos nutricionais - sais minerais - pelo período de um ano, a produção do diol a partir do melação de cana seria mais onerosa do que a produção a partir do glicerol puro, pois os custos totais das matérias-primas necessárias para os processos com glicerol puro, sacarose e melação, foram de 2,1, 5,7 e 9,1 milhões de dólares por ano, respectivamente. No estudo, a utilização do glicerol subproduto também é sugerida como uma possibilidade de redução significativa nos custos globais do processo, desde que uma eficiência de fermentação semelhante aos demais substratos estudados possa ser alcançada (Koutinas et al., 2016).

2.5.3 Influência do pH do meio de cultivo

O pH é fundamental na regulação e no controle do metabolismo microbiano, sendo portanto, parâmetro do processo que tem influência sobre a produção de 2,3-BDO. Segundo Sabra et al. (2015), a avaliação do pH é importante na produção do 2,3-BDO dada sua função biológica, pois pode vir a desempenhar um papel relevante na prevenção da acidificação intracelular. Em geral, condições alcalinas (acima de 6,3-6,5) favorecem a formação de ácidos orgânicos com a redução simultânea no rendimento em diol (Garg & Jain, 1995; Celinska & Grajek, 2009; Sabra et al., 2015). No entanto, o pH mais favorável para a produção de 2,3-BDO depende do microrganismo e do substrato utilizado (Sabra et al., 2015).

Biebl et al. (1998) estudaram a produção 2,3-BDO e 1,3-propanodiol (PDO) por *K. pneumoniae* DSM 2026 utilizando glicerol como fonte de carbono. Em cultivos contínuos nos quais o pH foi reduzido gradualmente de 7,3 para 5,4, a formação de 2,3-BDO foi observada a partir de pH 6,6 e rendimento máximo foi atingido com pH 5,5, com a redução simultânea na formação de acetato e etanol.

Perego et al. (2000) avaliaram a produção de 2,3-BDO por *E. aerogenes* em cultivos conduzidos com glicose. Como resultados, quanto ao efeito das variações de pH na produção

do diol, os autores relataram que na faixa de pH entre 5,5 e 6,0, os fatores de conversão de substrato em produto se mantem praticamente constantes e diminuem acentuadamente em valores mais baixos ou mais altos de pH. Além disso, segundo os autores, sob condições ácidas em excesso, a fermentação para rapidamente devido à inibição da biomassa. Os autores também sugerem que o pH 6,0 pode ser considerado o mais favorável para a produção de 2,3-BDO.

Petrov & Petrova (2010) estudaram os efeitos das variações forçadas de pH na produção de 2,3-BDO por *K. pneumoniae* a partir de glicerol em regime descontínuo alimentado. A partir de um pH inicial 8,0, as variações foram realizadas através da elevação do pH do cultivo com um valor ΔpH definido (1, 2 ou 3) em intervalos de tempo determinados (6, 12 e 24 h). A maior produtividade em 2,3-BDO (0,57 g/L/h) foi atingida com $\Delta\text{pH} = 3,0$ em função da alta taxa de consumo de glicerol (1,6 g/L/h), alcançando-se 54 g/L de 2,3-BDO. Nesta condição, a redução natural do pH inicial 8,0 foi observada durante um intervalo de tempo de 24 h, e, a cada 24 h, este era elevado através da adição de NaOH 5 mol/L mantendo-se entre 5,0 e 6,5 durante a maior parte do processo.

Wong et al. (2014) avaliaram os efeitos do pH na produção do 2,3-BDO por *Klebsiella sp.* Zmd30 com concentração inicial de glicose de 146 g/L. Os ensaios foram realizados em um intervalo de pH entre 4,5 e 9,0, nos quais o pH 6,0 foi mais favorável ao processo. Os resultados também indicaram que a composição dos metabólitos produzidos é altamente relacionada com o valor de pH, pois nos ensaios com pH 6,0 foi obtida a maior concentração de 2,3-BDO, em torno de 52 g/L, com produtividade de 2,10 g/L/h. A produção de lactato e acetato foram favorecidas com o controle do pH em valores superiores a 6,0.

No estudo de Romio (2014) no qual utilizou-se a linhagem *K. oxytoca* ATCC 8724, o controle de pH foi avaliado em ensaios conduzidos em frascos agitados com uma concentração inicial de 20 g/L de glicerol puro. O autor utilizou o carbonato de cálcio (CaCO_3) como agente tamponante. Segundo Romio (2014), valores de pH próximos de 4 podem causar a limitação da formação de biomassa em função da formação de compostos ácidos nesta etapa de crescimento e, conseqüentemente, a limitação da formação do diol.

2.5.4 Efeito da temperatura na produção de 2,3-butanodiol

A eficiência de bioprocessos também é estritamente dependente da temperatura, em virtude da relação desta com a atividade enzimática e a manutenção celular (Magee & Kosaric, 1987; Garg & Jain, 1995; Celinska & Grajek, 2009).

Perego et al. (2000) avaliaram o efeito da temperatura sobre a fermentação com *E. aerogenes* em ensaios conduzidos utilizando glicose para determinação das condições adequadas de operação do processo fermentativo. Neste estudo, as temperaturas foram variadas entre 23 e 46°C e a temperatura de 39°C assegurou a produtividade em diol (2,3-BDO) mais elevada (0,36 mmol/L/h).

Em outro estudo, Perego et al. (2003) estudaram o efeito da temperatura sobre a produção de 2,3-BDO por *B. licheniformis* NCIMB 8059 a partir de diferentes fontes de carbono - glicose, sacarose e amido de milho hidrolisado -. As fermentações foram realizadas com pH 6,0 e as temperaturas variaram de 34 a 40°C. Entre as condições avaliadas, os autores identificaram que a melhor temperatura para a produção de 2,3-BDO foi 37°C, tendo sido estabelecida em ensaios contendo glicose.

Becker et al. (2013) realizaram ensaios com *E. aerogenes* ATCC 13048 em frascos agitados nos quais foram avaliadas temperaturas entre 28 e 37°C com glicerol puro como substrato de fermentação. Como resultados, as máximas velocidades específicas de crescimento microbiano (μ_{xm}) atingidas foram 0,56, 0,60, 0,77, 0,74 e 0,77 h⁻¹ nos cultivos em temperaturas de 28, 30, 32, 34 e 37°C, respectivamente. Segundo os autores os resultados obtidos demonstraram que em temperaturas a partir de 32°C até 37°C, este parâmetro não interferiu nos resultados de μ_{xm} .

Em geral, temperaturas entre 30 e 35°C são consideradas favoráveis para a fermentação bacteriana, sendo essa a faixa de rendimento máximo em biomassa, contudo, diferentes linhagens podem possuir diferentes temperaturas ideais para seu desenvolvimento e para a utilização de diferentes substratos (Celinska & Grajek, 2009). Segundo Magee & Kosaric (1987), as condições ideais para o máximo rendimento em biomassa (30-35 °C) se aproximam das condições ideais para obtenção do 2,3-BDO, uma vez que a produção do diol é semi-associada ao crescimento microbiano.

2.5.5 Efeito do suprimento de oxigênio

De uma forma geral, com a utilização de linhagens bacterianas anaeróbias facultativas, observa-se a influência do suprimento de oxigênio na formação de biomassa e esta pode afetar de forma direta ou indireta a produção de metabólitos. Conforme Schmidell et al. (2001), para processos fermentativos envolvendo o cultivo de microrganismos anaeróbios facultativos, tanto em modo descontínuo, quanto descontínuo alimentado é exigido um adequado dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio. Tais microrganismos podem

obter energia por duas vias diferentes: respiração e fermentação e, quando o suprimento de O_2 é limitado, ambas as vias podem estar ativas simultaneamente (Celinska & Grajek, 2009).

Schmidell et al. (2001) explica que do ponto de vista bioquímico o microrganismo irá consumir o oxigênio disponível no meio para a respiração, sendo o O_2 o último elemento a aceitar elétrons ao final da cadeia respiratória. Desta forma, o fornecimento de O_2 ao cultivo permite que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação ao longo da glicólise e do ciclo de Krebs e o armazenamento de energia através da geração de moléculas de ATP, as quais irão participar das reações de síntese de outras moléculas, para o crescimento e manutenção celular (Magee & Kosaric, 1987; Schmidell et al., 2001). Schmidell et al. (2001) destaca ainda, haver a necessidade do fornecimento de O_2 ao longo de todo o processo fermentativo, isto devido à baixa solubilidade deste elemento no meio; desta forma a obtenção de elevadas concentrações de produto é limitada pela capacidade de transferência do O_2 para a fase líquida ao longo dos cultivos, especialmente quando há concentrações celulares elevadas.

Além disso, em se tratando da produção de 2,3-BDO, o suprimento de oxigênio é uma variável importante no cultivo e para a conseqüente formação deste composto, sendo que o diol é produzido sob baixa oferta de O_2 (Celinska & Grajek, 2009). Na biossíntese de 2,3-BDO estão envolvidas três enzimas: acetolactato sintase e acetolactato descarboxilase, responsáveis pela formação de acetoína, e NADH-desidrogenase, que converte a acetoína em 2,3-BDO. Em condições aeróbias, a acetolactato sintase, é inativada, cessando assim a formação de 2,3-BDO, no entanto, condições de micro-aeração favorecem a formação de 2,3-BDO (Ji et al., 2011).

O alto suprimento de oxigênio pode favorecer o crescimento microbiano, com redução simultânea na produção de 2,3-BDO e, por outro lado, um baixo suprimento pode ocasionar baixas concentrações celulares, levando a uma redução da velocidade global do processo e, conseqüentemente, da produtividade (Silveira et al., 1993; Berbert-Molina, 1995; Silveira et al., 1998; Celinska & Grajek, 2009).

No estudo realizado por Silveira et al. (1993) foi avaliada a influência do suprimento de oxigênio através da variação dos valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) em cultivos realizados com *K. pneumoniae* NRRL B199. Em meio contendo 40 g/L de sacarose, observou-se o aumento nos valores de biomassa obtidos conforme o aumento do valores de K_{La} entre 8 e 620 h^{-1} . Os autores também relataram que a produção de 2,3-BDO foi reduzida em valores de K_{La} mais altos. Além disso, para valores de K_{La} maiores,

houve um incremento da porção de acetoína no meio de cultivo, uma vez que a reação foi favorecida.

Silveira et al. (1993), de maneira análoga a outros autores, propõe diferentes fases na cinética do processo fermentativo para produção de 2,3-BDO. Dependendo do fornecimento de O_2 para o cultivo, três fases podem ocorrer durante a fermentação, a saber, fase não limitada, limitada e hiperlimitada em oxigênio. Na fase não limitada, o crescimento celular é exponencial e a formação de 2,3-BDO depende do valor de K_{La} ; na fase limitada, o crescimento celular torna-se linear e a formação do diol tem suas máximas velocidades específicas cujos valores são função do K_{La} ; na fase hiperlimitada, o crescimento celular é interrompido e a formação do diol tem sua velocidade reduzida.

Yen et al. (2014) estudaram os efeitos do oxigênio dissolvido (O_2) na distribuição de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e 2,3-butanodiol produzidos a partir de glicerol por um isolado de *Klebsiella* sp. Ana-WS5. Os ensaios foram conduzidos em regime descontínuo com um S_0 de 70 g/L, sendo mantidos em níveis de saturação de 80 e 20% para alta e baixa disponibilidade de O_2 , respectivamente. Os resultados indicaram que o nível de O_2 é um fator determinante na distribuição dos dióis, demonstrando que alta disponibilidade de O_2 foi benéfica para a produção de 2,3-BDO, enquanto a baixa disponibilidade poderia aumentar a produção de 1,3-PDO. Os autores ressaltaram que isso pode ser devido a uma atividade superior da enzima glicerol desidratase em baixa disponibilidade de O_2 , favorecendo a formação de 1,3-PDO.

2.6 Planejamento experimental e otimização de processos

Segundo Lu & Hanrahan (2006) a combinação de metodologias de planejamento experimental e otimização através de métodos multivariados, nos quais os pesquisadores possam extrair do sistema em estudo o máximo de informações a partir de um número mínimo de experimentos é de fundamental importância para a tomada de decisão apropriada. Além disso, os autores ressaltam que os métodos univariados são demorados, uma vez que a resposta é investigada para cada fator, enquanto todos os outros fatores são mantidos a um nível constante, sendo esta abordagem relativamente simples e adequada para fatores independentes (Lu & Hanrahan, 2006). No entanto, os métodos univariados não consideram efeitos de interação entre os fatores e, se os efeitos são de natureza aditiva, os projetos experimentais são a escolha ideal, exigindo um número inferior de medições (Lu & Hanrahan, 2006).

As metodologias de superfície de resposta (MSR) são técnicas multivariadas que matematicamente ajustam o domínio experimental estudado no *design* teórico através de uma função de resposta, sendo especialmente úteis para a concepção de experimentos, construção de modelos, avaliação dos efeitos dos fatores estudados e otimização destes fatores na busca pelas respostas desejadas (Myers, 1971 apud Lu & Hanrahan, 2006; Box et al., 1987 apud Lu & Hanrahan, 2006).

A MSR é amplamente utilizada para desenvolver, melhorar e otimizar processos e produtos, consistindo de três fases distintas: a) *screening* (triagem): tem como objetivo avaliar quais as principais variáveis que causam efeitos estatisticamente significativos; b) modelagem: tem como objetivo de modelar a resposta em função dos fatores avaliados; c) otimização: o modelo de superfície de resposta é analisado para determinar a configuração das variáveis que proporciona as condições ótimas de processo (Costa et al., 2011).

Os dois desenhos mais comuns geralmente utilizados na modelagem de superfície de resposta são o Delineamento Composto Central (DCC) e *Box-Behnken design* (BBD), para três ou cinco níveis distintos (Lu & Hanrahan, 2006). O *Box-Behnken design* é considerado uma opção eficiente em metodologia de superfície de resposta e uma alternativa ideal ao delineamento composto central (Otto, 1999 apud Lu & Hanrahan, 2006). O planejamento BBD, combina um fatorial fracionário com projetos de blocos incompletos de forma a evitar os vértices extremos e a apresentar um *design* aproximadamente rotativo com apenas três níveis por fator (Lu & Hanrahan, 2006).

Estes experimentos em três níveis são eficientes para modelar superfícies de resposta de segunda ordem fornecendo dados e informações suficientes para o teste de falta de ajuste (*lack-of-fit*) e, uma vez que são empregados apenas três níveis para cada fator, não havendo pontos de vértices, podem ser largamente aplicados quando há restrições físicas, de equipamentos ou por questões econômicas, gerando um número menor de ensaios.

Frequentemente, no desenvolvimento de processos fermentativos é listado um grande número de variáveis a serem ponderadas, principalmente em se tratando da formulação de um meio de cultivo para a obtenção de determinado bioproduto. Sendo assim, as metodologias de superfície de resposta podem ser exploradas para determinar condições ótimas ou verificar a sensibilidade da variável resposta avaliada aos efeitos da mudança nos níveis dos fatores estudados, sendo úteis quando é desejada a otimização de um processo em que ocorre a influência de vários fatores.

Para Costa et al. (2011), o grande número de variáveis a serem avaliadas são comuns em vários campos da ciência e, muitas vezes, envolvem respostas incomensuráveis e

conflitantes que, em certo sentido, devem ser otimizadas simultaneamente, porque sua análise separada pode resultar em soluções incompatíveis. Neste caso a determinação de condições ótimas das variáveis de entrada exigiriam a consideração simultânea de todas as respostas avaliadas (Kim & Jeong, 2009). A otimização de múltiplas respostas é uma estratégia amplamente utilizada na MSR através das funções desejabilidade (*desirability*), as quais podem ter diferentes abordagens (Costa et al., 2011).

A função desejabilidade (*desirability*) para maximizar uma resposta ou respostas múltiplas, baseia-se na premissa de que para cada resposta $Y_i(x)$, uma função desejabilidade $d_i(Y_i)$ assume valores entre 0 e 1 para os possíveis valores de Y_i . Assim, a abordagem da função desejabilidade transforma uma resposta estimada (por exemplo, a *i-ésima* resposta estimada \hat{Y}_i) em um valor sem escala, que assume valores entre 0 e 1, aumentando à medida que o valor da resposta correspondente torna-se mais desejável (Kim & Jeong, 2009).

As desvantagens individuais são então combinadas através da média geométrica das desejabilidades (d_i) para cada resposta avaliada (Y_i), fornecendo a desejabilidade geral D do modelo, que pode ser expressa pela Equação 1.

$$D = (d_1(Y_1)d_2(Y_2) \dots d_k(Y_k))^{1/k} \quad (1)$$

Onde:

k – denota o número de respostas avaliadas.

Sendo a desejabilidade geral D, também entre 0 e 1, definida pela combinação dos valores individuais desejáveis (d_i), então, a configuração ideal é determinada pela maximização de D (Kim & Jeong, 2009).

Ma et al. (2009) utilizaram o delineamento experimental sequencial para desenvolver um meio de fermentação adequado tendo como objetivo aumentar a produtividade em 2,3-BDO pela linhagem *K. pneumoniae*. A metodologia aplicada consistia em um planejamento Plackett & Burman (1946) associado à Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) baseada no Delineamento Composto Central (DCC).

De maneira semelhante, muitos autores tem aplicado métodos de planejamento experimental, tanto para otimização de meios de cultivo quanto para otimização de outras variáveis de processo ou ainda, para ambos, entre os quais citam-se: Jo et al. (2008), Li et al. (2013), Chookaew et al. (2014), Mangayil et al. (2015), entre outros.

2.7 Metodologias analíticas para determinação de substratos e produtos em fermentação

É de fundamental importância a avaliação do processo fermentativo para a obtenção de 2,3-BDO de uma forma global, havendo a necessidade da quantificação de produtos, co-produtos e substratos. Ressalta-se também que o desenvolvimento de um método analítico que permita a quantificação - através de um único método - de produtos e substratos, entre outros compostos que possam estar presentes nos meios de cultivo, torna o monitoramento de processos fermentativos rápido, prático e econômico.

A quantificação de glicerol em amostras com características distintas e para diferentes finalidades tem sido descrita através de variadas metodologias, incluindo métodos cromatográficos e espectrofotométricos (Bondioli & Bella, 2005; Valdez et. al, 2012; Marques et. al, 2011; Bompelly & Skaf, 2014).

Segundo Valdez et. al (2012), entre os procedimentos disponíveis para análise de glicerol livre (GL) e total (GT), em que, o somatório do conteúdo de glicerol livre e das parcelas mono-, di- e triglicerídeos, potencialmente ligáveis é denominado GT, os métodos cromatográficos e enzimáticos oferecem os melhores desempenhos analíticos. Ainda, segundo os autores, a cromatografia em fase gasosa (CG) é a técnica recomendada pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) para a determinação de glicerol em amostras de biodiesel, pois apresenta boa sensibilidade para a quantificação de componentes minoritários (Valdez et al., 2012).

Os métodos espectrofotométricos, baseados na oxidação do glicerol e quantificação indireta através do formaldeído têm sido propostos como alternativa aos métodos cromatográficos, por oferecerem rapidez na etapa de quantificação e por apresentarem custos inferiores aos métodos cromatográficos (Marques et al., 2011). Diversos métodos para determinação de glicerol envolvem alguma variação da oxidação de glicerol com periodato (de sódio ou potássio), a qual produz formaldeído e ácido fórmico e a subsequente quantificação destes produtos por meios volumétricos ou colorimétricos (Bompelly & Skaf, 2014).

Lambert & Neish (1950) relataram um método para determinação de glicerol em fermentações baseado na quantificação do formaldeído formado pela reação de oxidação do glicerol com periodato de sódio. Segundo os autores, o glicerol proporciona maior rendimento em formaldeído do que qualquer outro composto. O formaldeído é quantificado após reação com ácido cromotrópico (ácido 1,8-dihidroxi-naftaleno-3,6-dissulfônico) o qual é específico

para formaldeído mesmo na presença de outros aldeídos. O excesso de periodato é removido pela adição de arsenito de sódio. Os percentuais de recuperação para o método proposto por Lambert & Neish (1950) permaneceram entre 96,5 e 101,8% para amostras de fermentação e nos ensaios de reprodutibilidade o desvio padrão relativo (DPR) foi inferior a 2,5%.

Bondioli & Bella (2005) desenvolveram um método espectrofotométrico para a determinação de glicerol livre em biodiesel. No método, após a oxidação do glicerol com metaperiodato de sódio por 30 segundos, o formaldeído produzido reage com acetilacetona, a uma temperatura controlada de 70°C durante 1 minuto. A reação com a acetilacetona, conhecida como reação de Hantzsch, produz o composto de coloração amarela 3,5-diacetil-1,4-diidrolutidina que pode ser quantificado por espectrofotometria a 410 nm. As recuperações obtidas para a análise de cinco amostras do padrão oscilaram entre 89 e 100%.

Os autores Bompelly & Skaf (2014) relataram um método para determinação de glicerol em solução baseados na oxidação do glicerol com periodato de sódio, redução do excesso de periodato com iodeto de potássio e tiosulfato de sódio e, quantificação do formaldeído pela reação de Hantzsch. Os testes foram realizados com a utilização de padrões e amostras de glicerol subproduto. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram uma linearidade do método para concentrações entre 0,02 e 0,25 mM de glicerol. E a presença de impurezas como o metanol e hidróxido de sódio no glicerol subproduto não afetaram a análise, além de ser demonstrada pouca sensibilidade do método para dissacarídeos e/ou monossacarídeos que possam estar presentes nas amostras.

Em paralelo, diversos autores têm utilizado a coluna Aminex HPX-87H para determinação de 2,3-butanodiol, acetoina e diferentes substratos em fermentações, incluindo glicerol, através da cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) com pequenas variações nas metodologias empregadas (Garcia, 2006; Ji et al., 2009; Petrov & Petrova, 2010; Metsoviti et al., 2012; Jurchescu et al., 2013; Priya et al., 2016). Contudo, a maioria dos autores não apresenta métodos devidamente validados para tal finalidade.

Os métodos cromatográficos são métodos físico-químicos de separação, que se fundamentam na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (Marques et. al, 2011). Dessa forma, permitem que os compostos sejam quantificados desde que haja interação das espécies estudadas com as fases móvel e estacionária.

Parpinello & Versari (2000), aplicaram a CLAE com um detector de índice de refração (IR) para determinação de glicose, glicerol e metanol em meios complexos durante

fermentações de *Hansenula polymorpha*. Os autores utilizaram a coluna Aminex FOA, fase móvel de H_2SO_4 0,01 mol/L, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 60°C, obtendo resultados de repetibilidade de 1,2, 2,5 e 1,9 % para glicose, glicerol e metanol, respectivamente.

Du et al. (2009) relataram a determinação de glicose, xilose e metabólitos em fermentações para a produção de 2,3-BDO utilizando a coluna de troca iônica Aminex HPX-87H e detector IR para cromatografia. Os autores relataram que com fase móvel de H_2SO_4 5 mmol/L, fluxo de 0,5 mL/min e temperatura da coluna de 65°C, os co-substratos (glicose e xilose) e metabólitos (2,3-BDO, acetoína, etanol, ácido acético, ácido láctico e ácido fórmico) foram completamente separados e determinados através das respectivas áreas de cada pico, com coeficientes de correlação entre 0,9990 e 0,9999 e percentuais de recuperação entre 98,8% e 103,2%.

Com relação ao conteúdo de glicerol, quando este é utilizado como substrato em processos fermentativos é imprescindível a utilização de metodologias que apresentem facilidade de execução e forneçam resultados rapidamente tendo em vista o controle e monitoramento de fermentações em tempo real, tais como os métodos espectrofotométricos.

No entanto, cabe ressaltar que a maioria dos métodos propostos utiliza o periodato (de sódio ou potássio) como agente oxidante e, uma vez que o periodato cliva muitos compostos orgânicos contendo grupos vicinais hidroxila, grupos carbonila ou um grupo amino (Malaprade, 1934 apud Bradford et. al, 1942; Stewart, 1964 apud Speckman & Collins, 1982), o 2,3-BDO, principal produto desta fermentação, pode ser incluído como possível interferente nas metodologias abordadas, pois pode sofrer clivagem a acetaldeído pela ação do periodato (Speckman & Collins, 1982). Assim, torna-se também importante a utilização da metodologia cromatográfica a fim de fornecer dados mais precisos quanto às concentrações de glicerol e dos produtos de fermentação estudados. Além disso, para garantir a confiabilidade de determinado método analítico, este deve ser submetido a uma etapa de validação, a qual pode ser realizada conforme preconiza a Resolução RDC nº 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2017).

2.8 Metodologias analíticas para a determinação de fosfatos em fermentação

O fosfato de amônio é um sal solúvel em água e praticamente insolúvel em acetona e etanol. Em meios de cultivo, é utilizado como fonte de nitrogênio e fósforo para o crescimento microbiano, uma vez que fornece íons inorgânicos fosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) que serão utilizados para síntese de ácidos nucleicos e ATP e, nitrogênio amoniacal (NH_4^+)

que será precursor na formação de aminoácidos e outros compostos celulares. As diferentes funções desempenhadas por estes elementos no crescimento microbiano e formação de produtos torna essencial o monitoramento das concentrações elementares dos diferentes sais presentes nos meios de cultivo.

Worsfold et al. (2016) em uma revisão sobre a determinação de diferentes espécies de fósforo em águas naturais, relatam que a maioria dos métodos para determinação de fósforo é baseada na detecção espectrofotométrica do fosfomolibdênio azul (PMB). Em geral, os métodos químicos para determinação de fosfatos consistem na complexação de íons de molibdato com fosfato reativo solúvel (SRP) em meio ácido (Strickland & Parsons, 1972 e Grasshoff et al., 1999 apud Haberer & Brands, 2003; Worsfold et al., 2016). Este complexo (fosfomolibdato) é então reduzido a um complexo azul (azul de molibdênio) na presença de um agente redutor como o ácido ascórbico, podendo ser quantificado por espectrofotometria (McKelvie et al., 1995 apud Haberer & Brands, 2003).

Contudo, técnicas em que a cromatografia pode ser aplicada têm sido desenvolvidas e empregadas com sucesso (Koshiishi & Imanari, 1985; Haberer & Brands, 2003). Porém, quando a especiação do fósforo contido nas amostras é necessária, detectores seletivos devem ser utilizados. Usualmente, quando o detector escolhido trata-se do espectrômetro de massas, alguns autores realizam a separação por cromatografia (Valls-Cantenys et al., 2012). Variações entre a cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-ICP-MS) e cromatografia em fase líquida e espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) tem sido empregadas (Guo et al., 2005; Valls-Cantenys et al., 2012). Os detectores ICP apresentam alta seletividade para os compostos de fósforo e faixas lineares muito amplas, dessa forma, não sendo necessário diluir as amostras mais concentradas e, alta compatibilidade com as fases móveis mais utilizadas em cromatografia líquida (Valls-Cantenys et al., 2012).

Koshiishi & Imanari (1985) empregaram um método para determinação de fosfatos (P) e silicatos (Si) a partir de seus molibdocomplexos (fosfomolibdato e silicomolibdato) em amostras de urina e plasma humano por CLAE com uma coluna Styragel 60A e um detector UV. O procedimento consistia na obtenção dos molibdocomplexos pela adição de soluções de H_2SO_4 0,2 mol/L às amostras e posterior análise por cromatografia. Como fase móvel os autores utilizaram uma solução de acetonitrila 55% (v/v) contendo tetrabutilamônio hidrogenossulfato 0,02 mol/L e H_2SO_4 0,75 mol/L, alcançando faixas lineares para concentrações entre 0,03–10 $\mu\text{g/L}$ e 0,01–5,0 $\mu\text{g/L}$ para P e Si, respectivamente.

Haberer & Brands (2003) desenvolveram um método de cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE) para detectar fosfato reativo solúvel (SRP) em amostras de água marinha e de água doce. O método consiste na formação do complexo azul de molibdênio a partir do fosfato reativo presente nas amostras e posterior análise por cromatografia. A técnica requer preparação mínima das amostras e responde linearmente às concentrações entre 1 nM até 100 µM com $R^2 > 0,964$. Além disso, os autores ressaltam que há vantagens na utilização da cromatografia líquida frente ao método espectrofotométrico, uma vez que a cromatografia é capaz de detectar concentrações nanomolares até micromolares com pequenos volumes de amostra (1 mL a 10 µL).

Guo et al. (2005) propuseram a determinação de glifosato e fosfato através de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) com uma coluna Dionex IonPac AS16 após a separação dos picos por cromatografia líquida com fase móvel de ácido cítrico 20 mmol/L e fluxo de 0,5 mL/min. Neste estudo, concentrações traço dos analitos foram detectadas seletivamente pelo ICP-MS com limites de detecção de 0,7 µg/L para ambos e linearidade até 400 µg/L. Para amostras provenientes de diferentes matrizes, as recuperações de glifosato e fosfato foram de 97,1 a 103,2 e de 97,9 a 107,0%, respectivamente, enquanto os desvios padrão relativos foram de $\leq 7,4\%$ para ambos os casos (Guo et al., 2005).

Valls-Cantelys e colaboradores (2012) desenvolveram um método para especiação de fósforo em amostras de águas naturais e residuais, incluindo oxianions simples e condensados, através da utilização da cromatografia líquida com uma coluna de troca iônica PRP-X100 acoplada à espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES). Os limites de detecção ficaram dentro de intervalo de 1 a 5 mg/L. A metodologia desenvolvida foi testada com água da torneira e com efluente de uma estação de tratamento de águas residuais obtendo-se recuperações entre 91,5 e 114,1% para uma concentração de 20 mg/L de P.

É consenso entre diferentes autores que a retenção das diferentes espécies de fósforo em uma coluna de troca iônica é dependente dos valores de pK_a destas espécies e de variáveis relacionadas à fase móvel, tais como: pH da fase móvel, força iônica, fluxo aplicado e temperatura (Guo et al., 2005; Valls-Cantelys et al., 2012). Dessa forma, os diferentes ácidos utilizados para o preparo de soluções de fase móvel têm diferentes valores de pK_a e carga e, conseqüentemente, poder de eluição diferente (Guo et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalações

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul – LBIO/UCS. Considerando a parte analítica, a determinação de substratos e de produtos de fermentação foi realizada parcialmente no LBIO/UCS, no Laboratório de Tecnologia Ambiental – (LATAM/UCS) e na Central Analítica/UCS.

3.2 Microrganismos

As linhagens *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, adquiridas do Bioscan e do Centro de Culturas Tropical André Tosello (São Paulo, Brasil), respectivamente, foram utilizadas nos experimentos deste trabalho. Na literatura, a linhagem *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 é também identificada como *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8724 ou NRRL B199 (Ramachandran et al., 1990; Silveira et al., 1993).

A viabilidade das culturas estoque foi mantida através de repicagens mensais, de modo a assegurar a inocuidade e a capacidade metabólica das linhagens. Utilizou-se a técnica de semeadura por estria simples em superfície de meio sólido (ágar-nutriente), incubadas à 37°C por 24 h. As culturas estoque foram conservadas em tubos de ensaio com meio ágar nutriente inclinado, tampão de gaze e algodão hidrófobo, mantidas a 4°C. Adicionalmente, as culturas foram armazenadas em ultrafreezer, a -80°C, em tubos Falcon, na presença de 20% de glicerol puro previamente esterilizado.

3.3 Meios de cultivo

3.3.1 Meio de conservação e propagação

O meio utilizado para conservação e propagação das culturas foi o ágar nutriente (HIMEDIA®), preparado de acordo com as instruções do fabricante e esterilizado em autoclave a 121°C, à pressão de 1 atm, por 20 minutos.

3.3.2 Meios de fermentação

Nos ensaios em frascos agitados e biorreator, incluindo o preparo dos inóculos, foram utilizados meios de cultivo contendo solução mineral e diferentes fontes de carbono. Como fontes de carbono foram utilizadas glicose (99%, Synth), glicerol (99,5%, VETEC®) e glicerol subproduto, resultante do processo de produção de biodiesel a partir de óleo de soja, cedido por Petrobras S.A., com pureza média de 70% (m/m).

Para o preparo dos meios, a quantidade de glicerol subproduto foi ajustada pelo fator de correção, que é o quociente entre a concentração desejada e o fator de pureza. Glicose e glicerol puro foram utilizados apenas na primeira etapa deste trabalho e, eventualmente, como componentes do meio em ensaios controle.

Na Tabela 5 é apresentada a caracterização do glicerol subproduto (Petrobras S.A.), previamente realizada pelo Laboratório de Tecnologia Ambiental da Universidade de Caxias do Sul.

Tabela 5. Caracterização do glicerol subproduto resultante do processo de produção do biodiesel a partir de óleo de soja.

Parâmetro	Valor determinado
Cálcio total (Ca)	112,55 mg/L
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	1.059.398 mg/L
Ferro total (Fe)	0,868 mg/L
Magnésio total (Mg)	2,946 mg/L
Nitrogênio Amoniacal (NH ₄ ⁺)	66,41 ± 1,29 mg/L
pH	5,51
Potássio (K)	7,12 mg/L
Sódio (Na)	24.854,2 mg/L
Sólidos Suspensos Totais (SST)	3.123 ± 1020 mg/L
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	2.901 ± 944 mg/L
Sólidos Suspensos Fixos (SSF)	222 ± 76 mg/L

O meio mineral descrito por Pirt & Callow (1958) (PC) foi utilizado para o preparo dos inóculos, ensaios fermentativos preliminares em regime descontínuo alimentado (ensaios P1 a P6, item 3.8.1) e, como controle para diferentes comparativos.

Além do meio PC, outros meios minerais descritos na literatura foram avaliados. As composições do meio PC e dos demais meios de cultivo utilizados neste trabalho são apresentadas na Tabela 6, excluindo-se a fonte de carbono empregada.

Tabela 6. Composição dos meios minerais utilizados nas diferentes etapas de avaliação do processo de produção de 2,3-butanodiol.

Meio PC - Pirt & Callow (1958)		Meio MA adaptado - Ma et al. (2009)*	
Componente	Concentração (g/L)	Componente	Concentração (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,20	Extrato de levedura	8,27
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6,00	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,91
KOH	0,45	CH ₃ COONa	3
EDTA	0,51	KCl	0,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30	MgSO ₄	0,1
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,09	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0225	MnSO ₄ .7H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0075		
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,0038		
Meio PR - Priya et al. (2016)		Meio MD4**	
Componente	Concentração (g/L)	Componente	Concentração (g/L)
K ₂ HPO ₄	3	(NH ₄) ₂ SO ₄	7,2
KH ₂ PO ₄	7	(NH ₄) ₂ HPO ₄	6,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	KOH	0,45
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	1		
Meio MD5***			
Componente		Concentração (g/L)	
(NH ₄) ₂ SO ₄		7,71	
(NH ₄) ₂ HPO ₄		3,15	
KOH		0,45	
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,60	

* Meio adaptado a partir do meio descrito por Ma et al., (2009), com a substituição de CSLP por extrato de levedura na proporção 1:1.

** Meio adaptado a partir do meio descrito por Pirt & Callow (1958).

*** Meio otimizado a partir do meio MD4.

De acordo com o objetivo proposto para cada ensaio, foi adicionado ao meio mineral, glicose, glicerol puro ou glicerol subproduto em concentrações previamente definidas. Salienta-se que no meio utilizado para o preparo dos inóculos, a concentração inicial de glicose ou glicerol puro foi definida em 20 g/L.

O pH do meios foi ajustado para 5,5, com ácido clorídrico 2 mol/L, para os ensaios em frascos agitados e biorreator, e para 6,5 na preparação dos inóculos.

Em todos os casos, os componentes do meio mineral e a fonte de carbono foram esterilizados separadamente a 121°C, 1 atm, por 20 minutos. Posteriormente, foram assepticamente misturados para obtenção das composições desejadas.

3.4 Preparo dos inóculos

O preparo dos inóculos seguiu procedimentos específicos para frascos agitados e biorreator de acordo com o objetivo e particularidades de cada ensaio.

No grupo de ensaios P1 a P6, descritos no item 3.8.1, a ativação das culturas a partir do estoque foi realizada através de repiques em placas de Petri contendo meio ágar nutriente, incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, frascos Erlenmeyer de 500 mL, com gargalo alongado, contendo 80 mL de meio de cultivo PC, pH ajustado em 6,5, foram inoculados com alçadas diretas das culturas previamente crescidas nas placas. Os frascos foram assepticamente cobertos com uma manta de algodão hidrófobo e gaze, e mantidos sob agitação recíproca em agitador de bancada (Certomat U, B. Braun Biotech, Sartorius) a 300 rpm por cerca de 10-12 horas, a 37°C. A concentração inicial de glicose ou glicerol puro foi de 20 g/L. Para manutenção dos valores de pH na faixa adequada ao crescimento microbiano, foram adicionados aos meios, antes da inoculação, 2,5 g/L de carbonato de cálcio (CaCO₃). Posteriormente, no biorreator, os meios de cultivo foram inoculados com o volume necessário para atingir 0,3 g/L de células.

Para o grupo de ensaios M1 a M5 e R1 a R2, descritos nos itens 3.8.2 e 3.8.4, o procedimento para obtenção da biomassa microbiana foi semelhante aos ensaios P1 a P6, contudo, foi utilizado somente o glicerol puro como fonte de carbono com uma concentração de 20 g/L. Ao final do período de incubação dos frascos (10-12 horas), a biomassa foi centrifugada, o sobrenadante descartado e as células foram re-suspendidas em água deionizada esterilizada. Em seguida, nos cultivos em biorreator, os diferentes meios estudados foram inoculados com o volume necessário para atingir 0,3 g/L de células. Neste grupo de ensaios a suspensão celular foi utilizada como inóculo, a fim de promover a padronização e garantir que os resultados dos meios estudados não fossem influenciados por concentrações residuais de substrato ou sais provenientes do meio de cultivo utilizado no inóculo.

Para ensaios em frascos sob agitação a partir de planejamento experimental, o inóculo consistiu no preparo de suspensões celulares da cultura previamente crescida em placas de Petri (24 h), através da raspagem das células com um volume adequado de água deionizada esterilizada. Em seguida, os frascos foram inoculados com o volume necessário para atingir

aproximadamente 0,05 g/L de células em um volume total de 100 mL, com o objetivo principal de padronizar a obtenção do inóculo e a concentração celular nos frascos.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Coleta e preparo das amostras

Nos ensaios conduzidos em frascos agitados as amostras, cerca de 2 mL, foram retiradas assepticamente em capela de fluxo laminar. Em biorreator amostras entre 4 e 5 mL foram coletadas através de um sistema de amostragem que consistia de um tubo de aço inoxidável, cuja extremidade situava-se próxima ao fundo da cuba, conectado a uma mangueira de silicone e um amostrador de vidro.

Uma alíquota apropriada das amostras foram convenientemente diluídas para a determinação da concentração celular. Nos ensaios em frascos agitados, nos quais foi utilizado CaCO_3 para a manutenção do pH, adicionou-se 0,2 mL de ácido clorídrico (HCl) 2 mol/L para cada 1,0 mL de amostra destinada à medição da concentração celular. O volume restante da amostra foi centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm em centrífuga (Sigma, modelo 4-15, Braun Biotech International). O sobrenadante foi separado e mantido sob refrigeração para determinação das concentrações da fonte de carbono e dos produtos da fermentação.

3.5.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi quantificada por medidas de absorvância de suspensões diluídas do meio fermentado a 520 nm em espectrofotômetro (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltda). Sua conversão em concentração, massa de matéria seca por unidade de volume (g/L), foi realizada através de curva de calibração e, alternativamente, por gravimetria.

Para gravimetria, o fator de conversão foi calculado pela relação entre a absorvância medida e a concentração celular obtida por gravimetria. A quantificação de biomassa ao final do cultivo (massa seca) por gravimetria foi determinada a partir de um volume conhecido de amostra do caldo fermentado centrifugado a 8000 rpm por 10 min. O primeiro sobrenadante foi descartado, a biomassa solubilizada em água destilada para eliminação de possíveis resíduos e produtos da fermentação e novamente centrifugada, sob as mesmas condições. O

sobrenadante da segunda centrifugação foi novamente descartado, a biomassa, solubilizada e transferida para um cadinho de porcelana previamente pesado. Após, os cadinhos foram mantidos em estufa a 90-95°C por 24 h. Após as 24 h, os cadinhos foram novamente pesados para o cálculo da biomassa. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

3.5.3 Determinação da concentração de glicose por método espectrofotométrico

Durante os ensaios fermentativos a quantificação de glicose para monitoramento foi feita através do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para determinação de açúcares redutores totais (ART) conforme descrito por Miller (1959).

Uma vez que neste tipo de fermentação tem-se a presença de acetoina nas amostras ao final dos cultivos e devido ao seu caráter redutor, este composto poderia interferir na quantificação de glicose, para efeitos de análise dos resultados finais dos ensaios fermentativos, a determinação de glicose foi realizada, em etapa posterior à fermentação, através de cromatografia em fase líquida (Agilent Technology, modelo 9100; Shimadzu, modelo LC-20AD) de acordo com as condições cromatográficas pré-estabelecidas para análise, descritas no item 3.5.5.

3.5.4 Determinação da concentração de glicerol por método espectrofotométrico

Para o monitoramento das concentrações de substrato em tempo real nos ensaios fermentativos, a quantificação de glicerol foi realizada através de método espectrofotométrico, descrito por Sanchez (1998) para determinação de alditóis (poliálcool ou álcool de açúcar) em amostras biológicas complexas, adaptado no presente trabalho para quantificação de glicerol em amostras de fermentação. Como adaptações em relação ao método original, foram alterados, o pH da reação de oxidação do glicerol, as concentrações de alguns reagentes e o tempo de reação para facilitar o processo de manuseio das amostras. As adaptações realizadas - consideradas para a validação -, bem como as especificações da metodologia original desenvolvida por Sanchez (1998) são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros da metodologia descrita por Sanchez (1998) e adaptações.

Método	Faixa linear	Comprimento de onda (λ)	Reagentes
Sanchez (1998)	5 – 150 nmol	412 nm	R1 – Tampão Formato 0,5 mol/L, pH 3,0 R2 – Periodato de sódio 5 mmol/L R3 – Acetilacetona 0,1 mol/L Acetato de amônio 2 mol/L Tiosulfato de sódio 0,02 mol/L
Adaptado	100 – 800 mg/L	450 nm	R1 – Tampão Formato 0,5 mol/L, pH 5,5 R2 – Periodato de sódio 3,5 mmol/L R3 – Acetilacetona 0,1 mol/L Acetato de amônio 2 mol/L Tiosulfato de sódio 0,02 mol/L

Como protocolo de análise, em um tubo de ensaio foram adicionados 0,1 mL da amostra diluída e 0,5 mL do tampão formato 0,5 mol/L, pH 5,5. Em seguida, adiciona-se ao tubo, 1 mL de periodato de sódio 3,5 mmol/L e, após 1 minuto de reação, adiciona-se 0,75 mL do reagente 3.

Os tubos são levados para um banho a 100°C por 2 minutos, resfriados em banho de gelo, sendo a eles adicionados 2,5 mL de água destilada. A leitura espectrofotométrica é realizada a 450 nm em espectrofotômetro (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltda). As concentrações de glicerol presentes nas amostras são determinadas através de curva de calibração construída a partir de soluções de glicerol entre 100 e 800 mg/L, submetidas ao mesmo procedimento.

O reagente 3 é obtido a partir de duas soluções previamente preparadas, compostas de 70 g de acetato de amônio dissolvido em 200 mL de água destilada e de 1,6 g de tiosulfato de sódio dissolvido em 100 mL de água. Ambas as soluções são transferidas, em sequência, para um balão volumétrico de 500 mL e adiciona-se 5 mL de acetilacetona, sendo o volume da solução completado com água destilada a 500 mL. Esta solução pode ser mantida, sob refrigeração, por cerca de 15 dias.

Para efeitos de análise dos resultados finais obtidos nos ensaios fermentativos, a determinação de glicerol foi realizada, em etapa posterior à fermentação, através de cromatografia em fase líquida (Agilent Technology, modelo 9100; Shimadzu, modelo LC-20AD) de acordo com as condições cromatográficas pré-estabelecidas para análise, descritas no item 3.5.5.

3.5.5 Determinação da concentração de substratos e produtos por cromatografia em fase líquida

Os substratos, glicerol e glicose e os principais produtos da fermentação, 2,3-butanodiol e acetoína, foram quantificados por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) (Agilent Technology, modelo 9100; Shimadzu, modelo LC-20AD), utilizando detector de índice de refração (IR) com uma coluna Aminex HPX-87H (Aminex® HPLC Columns, Bio-Rad) (300mm x 7,8mm, 9 µm) que consiste em uma coluna de troca iônica H⁺ constituída pelo *copolímero estireno-divinilbenzeno sulfonado* e é apropriada para a separação de açúcares, ácidos orgânicos e alcoóis, que permite trabalhar em uma faixa de pH entre 1-3. A análise foi realizada nas condições cromatográficas descritas por Girardi (2014) e Romio (2014), com adaptações na metodologia. Foi utilizada fase móvel de H₂SO₄ 5 mmol/L (previamente filtrada em filtro de poliamida, 0,2 µm); fluxo de 0,6 mL/min; temperatura do forno de 60°C, volume de injeção de 5 µL.

Na metodologia descrita por Girardi (2014) e Romio (2014) não é alcançada a separação total dos picos dos analitos, sendo que os autores optaram por realizar a quantificação de acetoína e 2,3-BDO em conjunto. Como adaptações quanto à metodologia utilizada, as concentrações de acetoína e dos estereoisômeros de 2,3-BDO foram determinadas separadamente pela altura dos respectivos picos de cada produto.

Embora a coluna Aminex HPX-87H permita a separação de etanol, estes resultados não foram considerados na discussão de todos os ensaios realizados.

3.5.6 Determinação da ácido fosfórico proporcionalmente a concentração de íons fosfato em fermentação por cromatografia em fase líquida

A determinação de ácido fosfórico proporcionalmente a concentração de íons fosfato oriundos do meio de cultivo utilizado nos ensaios fermentativos foi proposta neste trabalho através da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas no item 3.5.5.

3.6 Determinação da concentração de oxigênio dissolvido no meio

O oxigênio dissolvido no meio de fermentação foi medido através de um eletrodo polarográfico acoplado a um medidor de oxigênio no biorreator, que indicava a percentagem

deste gás em relação à saturação no momento da medição. A calibração do eletrodo foi feita no próprio meio de cultivo, momentos antes da inoculação.

3.7 Cálculos dos parâmetros de avaliação

3.7.1 Velocidade específica de crescimento celular

As velocidades específicas de crescimento (μ_x) são obtidas a partir de curvas relacionando o logaritmo natural da concentração celular ($\ln X$) em função do tempo de cultivo (t). A derivação da curva $\ln X = f(t)$ gera uma nova curva correlacionando μ_x ($d\ln X/dt$) com o tempo.

Para a determinação da máxima velocidade específica de crescimento (μ_{xm}) foi utilizada a regressão linear do trecho correspondente à fase exponencial da curva $\ln X = f(t)$, sendo o coeficiente angular da equação da reta o próprio μ_{xm} .

3.7.2 Fatores de conversão, produtividade volumétrica e rendimento

O fator de conversão de substrato em células, que relaciona a produção de biomassa com o consumo de substrato, foi determinado pela Equação 2.

$$Y_{X/S} = \frac{(MX_f - MX_0)}{MS_{\text{cons}}} \quad (2)$$

Onde:

$Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células (g/g);

MX_f – massa celular final (g);

MX_0 – massa celular inicial (g);

MS_{cons} – massa de substrato consumida (g).

Para cultivos em regime descontínuo alimentado, a massa de glicose, glicerol puro e subproduto consumida foi calculada pela soma das massas inicial e adicionada, da qual deve ser subtraída a massa residual do substrato.

O fator de conversão de substrato em produto relaciona a formação de 2,3-butanodiol e acetoína com o consumo de substrato, sendo calculado pela Equação 3.

$$Y_{P/S} = \frac{(MP_f - MP_i)}{MS_{\text{cons}}} \quad (3)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produto (g/g);

MP_f – massa final de produto (g);

MP_i – massa inicial de produto (g);

MS_{cons} – massa de substrato consumida (g).

Quanto ao fator estequiométrico de conversão, para cada grama de glicerol consumido são formados 0,489 g de butanodiol (2 mols de glicerol → 1 mol de 2,3-BDO). Quanto a glicose, para cada grama são gerados 0,500 g de butanodiol (1 mol de glicose → 1 mol de 2,3-BDO).

Assim, para o cálculo dos rendimentos para produto foi utilizada a Equação 4.

$$\rho = \left(\frac{Y_{P/S}}{f} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

Onde:

ρ - rendimento (%);

$Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produto (g/g);

f – fator estequiométrico de conversão.

As produtividades volumétricas para os produtos formados durante o processo foram calculadas pela Equação 5. Para o caso de cultivos em regime descontínuo alimentado, a concentração inicial de produto foi corrigida considerando a variação de volume.

$$p = \frac{(P_f - P_i)}{t} \text{ ou } p = \frac{(MP_f - MP_i)}{t \cdot V} \quad (5)$$

Onde:

p – produtividade (g/L/h);

P_f – concentração final de produto (g/L);

P_i – concentração inicial de produto (g/L);

V – volume (L);

t – tempo de fermentação (h).

A produção específica de produtos em relação à biomassa formada durante o processo foi calculada pela Equação 6.

$$Y_{P/X} = \frac{(MP_f - MP_i)}{(MX_f - MX_i)} \quad (6)$$

Onde:

$Y_{P/X}$ – produção específica em relação à biomassa (g/g);

MP_f – massa final de produto (g);

MP_i – massa inicial de produto (g);

MX_f – massa final de células (g);

MX_i – massa inicial de células (g).

3.8 Ensaios fermentativos

Neste item são descritos todos os ensaios fermentativos realizados neste trabalho e o objetivo de estudo em cada um, bem como as condições experimentais utilizadas. Na condução dos ensaios foi utilizado agitador de bancada de movimento recíproco (Certomat U, B. BraunBiotech, Sartorius) e/ou biorreator de agitação mecânica (New Brunswick, modelo BioFlo/Celligen115).

3.8.1 Estudo comparativo entre linhagens: regime descontínuo alimentado

A etapa inicial deste trabalho consistiu de um estudo comparativo das linhagens *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 quanto ao consumo de substrato e a formação de produtos (2,3-BDO e acetoína) em ensaios fermentativos contendo glicose, glicerol puro e glicerol subproduto como substratos, em que o objetivo foi definir uma das linhagens bacterianas para o prosseguimento dos estudos.

Para tanto, foram conduzidos seis cultivos em regime descontínuo alimentado (ensaios P1 a P6) com base nas condições para operação do processo definidas por Romio (2014) e Girardi (2014) para *K. oxytoca* e *E. aerogenes*, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos com valores fixos de frequência de agitadores (700 rpm) e de fluxo específico de ar (0,50 vvm). O meio mineral PC foi utilizado para o preparo dos inóculos e nos ensaios fermentativos.

Na preparação dos inóculos, foram utilizados 20 g/L de glicose ou glicerol puro (conforme descrito no item 3.4). Os cultivos foram realizados em biorreator de bancada (BioFlo/CelliGen 115, New Brunswick) com volumes de meio inicial e final de 3,5 e 4,5 L, respectivamente. Como condições de cultivo foram empregadas temperatura de 37°C, pH controlado em 5,5 pela adição automática de NaOH 7 mol/L e HCl 2 mol/L e concentração inicial do substrato (S_0) de 80 g/L. Como fontes de carbono foram utilizadas: glicose (Synth®), glicerol puro (VETEC®) e glicerol subproduto (Petrobras S.A, 70% m/m).

Durante o decorrer das fermentações, soluções concentradas de substrato foram adicionadas ao meio de cultivo manualmente quando a concentração da fonte de carbono no biorreator era de aproximadamente 20 g/L. Excepcionalmente, para glicose, devido a alta concentração requerida de substrato em solução, o substrato em pó foi mantido em estufa à 90-95°C por cerca de 1 hora e após, adicionado ao biorreator através de um funil. As alimentações foram realizadas de forma que a concentração no meio não ultrapassasse 80 g/L. Inicialmente foram previstas somente três alimentações para cada fermentação (P1 a P6) com ~237 g de substrato em cada. As concentrações finais equivalentes de substrato foram de 259, 241 e 225 g/L para glicose, glicerol puro e glicerol subproduto, respectivamente, nos cultivos com *K. oxytoca* (P1, P2 e P3) e de 247, 219 e 211 g/L, respectivamente, para *E. aerogenes* (P4, P5 e P6).

Neste grupo de ensaios, além da alimentação com substrato, soluções concentradas de nutrientes foram adicionadas aos cultivos em igual concentração do meio mineral base (PC). Estes nutrientes foram adicionados em dois momentos distintos: após o consumo médio de 150 g/L de substrato e juntamente com a terceira alimentação da fonte de carbono. Amostras foram coletadas periodicamente para o monitoramento dos ensaios.

3.8.2 Ensaios em regime descontínuo com diferentes formulações de meios de cultivo

O grupo de ensaios (M1 a M5) conduzidos com diferentes formulações de meios de cultivo minerais tiveram como objetivo a avaliação da influência da composição destes meios sobre o crescimento de *E. aerogenes*, o consumo de substrato e a formação de produto (2,3-BDO e acetoína). A proposta de utilização de diferentes meios de cultivo teve a finalidade de minimizar os efeitos de inibição múltipla relacionada ao meio de cultivo, a composição do glicerol subproduto e aos produtos de fermentação. Estes efeitos puderam ser observados na segunda etapa da fermentação para a produção de 2,3-BDO nos ensaios em

regime descontínuo alimentado (P1 a P6) com diferentes fontes de carbono, descritos no item 3.8.1.

Todos os ensaios foram realizados em regime descontínuo em biorreator de bancada de 5 L (New Brunswick, modelo BioFlo/Celligen115) com um volume de meio de 4,0 L, a 37°C, pH controlado em 5,5 e $S_0 = 40$ g/L de glicerol subproduto. Os meios utilizados foram PC, MA, PR e MD4. A preparação dos inóculos para os diferentes meios de cultivo seguiu a metodologia descrita no item 3.4, utilizando-se o meio PC suplementado com 20 g/L de glicerol purificado.

A frequência de agitadores foi variada entre 650 e 750 rpm e o fluxo de ar entre 0,50 e 0,87 vvm, buscando manter a concentração de oxigênio dissolvido em no mínimo 30% da saturação pelo maior tempo possível. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Os resultados finais obtidos nestes ensaios foram expressos em valores de média \pm desvio padrão e submetidos a uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey, com intervalo de confiança de 95%.

3.8.3 Otimização de meio de cultivo: ensaios em frascos agitados

Tendo em vista os resultados obtidos na fase anterior, de avaliação de diferentes formulações de meios de cultivo descritas na literatura, buscou-se a otimização do meio MD4, suplementado com 80 g/L de glicerol subproduto, em cultivos de *E. aerogenes*.

Para tanto, utilizou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR) através do planejamento experimental do tipo *Box-Behnken Design* 3^k (BBD). Foram realizados trinta experimentos com repetição, sendo seis pontos centrais. Avaliou-se a influência de três variáveis independentes: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (S2), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (F8) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (S5), em três níveis, sendo o nível mais baixo (-1), representado pela ausência do sal, e o nível mais alto (+1), representado por 200% da concentração de referência (meio PC). Os demais componentes do meio de cultivo (KOH e glicerol) foram mantidos em concentrações constantes, de 0,45 e 80 g/L.

Amostras foram retiradas em 0, 12, 24, 36 e 48 horas. As variáveis resposta avaliadas foram: soma das concentrações finais dos estereoisômeros de 2,3-BDO e da produção de acetoína (P_f), fator de conversão de substrato em produtos ($Y_{P/S}$) e produção específica em relação à biomassa ($Y_{P/X}$). Outros parâmetros também foram determinados como forma de avaliação global do processo, contudo P_f , $Y_{P/S}$ e $Y_{P/X}$, foram utilizados para a otimização.

A matriz de planejamento experimental com as variáveis codificadas e as respectivas concentrações de cada sal utilizadas nos ensaios são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Matriz de planejamento experimental para otimização de meio de cultivo a partir de *Box Behnken Design* 3^k (BBD).

Experimento	X_1	X_2	X_3	S2	F8	S5
				$((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$	$((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$	$(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$
1	0	-1	-1	7,2	0,0	0,0
2	-1	0	-1	0,0	6,0	0,0
3	0	-1	-1	7,2	0,0	0,0
4	+1	+1	0	14,4	12,0	0,3
5	0	+1	+1	7,2	12,0	0,6
6	-1	-1	0	0,0	0,0	0,3
7	0	0	0	7,2	6,0	0,3
8	+1	-1	0	14,4	0,0	0,3
9	0	-1	+1	7,2	0,0	0,6
10	0	-1	+1	7,2	0,0	0,6
11	0	0	0	7,2	6,0	0,3
12	0	0	0	7,2	6,0	0,3
13	-1	0	+1	0,0	6,0	0,6
14	+1	0	-1	14,4	6,0	0,0
15	0	+1	+1	7,2	12,0	0,6
16	-1	0	-1	0,0	6,0	0,0
17	+1	+1	0	14,4	12,0	0,3
18	+1	0	-1	14,4	6,0	0,0
19	-1	+1	0	0,0	12,0	0,3
20	0	0	0	7,2	6,0	0,3
21	-1	0	+1	0,0	6,0	0,6
22	0	0	0	7,2	6,0	0,3
23	-1	+1	0	0,0	12,0	0,3
24	+1	0	+1	14,4	6,0	0,6
25	0	0	0	7,2	6,0	0,3
26	+1	0	+1	14,4	6,0	0,6
27	-1	-1	0	0,0	0,0	0,3
28	0	0	0	7,2	6,0	0,3
29	0	+1	-1	7,2	12,0	0,0
30	0	+1	-1	7,2	12,0	0,0

Os ensaios deste grupo de experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio (S_0 de 80 g/L). O inóculo foi padronizado, preparado de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.

3.8.4 Comparação entre meio otimizado e meio controle

Como etapa final de avaliação de meios, foram realizados ensaios em biorreator de bancada (BioFlo/CelliGen 115, New Brunswick) em regime descontínuo a fim de comparar o comportamento cinético de *E. aerogenes* no meio otimizado a partir dos resultados de planejamento experimental, denominado meio MD5 e em meio controle (meio PC). Desta forma, foram realizados dois cultivos em regime descontínuo (R1 e R2), com valores fixos de frequência de agitadores (700 rpm) e de fluxo específico de ar (0,50 vvm), S_0 de 80 g/L de glicerol subproduto, 4,0 L de meio, nas condições de pH e temperatura descritas anteriormente.

Somente o meio mineral PC foi utilizado para o preparo dos inóculos, conforme descrito no item 3.4 ($S_0 = 20$ g/L de glicerol puro), tendo como objetivo não acrescentar mais uma possível variável na avaliação dos resultados finais. Além disso, os cultivos foram conduzidos utilizando-se o mesmo inóculo.

3.9 Validação de metodologias analíticas

Neste item são descritas as etapas realizadas na validação das metodologias analíticas empregadas no decorrer desta pesquisa.

3.9.1 Validação de metodologias adaptadas e/ou desenvolvidas

A quantificação de glicerol, acetoína, etanol, do estereoisômero *meso*-2,3-BDO e dos possíveis enantiômeros 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO ou 2*R*,3*R*-(-)-2,3-BDO foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em uma mesma corrida cromatográfica, baseada em Girardi (2014) e Romio (2014), com adaptações, conforme descrito no item 3.5.5. Os padrões foram preparados a partir das substâncias de referência. Dado que na literatura especializada, os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* são relatados como produtores dos isômeros 2*S*,3*S*-(+) e *meso*-2,3-BDO (Ji et al., 2011; Jurchescu et al., 2013), não foram

realizados experimentos para a confirmação da presença dos enantiômeros *2S,3S*-(+)-2,3-BDO ou *2R,3R*-(-)-2,3-BDO.

A metodologia analítica para determinação de glicerol por espectrofotometria foi adaptada de Sanchez (1998) e as análises foram realizadas conforme procedimento descrito no item 3.5.4.

A determinação de ácido fosfórico proporcionalmente a concentração de íons fosfato nas amostras de caldo fermentado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) seguiu os mesmos parâmetros operacionais descritos para a determinação de glicerol, acetoína, 2,3-BDO e etanol (item 3.5.5). Os padrões foram preparados a partir de fosfato de amônio dibásico P.A.

A validação das metodologias analíticas (cromatografia em fase líquida e espectrofotometria) foi realizada de acordo com a Resolução da Anvisa - RDC nº 166 (Brasil, 2017), a qual determina os procedimentos para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. A RDC nº 166 é aplicável tanto aos métodos cromatográficos quanto não cromatográficos, tais como espectrofotometria UV-Vis, desde que estes ofereçam seletividade aceitável. Os testes de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão foram realizados utilizando soluções padrão contendo as substâncias de referência. Para cromatografia líquida de alta eficiência, utilizou-se solução contendo a mistura de glicerol, acetoína, 2,3-BDO e etanol. A exatidão/recuperação também foi avaliada utilizando amostras de fermentação, obtidas nos cultivos realizados em frascos agitados e em biorreator.

3.9.2 Seletividade

Conforme a RDC nº 166 da Anvisa, a seletividade de um método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (Brasil, 2017).

Para os métodos cromatográficos, cada padrão foi injetado separadamente com o intuito de identificar os respectivos tempos de retenção e a resolução dos picos para cada substância estudada, de forma a identificar se haveria ou não a sobreposição.

Para a verificação da seletividade do método espectrofotométrico, foram avaliados os resultados obtidos para recuperação em amostras de fermentação submetidas ao procedimento analítico, a fim de demonstrar que os resultados não são afetados pela presença de impurezas.

Adicionalmente, para a determinação das concentrações de glicerol, um perfil de consumo de glicerol monitorado por espectrofotometria e cromatografia foi comparado.

3.9.3 Linearidade e intervalo de concentração

Para as amostras avaliadas no método cromatográfico em questão considerou-se um intervalo entre 0,5 e 10 g/L, no qual as concentrações analisadas foram: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10 g/L. A solução mãe utilizada para obtenção das diluições para as curvas de calibração foi preparada a partir de padrões grau P.A e HPLC das substâncias de referência: glicerol puro – 99,5 % (VETEC®), acetoína – 92% (SIGMA-Aldrich), 2,3-butanodiol (mistura) – 98% (SIGMA-Aldrich) e etanol – 99,5% (SIGMA-Aldrich).

Para o método espectrofotométrico considerou-se um intervalo entre 100 e 800 mg/L de glicerol, sendo analisadas as concentrações de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 mg/L. A solução mãe utilizada para obtenção das diluições para as curvas de calibração foi preparada a partir de glicerol puro P.A – 99,5 % (VETEC®).

Na determinação de ácido fosfórico proporcionalmente às concentrações de íons fosfato por cromatografia, o intervalo considerado foi entre 0,25 e 3,5 g/L. Para a obtenção das concentrações de ácido fosfórico os cálculos foram feitos considerando a proporcionalidade dos íons PO_4^{3-} presentes na molécula do sal fosfato. A solução mãe utilizada foi preparada a partir do fosfato de amônio dibásico P.A. – 99,5 % (VETEC®) e as concentrações analisadas foram: 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 g/L, as quais corresponderiam, em íons fosfato a 0,18; 0,36; 0,72; 1,08; 1,44; 1,80; 2,16; 2,52 g/L.

A linearidade foi determinada pela análise de oito concentrações diferentes das amostras, realizadas em três dias distintos, tendo como critério mínimo aceitável, a obtenção do coeficiente de correlação linear ($R^2 \geq 0,99$), obtido a partir da média das três curvas contendo os padrões.

O intervalo de concentração das substâncias foi especificado a partir do estudo da faixa de linearidade para cada método, sendo confirmado por resultados de precisão e exatidão adequados quando os métodos foram aplicados a amostras dentro do intervalo.

3.9.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação de determinado método analítico podem ser estimados com base em parâmetros da curva analítica (Brasil, 2017). Desta forma, os limites

de detecção e quantificação para cromatografia e espectrofotometria foram determinados através do desvio padrão do intercepto com o eixo y e da média da inclinação de três curvas de calibração no intervalo linear dos métodos.

Os resultados foram calculados conforme as Equações 7 e 8 e expressos em unidade de concentração, miligramas por litro (mg/L) ou gramas por litro (g/L), dependendo do intervalo de concentração estabelecido para cada método.

$$LD = \frac{DP_a \cdot 3}{IC} \quad (7)$$

Onde:

LD – limite de detecção (mg/L ou g/L);

DP_a – desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC – inclinação da curva de calibração ou coeficiente angular.

$$LQ = \frac{DP_a \cdot 10}{IC} \quad (8)$$

Onde:

LQ – limite de quantificação (mg/L; g/L);

DP_a – desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC – inclinação da curva de calibração ou coeficiente angular.

3.9.5 Repetibilidade e precisão intermediária

A repetibilidade (precisão intra-corrída) das metodologias cromatográfica e espectrofotométrica foi determinada pela análise de três concentrações (baixa/média/alta) no intervalo linear dos métodos, em triplicata, realizadas em um mesmo dia. Da mesma forma, a precisão intermediária (inter-corrída) foi determinada pela análise de três concentrações (baixa/média/alta) no intervalo linear dos métodos, em triplicata, realizadas em três dias diferentes (consecutivos).

Os resultados para repetibilidade e precisão intermediária foram calculados por meio da Equação 9 e expressos como desvio padrão relativo (DPR), sendo estabelecido como critério aceitável um $DPR \leq 5\%$.

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

Onde:

DP – desvio padrão (mg/L ou g/L);

CMD – concentração média determinada (mg/L ou g/L).

3.9.6 Exatidão e/ou recuperação

A exatidão de ambos os métodos, cromatográfico e espectrofotométrico, foi determinada pela análise de três concentrações diferentes dos padrões (baixa/média/alta) no intervalo linear dos métodos, em triplicata, realizadas em um mesmo dia, a fim de determinar a concentração média experimental.

Os resultados foram avaliados pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, calculados pela Equação 10 e expressos em valores percentuais (%) de recuperação da quantidade do analito conhecida.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \cdot 100 \quad (10)$$

Realizou-se também o estudo de exatidão/recuperação em amostras de fermentação, as quais foram adicionadas concentrações conhecidas dos padrões das substâncias de referência (baixa/média/alta). Para isso, primeiramente, a concentração de cada substância contida nas amostras foi determinada por cromatografia e espectrofotometria, em triplicata. Em seguida, amostras nas quais os padrões foram adicionados foram submetidas ao mesmo procedimento analítico, em triplicata.

Os resultados foram calculados pela Equação 11 e expressos em valores percentuais (%) de recuperação da quantidade do analito conhecida.

$$\text{Recuperação} = \frac{CA (\text{amostra adicionada}) - CA (\text{amostra})}{CTA} \cdot 100 \quad (11)$$

Onde:

CA – concentração experimental do analito (mg/L ou g/L);

CTA – concentração teórica do analito adicionado (mg/L ou g/L).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados relacionados aos seguintes aspectos:

- estudo comparativo das linhagens *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com relação ao consumo de substratos (glicose, glicerol puro e glicerol subproduto) e formação de produtos (2,3-butanodiol e acetoína), em cultivos em regime descontínuo alimentado, conduzidos em biorreator;

- avaliação da influência da composição de diferentes formulações de meios de cultivo minerais relatados na literatura, contendo glicerol subproduto, sobre o crescimento microbiano, o consumo de substrato e a formação de produtos (2,3-BDO e acetoína) por *E. aerogenes*, em cultivos em regime descontínuo, conduzidos em biorreator;

- otimização de um meio mineral contendo 80 g/L de glicerol subproduto para o crescimento de *E. aerogenes* e a produção de 2,3-BDO e acetoína em ensaios fermentativos conduzidos em frascos agitados;

- análise do processo conduzido em regime descontínuo em biorreator de agitação mecânica, utilizando o meio de cultivo otimizado (meio MD5) e o meio mineral controle (meio PC);

- adaptação e validação de metodologia por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de glicerol, acetoína, *meso*-2,3-butanodiol, (2*S*,3*S*)-(+)-2,3-butanodiol e etanol em amostras do processo de fermentação;

- adaptação e validação de metodologia por espectrofotometria UV-Vis para determinação de glicerol em amostras de cultivo - na presença de sais inorgânicos, metabólitos microbianos e outras impurezas -, em tempo real;

- desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de ácido fosfórico proporcionalmente ao conteúdo de íons fosfato provenientes da dissociação de fosfato de amônio dibásico ((NH₄)₂HPO₄) em amostras de cultivo.

Salienta-se que as metodologias analíticas apresentadas foram previamente estudadas, adaptadas e validadas para aplicação nesta pesquisa com o intuito de garantir a confiabilidade dos dados apresentados. Entretanto, optou-se pela disposição dos resultados nesta ordem, visando manter o foco principal desta pesquisa que é a bioprodução de 2,3-BDO por duas espécies de microrganismos anaeróbios facultativos utilizando glicerol subproduto da indústria do biodiesel como substrato.

4.1 Ensaios fermentativos

4.1.1 Comparação da produção de 2,3-butanodiol e acetoína por *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter aerogenes*

Cultivos de *K. oxytoca* e *E. aerogenes* foram conduzidos em regime descontínuo alimentado, com o intuito de avaliar o perfil de utilização do glicerol subproduto e a produção de 2,3-BDO e acetoína em comparação ao uso de glicerol puro e glicose. Foram realizados seis ensaios (P1 a P6), conduzidos com o meio mineral PC (Pirt & Callow, 1958). As concentrações finais equivalentes de substrato (S_{eq}) utilizadas foram de 259, 241 e 225 g/L, para glicose, glicerol puro e glicerol subproduto nos cultivos com *K. oxytoca* (P1, P2 e P3) e de 247, 219 e 211 g/L nos cultivos com *E. aerogenes* (P4, P5 e P6), respectivamente.

O estudo comparativo teve como base os resultados obtidos para crescimento celular, consumo de substrato e formação de produtos, durante cerca de 72 horas de processo. Os perfis cinéticos dos ensaios com relação às variações das concentrações de células (X), substrato (S), produto (P) - englobando a soma das parcelas de 2,3-BDO e acetoína -, oxigênio dissolvido (C), concentração de acetoína e concentração dos diferentes isômeros de 2,3-BDO são mostrados nas Figuras 4 a 15.

Em todos os cultivos houve uma curta fase de adaptação celular e queda acentuada na concentração de oxigênio dissolvido devido ao intenso metabolismo microbiano nas primeiras horas de cultivo. Com relação ao oxigênio dissolvido (Figuras 5, 7, 9, 11, 13 e 15), este permaneceu em solução por aproximadamente 4,8, 4,5 e 6,5 h, nos ensaios P1, P2 e P3 e, por aproximadamente 3,4, 3,2 e 4,8 h, nos ensaios P4, P5 e P6, para glicose, glicerol puro e glicerol subproduto, respectivamente. Para os ensaios P1 e P5, este parâmetro não chegou à zero, dado que concentrações de 3,5 e 1,5 %, respectivamente, foram observadas.

Ainda nas horas iniciais dos cultivos, quando há declínio das concentrações de O_2 no meio, o início da fase desaceleração pode ser constatado, devendo-se provavelmente, a limitação no suprimento de oxigênio. O longo período de fase estacionária se mantém até o final dos cultivos, mesmo quando concentrações mensuráveis de oxigênio estão disponíveis no meio.

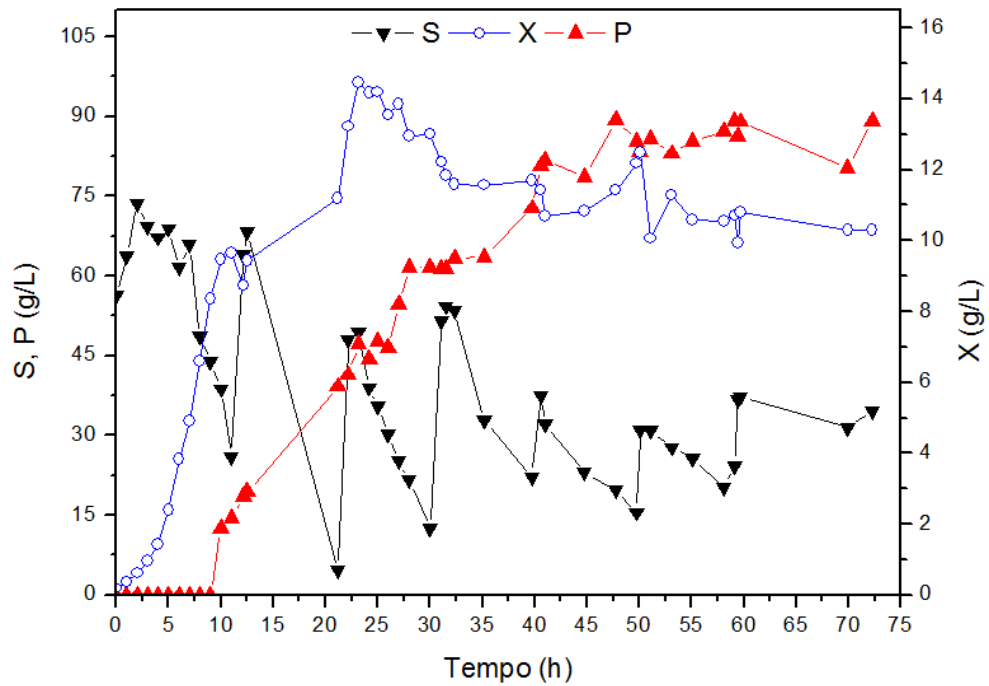


Figura 4. Variação das concentrações de biomassa celular, glicose e produto final com o tempo em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Ensaio P1 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (▼) Glicose (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC).

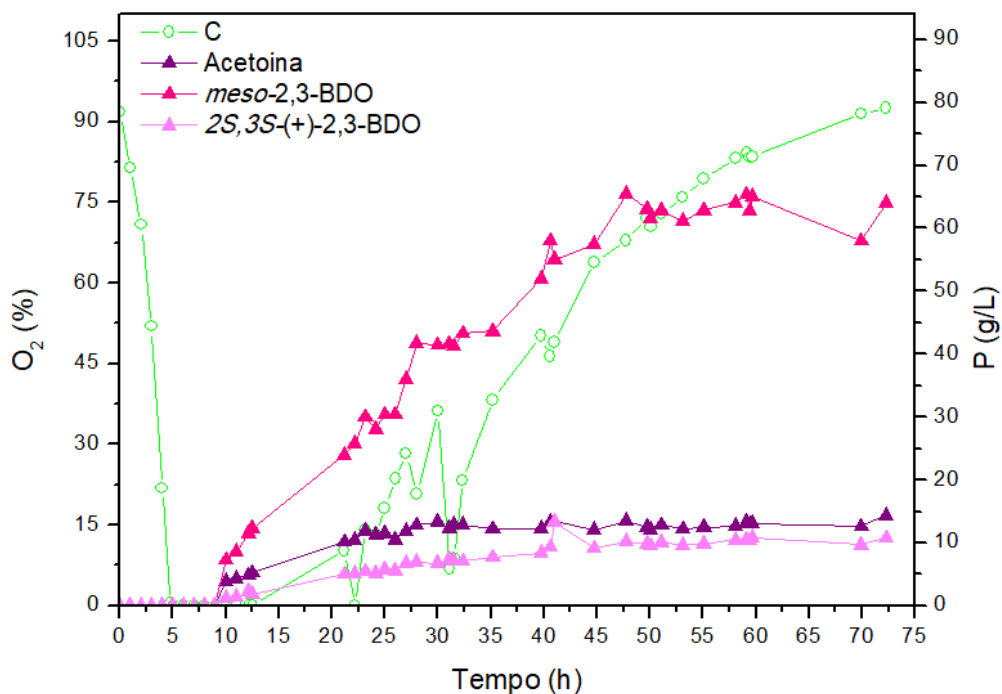


Figura 5. Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2S,3S-(+)-2,3-BDO e acetoína em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 com glicose. Ensaio P1 – 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2S,3S-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoína.

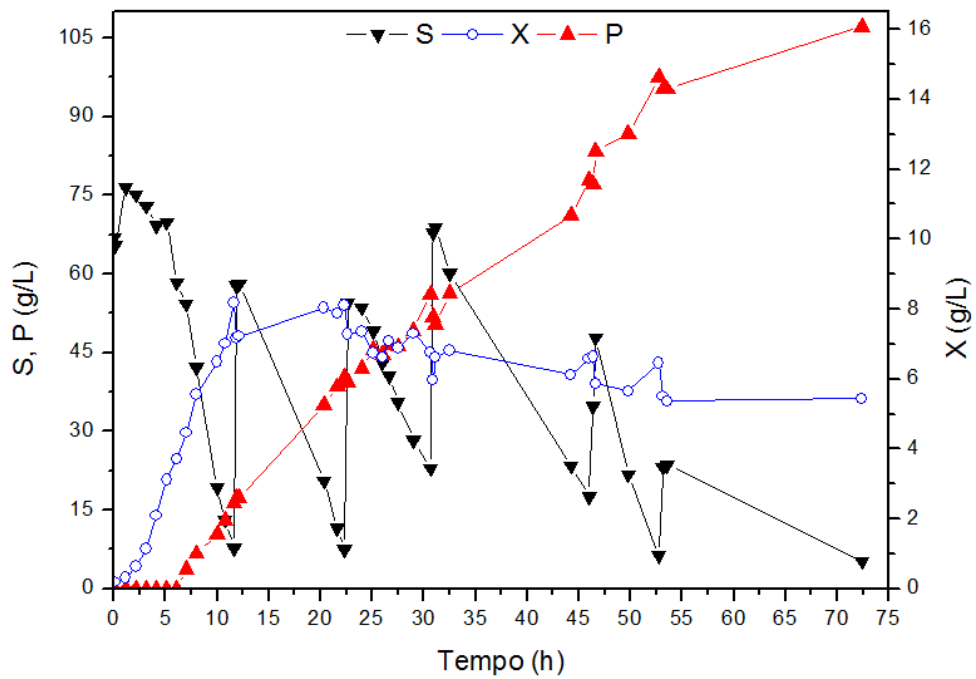


Figura 6. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol puro e produto final com o tempo em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Ensaio P2 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (▼) Glicerol puro (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC).

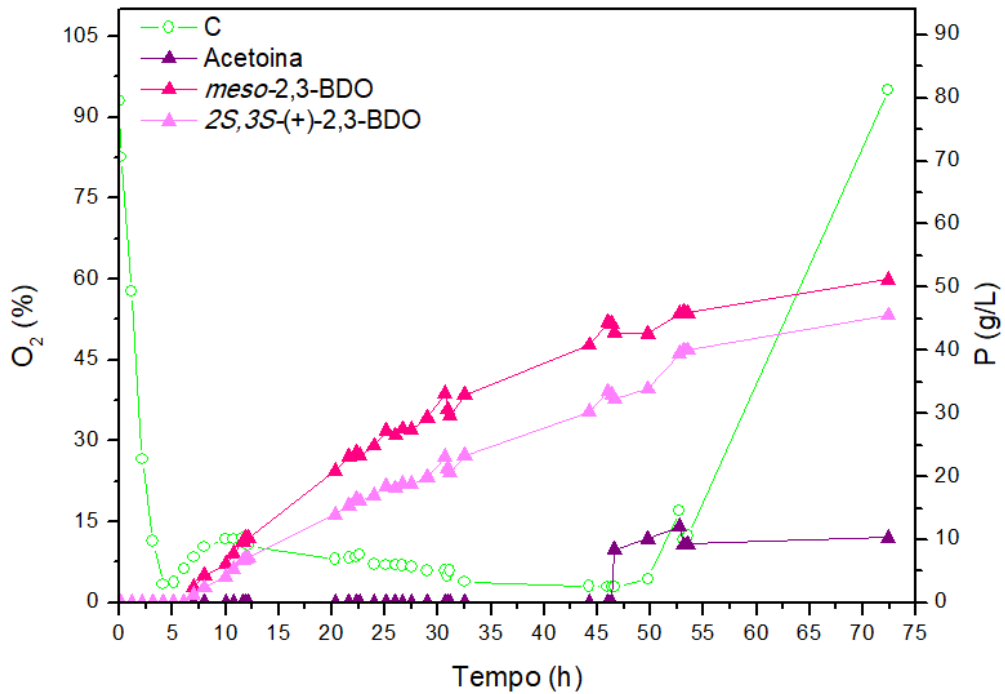


Figura 7. Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2S,3S-(+)-2,3-BDO e acetoína em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 com glicerol puro. Ensaio P2 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2S,3S-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoína.

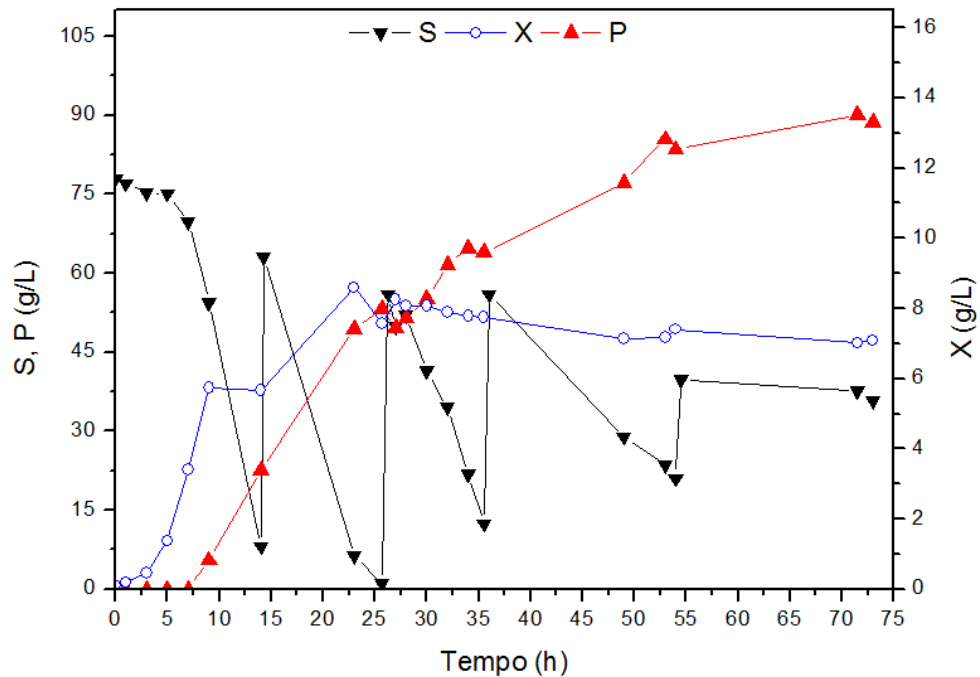


Figura 8. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol subproduto e produto final com o tempo em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Ensaio P3 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (▼) Glicerol subproduto (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC).

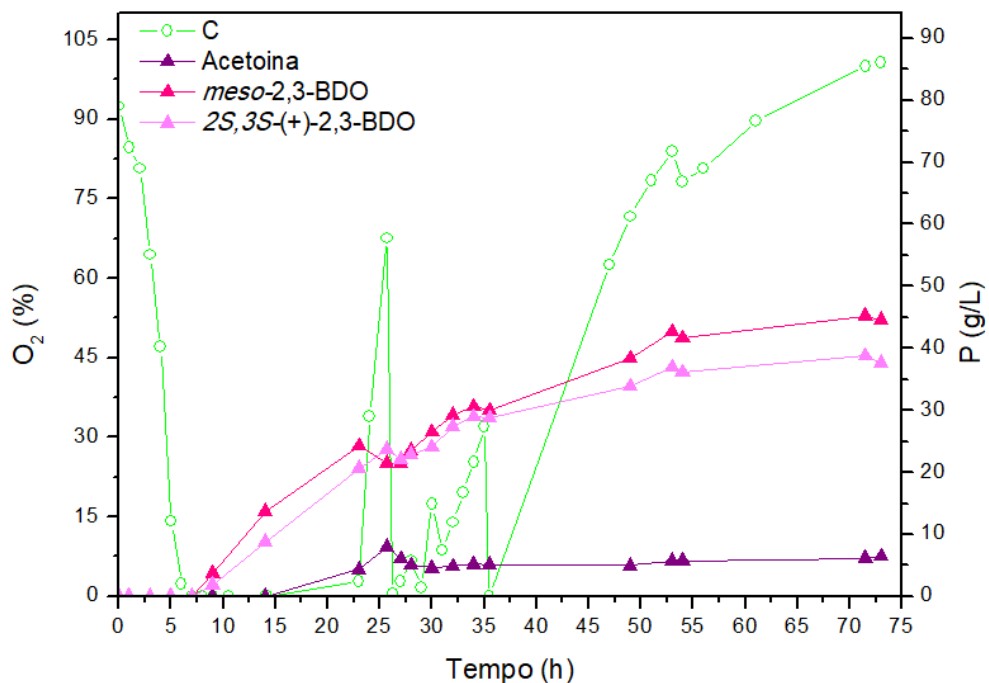


Figura 9. Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2S,3S-(+)-2,3-BDO e acetoína em cultivo de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 com glicerol subproduto. Ensaio P3 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2S,3S-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoína.

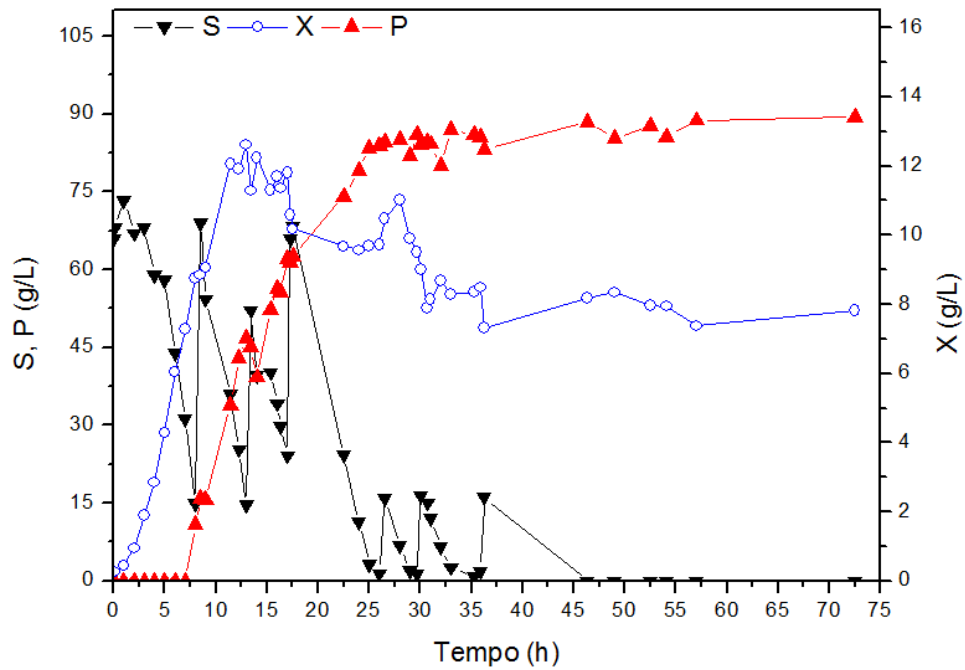


Figura 10. Variação das concentrações de biomassa celular, glicose e produto final com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Ensaio P4 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (▼) Glicose (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC).

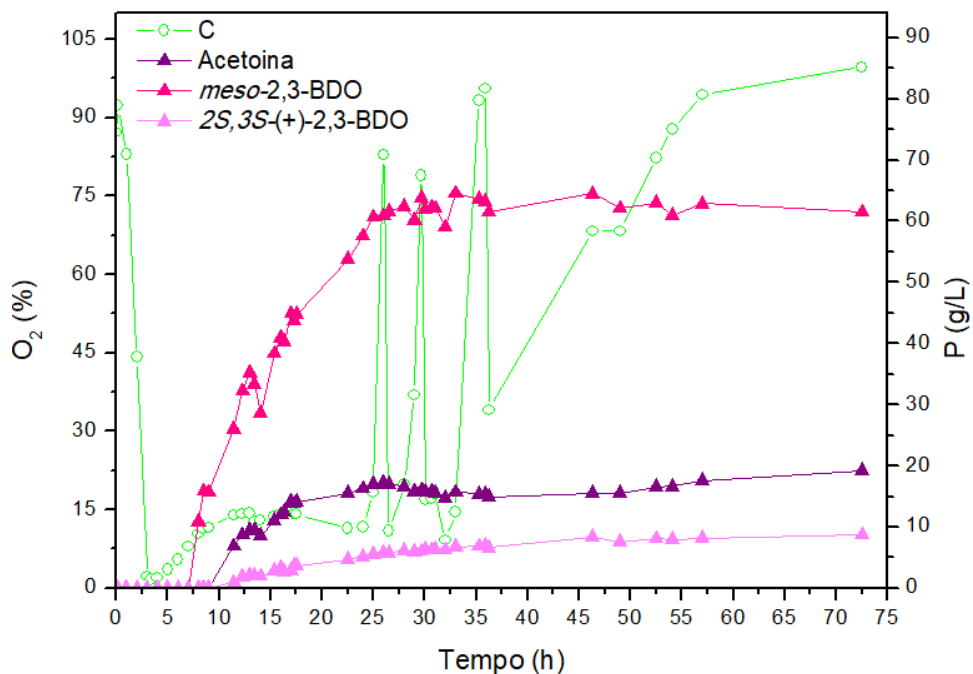


Figura 11. Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e acetoína em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com glicose. Ensaio P4 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoína.

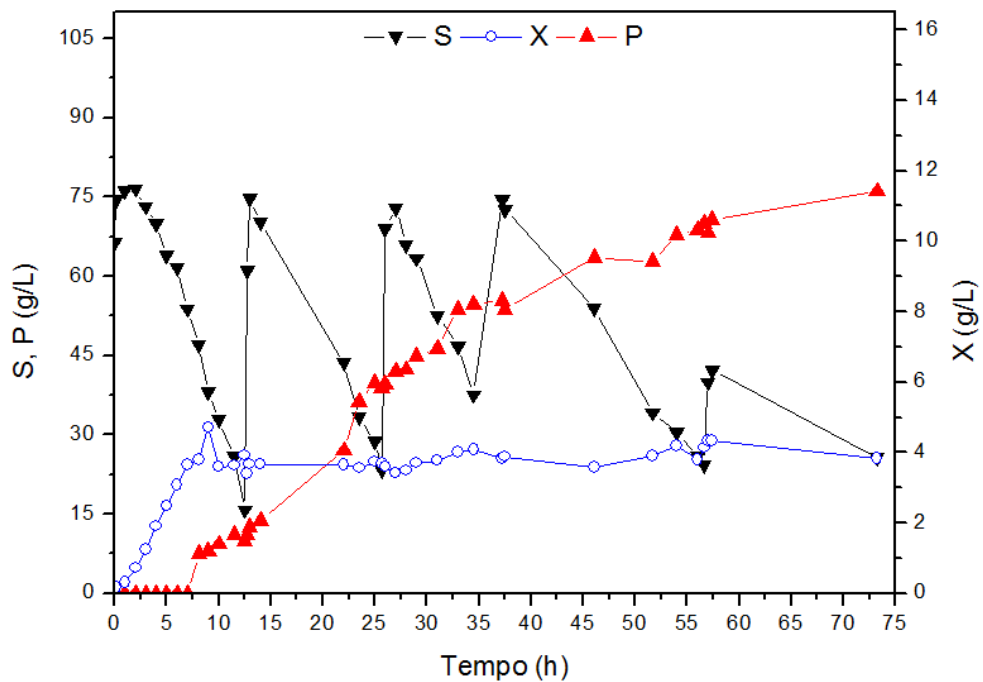


Figura 12. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol puro e produto final com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Ensaio P5 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (▼) Glicerol puro (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC).

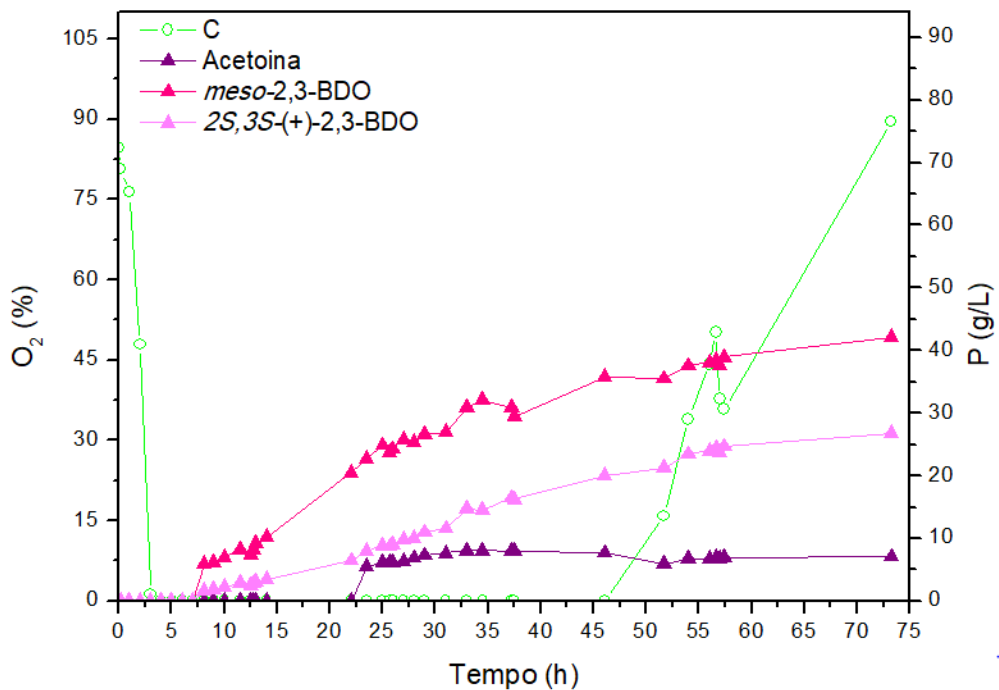


Figura 13. Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2S,3S-(+)-2,3-BDO e acetoina em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com glicerol puro. Ensaio P5 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2S,3S-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoina.

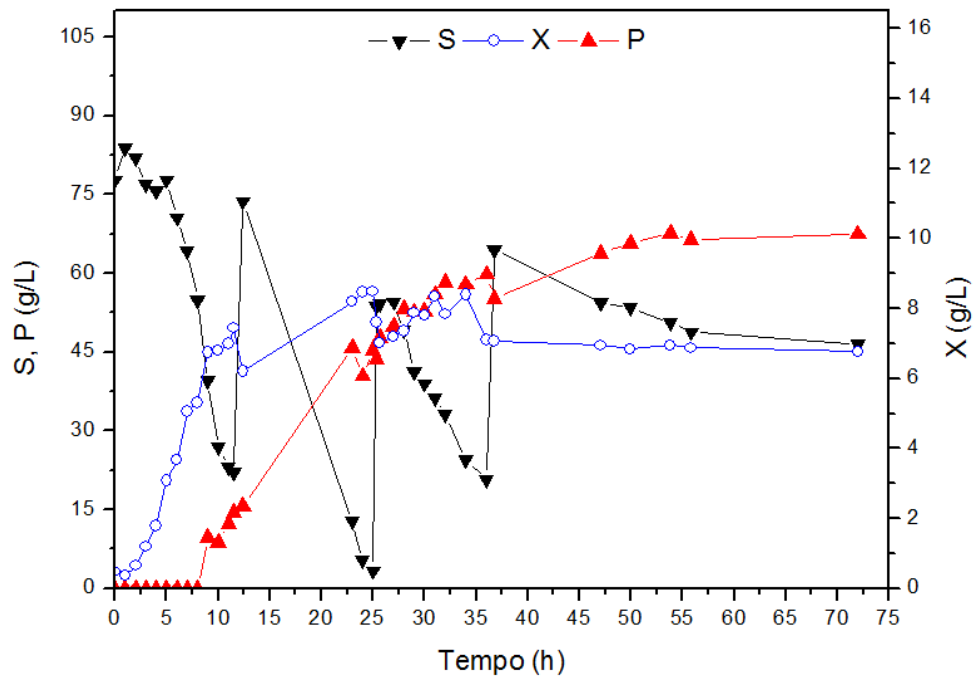


Figura 14. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol subproduto e produto final com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Ensaio P6 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (▼) Glicerol subproduto (S); (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC).

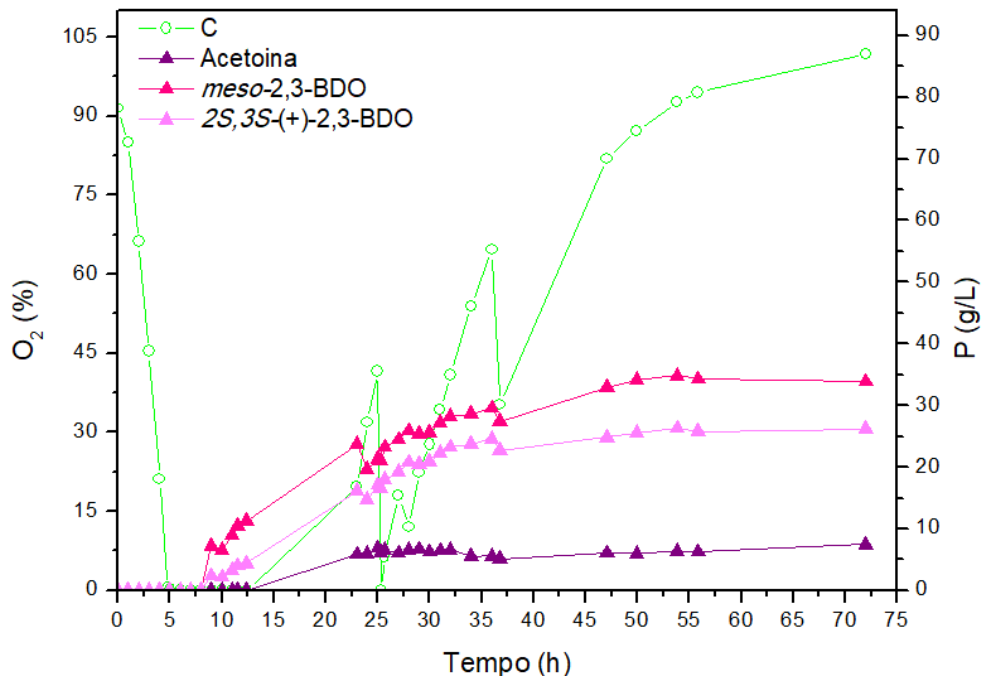


Figura 15. Variação das concentrações de oxigênio dissolvido, *meso*-2,3-BDO, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e acetoina em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com glicerol subproduto. Ensaio P6 - 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) Oxigênio dissolvido (C); (▲) *meso*-2,3-BDO; (▲) 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO; (▲) acetoina.

Nas Figuras 4 a 15 são observadas oscilações nos perfis cinéticos dos cultivos, tanto em função dos efeitos causados pelas alimentações com substrato e sais nutrientes, quanto em função da atividade respiratória do microrganismo, que é intensa nos períodos iniciais e reduzida nos períodos de fase estacionária.

As figuras também mostram o início da formação de produtos em concentrações nulas de oxigênio dissolvido no meio, sendo ainda identificado crescimento microbiano, indicando uma cinética semi-associada ao crescimento celular. A cinética semi-associada proposta por Gaden (1959) também foi observada por outros autores em cultivos para a produção de 2,3-BDO com a utilização de glicose (Sablayrolles & Goma, 1984), sacarose (Silveira, 1991) e caldo de cana-de-açúcar (Berbert-Molina, 1995). Cabe salientar que o oxigênio, por tratar-se de ensaios fermentativos conduzidos com microrganismos anaeróbios facultativos, foi fornecido durante todo o período dos cultivos, entretanto, são descritas concentrações nulas para os momentos em que constatou-se que todo o oxigênio fornecido estava sendo consumido.

Na Figura 4 referente ao Ensaio P1, com glicose como substrato para *K. oxytoca*, observa-se que foram realizadas um total de seis alimentações com substrato. As alimentações foram realizadas nos seguintes tempos de cultivo: 11,8, 22,2, 31,1, 40,6, 50,1 e 59,4 h. Os sais concentrados (meio PC) foram adicionados as 28 e 31,1 horas, conforme previamente definido, e, em 59,4 h, de forma adicional. Juntamente com a 6ª alimentação, uma vez que já haviam sido consumidos cerca de 223 g/L de glicose, optou-se por uma alimentação adicional de sais. Entretanto, esta estratégia pode ter contribuído para a estagnação no cultivo, possivelmente em função do excesso de sais acumulados no meio, sendo também determinada concentração residual média de 34,6 g/L de glicose.

Quanto à adição da solução de sais concentrada ao longo dos cultivos, Berbert-Molina et al. (2001) demonstrou que a concentração de sais descrita no meio PC foi suficientemente adequada para promover o consumo, em 35 h de fermentação, de até 180 g/L de sacarose presentes em caldo de cana diluído, utilizado como substrato para a obtenção de 2,3-BDO em regime descontínuo. Segundo os autores, entretanto, o substrato em questão apresenta características específicas, contendo diferentes íons na composição. Girardi (2014), por outro lado, relata que para altas concentrações de glicerol puro em ensaios conduzidos em regime descontínuo com *E. aerogenes* são exigidas maiores concentrações de nutrientes, em função dos longos tempos de processo. Nos ensaios conduzidos em regime descontínuo, Girardi (2014) utilizou soluções concentradas de sulfato e fosfato de amônio, sendo verificada a retomada do metabolismo microbiano pela via oxidativa na qual a formação de células é

priorizada. Contudo, no presente trabalho, não tendo sido identificado efeito positivo nos resultados do ensaio P1, a 3ª etapa de adição de sais, além das duas previamente definidas, foi descartada para os demais cultivos deste grupo (P2 a P6).

Os perfis em termos de concentração de oxigênio dissolvido e formação dos produtos em meio com glicose são apresentados na Figura 5. Com relação à concentração de oxigênio dissolvido, este permaneceu em solução por aproximadamente 4,8 h, período relacionado com a fase exponencial de crescimento (Figura 4). Foram identificadas oscilações na concentração de O₂ no decorrer do processo, principalmente até cerca de 35 h de fermentação. Após este período, identificaram-se concentrações crescentes de O₂ até o final da fermentação. Mesmo em concentrações mensuráveis de oxigênio disponíveis no meio, constatou-se um longo período de fase estacionária, a qual se manteve até o final do cultivo, fato que foi observado também nos outros ensaios deste grupo (P2 a P6).

Na Figura 5, Ensaio P1, pode ser verificada a produção - em quantidades mensuráveis - de acetoína e dos isômeros *meso* e 2*S*,3*S*-(+), a partir de 10h de processo: 3,99, 7,32 e 1,27 g/L, respectivamente. Para o ensaio P1, foram atingidas concentrações entre 60-64 e 10-11 g/L de *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-, respectivamente, em 48 h, sendo observada a manutenção nestes patamares até o final do processo, em 72 h.

No Ensaio P2 (Figuras 6 e 7) conduzido com o emprego de glicerol puro como substrato, foram realizadas cinco alimentações em 11,9, 22,6, 30,9, 46,4 e 53,1 h de cultivo, correspondendo aos picos nas concentrações do substrato (S) identificados na Figura 6. A solução de sais foi adicionada em 26,6 e 30,9 h. Neste cultivo, após a 5ª alimentação, ainda foi observado um perfil de consumo de substrato, embora em baixa velocidade. Sendo assim, uma 6ª alimentação com substrato concentrado (90 g – 18 g/L), não identificada na Figura 6, foi realizada em 78,6 h, com um intuito de verificar a retomada do metabolismo; entretanto, não houve utilização considerável da fonte de carbono, representada pelo consumo de cerca de 1 g/L até 116 horas (dados não mostrados).

Na Figura 7 (Ensaio P2) a produção do diol (2,56 e 1,24 g/L) é observada a partir de 7 h de processo, entretanto, só foi possível quantificar a produção de acetoína (8,46 g/L) a partir de 46,6 h. O aumento das concentrações de oxigênio dissolvido no meio de cultivo começou a ser notado em torno de 53 h de fermentação, com concentrações de acetoína de 9,3 g/L e dos isômeros *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO de 46 e 40 g/L, respectivamente, com produtividade de 1,80 g/L/h. Neste ensaio, a maior concentração final de produto (P_f), entre todos os ensaios, foi atingida: cerca de 107 g/L de 2,3-BDO e acetoína. No período entre 53 e 72,4 h observou-se o aumento nas concentrações de O₂, atingindo 100% ao final da

fermentação apesar das baixas concentrações de glicerol presentes no meio (~5 g/L), o que pode ter relação com uma forte inibição pelas elevadas concentrações de produtos, aliada, possivelmente, ao acúmulo de sais provenientes do meio de cultivo.

Em cultivo de *K. oxytoca* em meio mineral contendo glicerol subproduto, Ensaio P3 (Figura 8), nota-se que o consumo da fonte de carbono foi mais lento. Foram realizadas somente quatro alimentações com substrato em 14,2, 26,2, 36,0 e 54,5 h, e adição de sais em 31 e 36 h de cultivo. A partir da 4ª alimentação com solução concentrada de glicerol subproduto, houve pouco consumo do substrato adicionado, sendo utilizado cerca de 4 g/L em 18,5 h (entre 54,5 e 73 h). O consumo relativamente ineficiente do glicerol subproduto, quando comparado com glicose e glicerol puro, pode indicar que o metabolismo de *K. oxytoca* foi afetado pela presença de impurezas neste substrato.

Quanto à produção de acetoína e dos isômeros de 2,3-BDO (Figura 9), foram quantificados cerca de 3,69 e 1,85 g/L dos isômeros *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO em 9 h e, 4,39 g/L de acetoína em 23 h. No decorrer da fermentação, atingiram-se valores entre 42-44,6 e 36-37,7 g/L para os isômeros *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-, respectivamente, entre 53 e 73 h. A concentração de acetoína se manteve estável entre 27 e 73 h, com valores próximos de 6 g/L. Quanto ao perfil de concentração de oxigênio dissolvido no Ensaio P3, após a acentuada queda no início do cultivo em função do crescimento celular, de forma semelhante aos Ensaios P1 e P2, identificou-se a oscilação, com concentrações mensuráveis de O₂ quando baixas concentrações de substrato estavam disponíveis, até 35 h. Após, observou-se o aumento progressivo da concentração de O₂ no meio até 73 h, com valor próximo de 100% em relação à saturação, e pouca variação nas concentrações de produtos formados entre 50 e 70 h de processo (Figura 9). A inibição do metabolismo microbiano e o conseqüente aumento da disponibilidade de O₂ no meio podem ter sido resultado de um conjunto de fatores, sendo no caso da utilização do glicerol subproduto, considerados, a concentração de produtos, o acúmulo de impurezas provenientes do glicerol e a composição do meio de cultivo.

Quanto aos ensaios realizados com *E. aerogenes*, no cultivo conduzido em meio formulado com glicose (Ensaio P4 – Figura 10), seis alimentações com substrato foram efetuadas em 8,5, 13,4, 17,3, 26,5, 30 e 36,2 h de processo, constituindo-se em períodos mais curtos quando comparados aos cultivos de *K. oxytoca* com o uso de ambas as fontes de carbono. Tendo em vista os tempos de adição de substrato, sugere-se que a glicose é facilmente assimilada por *E. aerogenes*, sendo o consumo da glicose mais rápido do que as demais fontes de carbono, podendo ser considerado um substrato preferencial. Além do substrato, em 16,3 e 17,3 h foram adicionadas a solução concentrada de sais.

Concentrações de produtos foram quantificadas em 10,9 g/L para *meso*-2,3-BDO em 8 h; 6,9 g/L para acetoína em 11,4 h e 1 g/L para 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO em 11,4 h (Figura 11). Em 25 h de fermentação, as concentrações de acetoína, *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO alcançadas foram de 17,1, 60,7 e 5,6 g/L, respectivamente, com produtividade de 3,34 g/L/h. Entre o período de 25 a 36 h houve pouca variação na concentração de produtos, o que pode indicar que a glicose fornecida ao cultivo (90 g – 18,4 g/L), durante o intervalo, foi preferencialmente consumida na via oxidativa, priorizando a formação de células. Além disso, concentrações mensuráveis de O₂ estiveram presentes no meio durante praticamente toda a fermentação, o que possivelmente favoreceu o metabolismo respiratório em detrimento da formação de produtos. Ao final do processo, as concentrações de oxigênio chegaram a cerca de 100% da saturação, sendo o aumento gradativo também coincidente com o esgotamento do substrato no meio.

No ensaio P5, conduzido empregando-se o glicerol puro como substrato em cultivo de *E. aerogenes*, foram feitas quatro alimentações com substrato em 12,7, 26, 37,2 e 57 h, mostradas na Figura 12. A solução de sais nutrientes foi adicionada em 34,5 e 37,2 h. Uma alimentação adicional de substrato foi realizada em 80,5 h (dados não mostrados), uma vez que ao final de 73,2 h de cultivo foi constatado um perfil de queda nas concentrações da fonte de carbono disponível, sendo quantificados cerca de 20 g/L de glicerol no meio em 80 h. Entretanto, após esta 5ª alimentação, não foi observado o consumo de substrato em taxas significativas, sendo consumidos cerca de 4,1 g/L de glicerol em um período de 37,9 h. A produção do diol e acetoína no Ensaio P5 foi observada a partir de 8 e 23,5 h de cultivo, sendo atingidas concentrações de 5,9 e 1,6 g/L de *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e 5,5 g/L de acetoína, respectivamente.

Quanto ao perfil obtido para as concentrações de oxigênio dissolvido ao longo do cultivo e para o consumo de substrato no Ensaio P5, é possível afirmar que após a realização da 3ª e 4ª alimentação com substrato, a velocidade de consumo da fonte de carbono e, conseqüentemente, a formação de produtos foi reduzida, sendo também observado aumento da concentração de O₂ a partir de 46 h, atingindo-se cerca de 90% de O₂ ao final da fermentação (Figura 13). O perfil mostrado sugere, possivelmente, inibição pelas concentrações de produtos (76,2 g/L), aliada ao acúmulo dos sais do meio que não foram consumidos, uma vez que, teoricamente o suprimento de oxigênio foi adequadamente dimensionado, embora os resultados não sejam conclusivos.

Com a utilização de glicerol subproduto para *E. aerogenes*, Ensaio P6, observou-se um comportamento diferente, uma vez que foram realizadas somente três alimentações com

substrato, em 12,4, 25,3 e 36,7 h (Figura 14). Isto porque identificou-se a redução do consumo de substrato entre 47 e 72 h e, adicionalmente, estabilização das concentrações de produto. A solução concentrada de sais nutrientes neste cultivo foi adicionada ao meio em 28 e 36,7 h.

Para o Ensaio P6, concentrações de produtos em quantidades mensuráveis foram observadas em 9 e 23 h de cultivo, com valores de 7,2 e 2,4 g/L de *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e de 5,9 g/L de acetoína (Figura 15). Como observado nos outros ensaios, a concentração de oxigênio dissolvido tende a subir quando há baixa disponibilidade de substrato no meio. A partir 36,7 h foi observado aumento progressivo da concentração de O₂, coincidindo com a fase de estagnação do processo. De forma semelhante a observada para *K. oxytoca* no ensaio conduzido com glicerol subproduto, a linhagem *E. aerogenes* também parece ser fortemente afetada pelas impurezas contidas no substrato, levando à interrupção do processo.

A fim de comparar os dados alcançados neste grupo de ensaios, na Tabela 9 é mostrado um resumo dos resultados gerais obtidos nos cultivos P1 a P6, de *K. oxytoca* e *E. aerogenes*, contendo as diferentes fontes de carbono. Na Tabela 9, as concentrações de produto final (P_f) referem-se a soma das parcelas correspondentes aos isômeros de 2,3-BDO e a produção de acetoína, conforme previamente proposto por Jansen et al. (1984) para a análise do processo.

Como observado na Tabela 9, as máximas velocidades específicas de crescimento microbiano (μ_{xm}) obtidas para glicose, glicerol puro e glicerol subproduto nos ensaios com *K. oxytoca* foram de 0,453, 0,597 e 0,479 h⁻¹, dados inferiores àqueles alcançados em cultivos de *E. aerogenes*, 0,690, 0,703 e 0,525 h⁻¹, considerando a mesma sequência de substratos supracitada. Os resultados inferiores de μ_{xm} atingidos nos cultivos de *K. oxytoca* sugerem que o metabolismo da linhagem é afetado, em maior grau, pela concentração inicial de substrato utilizada nos ensaios ($S_0 = 80$ g/L). Segundo Romio (2014), em regime descontínuo, concentrações de glicerol puro de até 60 g/L não são inibitórias para o crescimento celular de *K. oxytoca*. No estudo de Romio (2014), para concentrações de glicerol puro entre 20 e 60 g/L, os valores de μ_{xm} foram praticamente iguais, 0,72-0,73 h⁻¹, enquanto para concentrações de 80 e 100 g/L estes valores foram de 0,52-0,56 h⁻¹.

Para os ensaios com *K. oxytoca* (P1, P2 e P3), na comparação frente aos diferentes substratos, o crescimento celular foi favorecido com o emprego de glicose (P1) como fonte de carbono e energia, obtendo-se maior valor de biomassa (10,3 g/L) no decorrer do processo e resultados superiores de $Y_{X/S}$.

Tabela 9. Resultados gerais obtidos em cultivos de *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em meios contendo glicose, glicerol puro e glicerol subproduto como substratos em regime descontínuo alimentado (frequência de agitadores, 700 rpm, fluxo específico de ar, 0,5 vvm, 37°C, pH 5,5, S₀, 80 g/L). Ensaios P1 a P6.

Ensaio	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724									<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048								
	P1			P2			P3			P4			P5			P6		
t _f (h)	11	35	72,3	11,6	35	72,4	14	35	73	8	35	72,5	12,5	35	73,2	11,5	35	72
X _f (g/L)	9,5	11,6	10,3	7,4	6,3	5,4	6,8	7,9	7,1	8,9	8,7	8,6	3,9	3,9	3,8	7,2	7,4	6,8
μ _{xm} (h ⁻¹)	0,453	--	--	0,597	--	--	0,479	--	--	0,690	--	--	0,703	--	--	0,525	--	--
Y _{X/S} (g/g)	0,168	0,064	0,046	0,109	0,038	0,023	0,110	0,049	0,037	0,128	0,037	0,034	0,067	0,029	0,020	0,131	0,048	0,041
Acetoína (g/L)	4,7	12,7	14,4	--	--	10,3	--	5,3	6,5	--	16,3	16	--	7,8	7,1	--	6,1	7,4
meso (g/L)	10,3	48,3	64,1	9,6	35,1	51,2	11,1	32,0	44,6	13,5	62,9	62,8	10,1	31,3	42,2	9,8	29,9	33,9
2S,3S-(+)- (g/L)	1,8	8,4	10,8	6,4	24,7	45,6	8,8	30,1	37,7	--	6,9	8,5	3,0	15,1	26,9	3,8	24,6	26,2
2,3-BDO (g/L)	12,1	56,7	74,9	10,0	59,8	96,8	19,9	62,1	82,3	13,5	69,8	71,3	13,1	46,3	69,1	13,6	54,5	60,1
P _f (g/L)	16,8	69,4	89,3	10,0	59,8	107,1	19,9	67,4	88,8	13,5	86,1	87,3	13,1	54,2	76,2	13,6	60,6	67,5
Y _{P/S} (g/g)	0,297	0,382	0,397	0,234	0,363	0,454	0,324	0,418	0,470	0,195	0,364	0,353	0,230	0,403	0,403	0,249	0,396	0,410
p (g/L/h)	1,53	1,98	1,24	1,37	1,71	1,48	1,42	1,93	1,22	1,69	2,46	1,20	1,05	1,55	1,05	1,18	1,73	0,94
ρ (%)	59	76	79	48	74	93	66	85	96	39	73	71	47	82	82	51	81	84
S _c (g/L)	57	182	225	68	165	236	62	161	189	69	236	247	57	134	193	55	153	165
S _{eq} (g/L)	--	--	259	--	--	241	--	--	225	--	--	247	--	--	219	--	--	211

t_f – tempo final de processo; μ_{xm} – máxima velocidade específica de crescimento microbiano; Y_{X/S} - fator de conversão de substrato em células; P_f – soma das concentrações de produto final (2,3-BDO + AC); Y_{P/S} – fator de conversão de substrato em produto; p – produtividade volumétrica; ρ – rendimento em produto em relação ao máximo teórico; S_c – substrato consumido; S_{eq} – concentração de substrato equivalente.

Quando analisados os resultados para concentração final de produtos (P_f), foram alcançados aproximadamente 89 g/L de 2,3-BDO e acetoína com o uso de glicose e glicerol subproduto no meio, com produtividades de 1,24 e 1,22 g/L/h em P1 e P3, respectivamente. A maior concentração final de produtos ($P_f = 107,1$ g/L) foi atingida com o uso do glicerol puro, Ensaio P2, com a maior produtividade (p) de 1,48 g/L/h, independentemente da biomassa gerada no cultivo, a qual foi superior para o uso da glicose.

A produção de etanol não foi considerada para a avaliação deste grupo de ensaios, tanto para os Ensaios P1 a P3, quanto para os Ensaios P4 a P6. Também pode ser relatado sobre os ensaios P1 a P6, que ao contrário do que se observa para a produção de 2,3-BDO e acetoína, não houve grandes variações na concentração de etanol ao longo dos cultivos, obtendo-se concentrações de até 5 g/L para todos os cultivos (dados não mostrados). Conforme Almeida et al. (2012), bactérias da família Enterobacteriaceae são capazes de converter glicerol em etanol, entretanto, os rendimentos são relativamente baixos porque o etanol é apenas um produto secundário da fermentação. De acordo com Girardi (2014), com o uso de concentrações crescentes de glicerol puro e em condições semelhantes às aplicadas no presente estudo, 2,3-BDO e acetoína são os produtos preferenciais.

Com relação ao consumo de substrato (S_c) para *K. oxytoca*, com a utilização de glicose e glicerol puro o consumo foi semelhante, sendo de 225 e 236 g/L, respectivamente. Entretanto, a formação de produtos com o uso destes substratos foi marcadamente diferente, de 89 e 107,1 g/L. Para glicerol subproduto, o consumo de substrato foi de apenas 189 g/L, porém, foram obtidos resultados superiores para $Y_{P/S}$ durante todo o período da fermentação. Também foram obtidos os maiores rendimentos (ρ) para glicerol puro (93%) e glicerol subproduto (96 %), sugerindo que a maior parcela do glicerol é convertida a produtos.

Em se tratando da identificação dos diferentes isômeros de 2,3-BDO formados nos ensaios P1, P2 e P3, a utilização do glicerol puro e subproduto como substratos de fermentação favoreceu a produção do isômero 2*S*,3*S*-(+)- e, por outro lado, na presença de glicose, verificou-se a predominância do isômero *meso*. Em relação a soma dos produtos finais (P_f) (2,3-BDO e acetoína) para glicose, houve a formação de aproximadamente 16% de acetoína (Ensaio P1), enquanto para glicerol puro e subproduto, esses percentuais foram de apenas 7 e 9% (Ensaios P2 e P3).

Apesar de consumos de substrato semelhantes para o uso da glicose e glicerol puro sob as mesmas condições de cultivo, quando analisadas as concentrações de 2,3-BDO, foram atingidos cerca de 74,9 e 96,8 g/L, para glicose e glicerol, respectivamente. Com a utilização da glicose a distribuição dos isômeros em relação ao glicerol foi diferente, pois a proporção

dos isômeros *meso* e 2*S*,3*S*(+)- foi de aproximadamente 85 e 15 % com glicose, frente a uma distribuição de 53 e 47 % com glicerol, respectivamente, ao final dos ensaios. Considerando os aspectos relatados quanto aos perfis cinéticos de ambos os cultivos (Figuras 4 a 7), ao final das fermentações havia inibição pelas concentrações de produto, aliadas as concentrações de sais provenientes do meio PC.

Okonkwo et al. (2017) sugerem que além da inibição pelas altas concentrações de produtos, pode haver inibição de acordo com as concentrações dos diferentes isômeros de 2,3-BDO no meio, evidenciados pela análise dos resultados atingidos em cultivos com *P. polymyxa* com glicose como fonte de carbono. Segundo os autores, para *P. polymyxa* o isômero *meso* exerce menor grau de inibição. Dado que *P. polymyxa* produz predominantemente o isômero 2*R*,3*R*(-)-, o limite de toxicidade considerado a partir dos resultados obtidos foi de aproximadamente 48 g/L para as concentrações deste isômero. Neste caso, os autores relataram a produção tardia do isômero *meso* em fermentações, quando as concentrações do isômero 2*R*,3*R*(-)- atingiram níveis tóxicos, atribuindo o fato a um mecanismo de mitigação do estresse para reduzir a toxicidade mediada pelo 2*R*,3*R*(-)-2,3-BDO (Okonkwo et al., 2017).

Neste contexto, pode-se sugerir que as diferenças encontradas com relação aos isômeros de 2,3-BDO formados para os substratos glicose e glicerol puro, poderiam contribuir para explicar a menor concentração de 2,3-BDO observada em meio contendo glicose, além de outros fatores, como a maior produção de células e concentração superior de acetoina observadas. Os dados apresentados também indicariam que concentrações específicas dos isômeros *meso* e 2*S*,3*S*(+)- podem causar a estagnação do processo para diferentes linhagens bacterianas. Além disso, concentrações de *meso*-2,3-BDO próximas de 64 g/L atingidas com glicose, aparentemente, poderiam ser consideradas como indícios de um limite tolerável para concentrações deste isômero no meio por *K. oxytoca*, dado que ainda haviam aproximadamente 34,6 g/L de substrato disponível no meio.

Com a utilização do glicerol subproduto em comparação ao ensaio com glicose, houve menor produção de biomassa e consumo de substrato inferior para glicerol, contudo, a concentração final de produtos foi semelhante com ambos os substratos (~89 g/L). Para a utilização do glicerol subproduto maior produção do diol foi observada (82,3 g/L) em relação à glicose (74,9 g/L). Além disso, para glicerol subproduto as proporções dos isômeros *meso* e 2*S*,3*S*(+)-2,3-BDO foram de 52 e 46 %, respectivamente.

Quando analisados os dados obtidos para ambas as fontes de glicerol, observou-se menor concentração de produto final (P_f) e menor consumo de substrato (S_c) para glicerol

subproduto. Considerando que para glicerol puro foram atingidas concentrações de 2,3-BDO notavelmente mais elevadas do que as observadas como uso de glicose e que, com glicerol subproduto, este comportamento não foi alcançado, pode-se salientar que no caso do glicerol subproduto, além das características de inibição pelo produto e pelo acúmulo de sais provenientes do meio, houve uma inibição conjunta em função das impurezas presentes no substrato. Esta hipótese também é evidenciada pelas máximas velocidades específicas de crescimento microbiano (μ_{xm}) atingidas com ambas as fontes de glicerol, sendo que para glicerol subproduto, este parâmetro foi inferior ($0,479 \text{ h}^{-1}$).

Quanto aos resultados alcançados para os ensaios com *E. aerogenes* - P4, P5 e P6 -, mostrados na Tabela 9, em termos gerais, na comparação dos cultivos conduzidos com os diferentes substratos, pode-se observar que, com glicose, o crescimento microbiano foi favorecido, em relação ao uso do glicerol puro. Porém, a diferença em termos de concentração celular final (X_f) e fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foi inferior para o uso do glicerol subproduto versus glicose.

Com relação ao consumo de substrato (S_c), este foi superior para a utilização da glicose (247 g/L) em comparação ao glicerol puro (193 g/L) e subproduto (165 g/L). Com respeito à formação de produtos (P_f) nos ensaios com *E. aerogenes* (P4, P5 e P6), foram alcançados aproximadamente 87,3, 76,2 e 67,5 g/L de 2,3-BDO e acetoína para glicose, glicerol puro e glicerol subproduto, respectivamente, com produtividades de 1,20, 1,05 e 0,94 g/L/h. Embora a concentração final de produto (P_f) tenha sido inferior empregando-se glicerol subproduto como substrato, foram atingidos rendimentos de 82% para glicerol puro e 84% para glicerol subproduto, enquanto que para a glicose, observou-se menor rendimento, cerca de 71%. Os resultados alcançados sugerem que com o uso de ambas as fontes de glicerol a maior parcela do substrato é direcionada para via de formação de produtos.

Quanto aos isômeros do diol identificados nos ensaios com *E. aerogenes*, ao utilizar ambas as fontes de glicerol, puro e subproduto, a proporção foi em média de 61 e 39% para *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO com glicerol puro e de 56 e 44% para glicerol subproduto, respectivamente. Com a utilização de glicose, cerca de 88 e 12% foram alcançados para os isômeros *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO, respectivamente. Além disso, para glicose, a produção de acetoína em relação à soma de produtos finais (P_f) foi de 18%, e, para glicerol puro e subproduto, essa produção foi de 9 e 11%.

Quando avaliadas as concentrações dos diferentes isômeros do diol alcançadas para ambas as fontes de carbono e a possível inibição causada pela presença dos mesmos, percebe-se que com glicose as concentrações máximas atingidas para o isômero

meso-2,3-BDO foram de aproximadamente 63 g/L no período entre 35 e 72,5 h. As concentrações de acetoína também permaneceram inalteradas. Embora pouco substrato tenha sido fornecido ao cultivo durante o período, e que possivelmente em função da disponibilidade de oxigênio no meio a via oxidativa tenha sido favorecida, ainda pode ser observada produção do isômero 2*S*,3*S*(+)-2,3-BDO. Este fato poderia sugerir um limite tolerável das concentrações do *meso*-2,3-BDO para *E. aerogenes*, embora sejam necessários mais estudos para esta afirmação.

Nos ensaios com *E. aerogenes*, ainda é possível observar que concentrações superiores de biomassa foram alcançadas nos cultivos com glicose (8,6 g/L) e glicerol subproduto (6,8 g/L) em comparação ao glicerol puro (3,7 g/L). No entanto, concentrações superiores de produto final (P_f) foram atingidas empregando-se como substratos glicose (87,3 g/L) e glicerol puro (76,2 g/L). Estes resultados podem indicar que a formação do produto não é diretamente dependente da quantidade de biomassa que é gerada nos cultivos.

Os resultados determinados para μ_{xm} ($0,525 \text{ h}^{-1}$) e S_c (165 g/L) nos experimentos com o uso do glicerol subproduto (Ensaio P6) sugerem que o metabolismo celular de *E. aerogenes* pode ter sido afetado negativamente em função da presença de impurezas presentes neste substrato, tais como excesso de sais, as quais podem ter causado algum grau de inibição ao processo, limitando o crescimento microbiano, o consumo de substrato e consequentemente a produção de metabólitos.

Por outro lado, em comparação, nos ensaios P5 e P6, com glicerol puro e glicerol subproduto, respectivamente, obteve-se maior concentração celular no ensaio P6, o que refletiu na taxa de utilização do substrato superior para P6 até 35 h, obtendo-se concentrações de produto mais elevadas (2,3-BDO e acetoína) com o uso do subproduto, no período avaliado, principalmente tratando-se da produção de 2,3-BDO que foi de 54,5 e 46,4 g/L para glicerol subproduto e glicerol puro, respectivamente. Após este período, considerando a possível inibição conjunta, em função dos produtos, sais do meio e impurezas da fonte de carbono, houve uma redução da taxa de consumo do substrato e consequentemente da formação de produtos, refletindo nos piores resultados globais obtidos com *E. aerogenes*.

Comparando-se aspectos gerais dos ensaios P4 a P6, pode-se sugerir que glicose é um substrato preferencial para *E. aerogenes*, obtendo-se as maiores concentrações celulares (X_f) (8,6 g/L) e maior concentração final de produtos (P_f) (87,3 g/L). Quando avaliados os resultados atingidos com a utilização de ambas as fontes de glicerol, observa-se que o metabolismo foi mais lento comparado ao uso da glicose em termos de consumo de substrato

e formação de produtos, sugerindo que o metabolismo de *E. aerogenes* é dificultado com o emprego do glicerol como fonte de carbono

Em uma busca de informações na literatura especializada que poderiam explicar estas diferenças no metabolismo de *E. aerogenes*, sabe-se que o glicerol é higroscópico, podendo ser empregado como agente umectante, sendo utilizado na conservação de alimentos e como estabilizante para atividade enzimática, ao reduzir e controlar a atividade de água (A_a) dos alimentos (Placek et al., 2005; Arruda et al., 2007; Pradima et al., 2017). No estudo de Marshal et al. (1970) sobre os efeitos do glicerol e do NaCl em meios de cultivo, os autores observaram que para diferentes espécies microbianas, quando comparados valores de A_a a níveis semelhantes, apenas três espécies responderam de forma idêntica aos dois solutos, sendo as demais, algumas mais sensíveis ao glicerol e outras mais sensíveis ao NaCl.

Girardi (2014) acrescenta que elevadas concentrações de glicerol puro utilizado para produção de 2,3-BDO em cultivos de *E. aerogenes*, associadas à baixa transferência de oxigênio podem ser mais prejudiciais para o desenvolvimento microbiano do que se observa com substratos açucarados.

A disponibilidade de oxigênio no meio neste grupo de ensaios (P1 a P6) pode estar ligada a fatores como as condições de operação impostas ao processo (agitação e aeração), esgotamento ou baixa concentração do substrato, fenômenos de inibição pelas concentrações do produto ou pelo acúmulo dos sais provenientes do meio, os quais não tenham sido totalmente consumidos, ou ainda, pela escassez de algum nutriente em específico, além da composição do glicerol subproduto, que contem impurezas. Todos estes fatores, possivelmente, possam causar a inibição do metabolismo microbiano, resultando nas concentrações crescentes de oxigênio observadas, tanto para os cultivos com *K. oxytoca* (Figuras 5, 7 e 9), quanto com *E. aerogenes* (Figuras 11, 13 e 15).

A utilização do glicerol como substrato, além da adição de sais concentrados do meio mineral PC e das elevadas concentrações de produtos alcançadas, pode ter contribuído para o estresse osmótico ocasionado à cultura. Com a utilização do glicerol subproduto, o estresse osmótico acaba sendo potencializado devido à composição do glicerol. De forma semelhante, estas considerações poderiam ser aplicadas ao uso do glicerol subproduto por *K. oxytoca*, contudo, *E. aerogenes* parece mostrar maior sensibilidade frente a estes aspectos. Cabe ressaltar que devido a forma de alimentação adotada, tanto para o fornecimento do substrato, quanto dos nutrientes ao meio de fermentação, a cultura foi submetida a choque osmótico em diferentes períodos da fermentação, o que poderia, futuramente, ser evitado ou minimizado pelo desenvolvimento de uma estratégia de alimentação mais adequada, possivelmente,

usando a alimentação contínua com a manutenção de baixas concentrações de substrato e nutrientes no meio.

Em termos de análise global dos resultados dos Ensaio P1 a P6, em suma, observa-se claramente a influência da fonte de carbono empregada como substrato na formação dos isômeros de 2,3-BDO por ambos os microrganismos utilizados, uma vez que houve uma maior produção do isômero 2*S*,3*S*(+)- para os cultivos nos quais utilizou-se glicerol puro e subproduto. Além disso, menor produção de acetoína foi observada comparado ao uso de glicose (Ensaio P1 e P4), tanto para *K. oxytoca* (14%), quanto para *E. aerogenes* (18%). Os resultados alcançados também corroboram o potencial de aplicação do glicerol subproduto como substrato para a produção de 2,3-BDO e acetoína por *K. oxytoca* e *E. aerogenes*, com rendimentos em produto superiores aos obtidos com a utilização da glicose. No entanto, além da adaptação das linhagens ao glicerol subproduto, torna-se necessário avaliar os possíveis efeitos inibitórios ocasionados pelas concentrações de produtos no meio, pelos diferentes isômeros de 2,3-BDO, pelos sais do meio e pelas substâncias presentes no glicerol.

Apesar da obtenção de resultados superiores quanto à formação de produtos e a utilização de ambas as fontes de glicerol nos ensaios conduzidos com *K. oxytoca* ATCC 8724, esta linhagem vem sendo utilizada ao longo de décadas em muitos estudos que abordam a produção de 2,3-BDO, a partir de diferentes substratos, com resultados análogos aos obtidos neste trabalho (Ramachandran et al., 1990; Silveira et al., 1993; Berbert-Molina et al., 2001; Romio, 2014). Isso poderia indicar que o microrganismo em questão encontra-se no seu limite de potencialidade, restando possivelmente como alternativa, abordagens modernas como a modificação genética da linhagem para a super-produção de 2,3-BDO, não sendo este o foco de abordagem a ser dado neste estudo.

Com relação a utilização da linhagem *E. aerogenes* ATCC 13048, um menor número de pesquisas é relatado (Perego et al., 2000; Converti & Perego, 2002; Girardi, 2014). Aliado a isso, observou-se a possibilidade de abordagens no sentido do aprimoramento de condições de processo e definição de meios de cultivo adequados para a manutenção do crescimento microbiano, o aumento da produção de 2,3-BDO e aumento das taxas de utilização do glicerol subproduto pela linhagem, havendo a potencialidade de obtenção de um desempenho similar ou superior aquele atingido por *K. oxytoca*.

Importante observar que as linhagens *K. oxytoca* ATCC 8724 e *E. aerogenes* ATCC 13048 apesar de terem sido utilizadas em diversos trabalhos e sem relatos de patogenicidade, à época da realização destes ensaios estavam incluídas na classe de risco 2 de biossegurança, nos sistemas de classificação de diversos países, o que poderia gerar alguma dificuldade

eventual em se tratando de aplicação em escala industrial. No entanto, em publicação recente do *National Institute of Health – United States of America*, em função da utilização de métodos de classificação modernos, ambas as linhagens encontram-se na classe de risco 1 no sistema de classificação norte-americano, o que as torna promissoras para a aplicação em processos fermentativos (National Institute of Health, 2017).

4.1.2 Crescimento microbiano e formação de produtos por *Enterobacter aerogenes* em diferentes meios de cultivo

Para a continuidade dos estudos foi selecionada a linhagem *E. aerogenes* ATCC 13048. Os ensaios tiveram como foco a avaliação da cinética de processo com o uso de diferentes meios de cultivo a fim de minimizar, em um segundo momento, os efeitos de inibição observados nos estudos anteriores em regime descontínuo alimentado com o uso do glicerol subproduto. Para isso, adotou-se a estratégia de utilização de meios relatados na literatura. Além disso, os estudos também tiveram como objetivo verificar a possibilidade de emprego de um meio simplificado e de custo inferior para esta fermentação, tendo em vista a utilização do glicerol subproduto, o qual contém alguns íons em sua composição.

Neste item são discutidos os resultados obtidos nos Ensaios M1 a M5, conduzidos em regime descontínuo, com concentrações iniciais de glicerol subproduto (S_0) de 40 g/L. Para efeitos comparativos, o meio PC foi usado como meio controle. Entre os meios empregados, nos Ensaios M1 a M3, foram utilizados o meio MA adaptado (Ma et al., 2009), rico em fonte de nitrogênio orgânico e fatores de crescimento em função da presença do extrato de levedura e, os meios PC (Pirt & Callow, 1958) e PR (Priya et al., 2016), ambos quimicamente definidos, no entanto, o segundo (meio PR) contendo menor quantidade de nitrogênio inorgânico. Também utilizou-se o meio simplificado MD4 (Ensaios M4 e M5).

Nas Figuras 16 a 18 são apresentados os perfis de crescimento celular (X), concentração de oxigênio dissolvido (C), consumo de substrato (S) e formação de produtos (P) obtidos nos Ensaios M1 a M3. Apesar de os cultivos não terem sido conduzidos com o mesmo inóculo e a viabilidade das células do inóculo não tenha sido avaliada, os perfis de crescimento microbiano para os ensaios 1 e 2 de cada respectivo meio utilizado foram muito semelhantes, embora em proporções diferentes.

Para os ensaios com os meios PC e PR (ensaio M1 e M3) (Figuras 16 e 18), observou-se um curto período de fase *lag* e acelerada queda nos valores de concentração de oxigênio dissolvido, que permaneceu em solução por aproximadamente 3 h, para ambos os

meios. O crescimento microbiano perdurou por cerca de 5 h (Ensaio M1 – meio PC) e 6 h (Ensaio M3 – meio PR). A formação de produtos nestes ensaios iniciou quando ainda havia crescimento microbiano e sob condições limitadas de oxigênio no meio.

Com o uso do meio MA (Ensaio M2) foi observado o maior tempo de fase *lag* (2-3 h), seguido de um perfil praticamente linear de crescimento que se estendeu por cerca de 10 h. Redução mais lenta no percentual de oxigênio dissolvido foi observado, com valores nulos ou muito próximos de zero medidos em 7 h de cultivo (Figura 17), coincidindo, de forma mais particular neste ensaio, com a etapa inicial de formação de produtos. Perfil praticamente linear de produção de 2,3-BDO e acetoína foi observado nesta condição de cultivo, sendo atingidos cerca de 11 g/L de produtos em 12 h de processo.

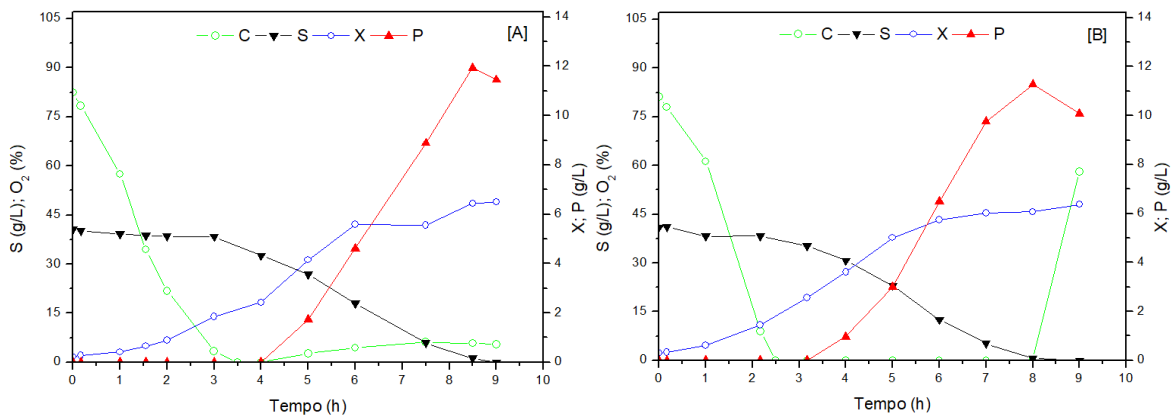


Figura 16. Perfil de crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos e concentração de oxigênio dissolvido nos cultivos com diferentes formulações de meio. $S_0 = 40$ g/L. [A] ensaio 1, meio PC; [B] ensaio 2, meio PC.

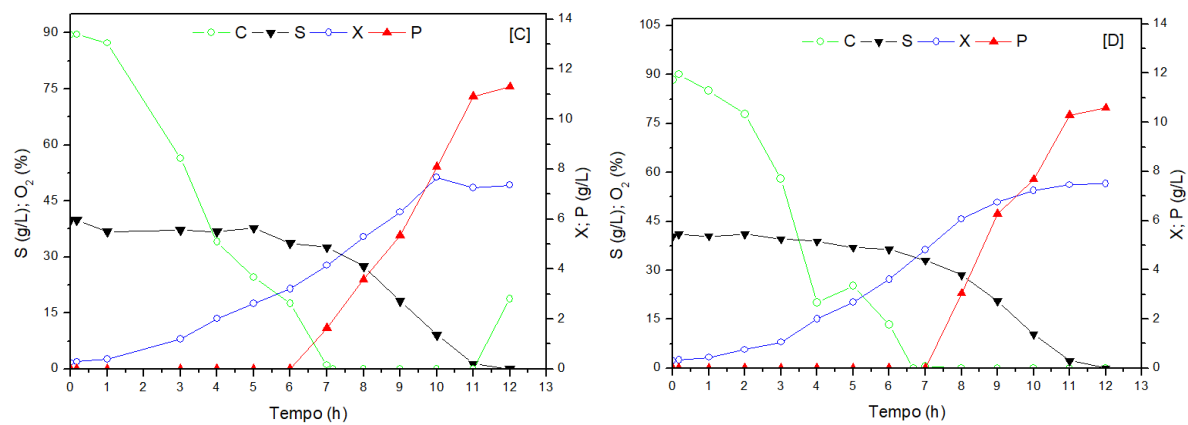


Figura 17. Perfil de crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos e concentração de oxigênio dissolvido nos cultivos com diferentes formulações de meio. $S_0 = 40$ g/L. [C] ensaio 1, meio MA; [D] ensaio 2, meio MA.

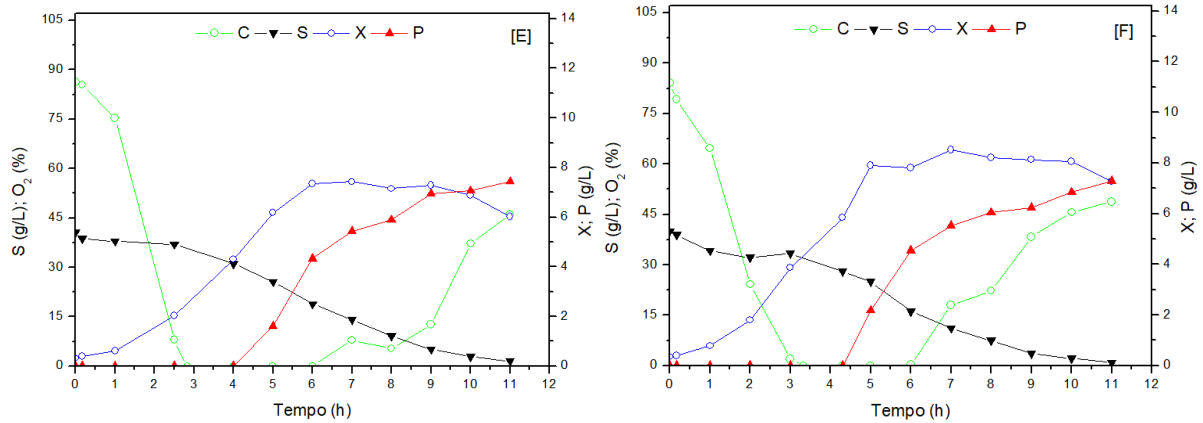


Figura 18. Perfil de crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos e concentração de oxigênio dissolvido nos cultivos com diferentes formulações de meio. $S_0 = 40$ g/L. [E] ensaio 1, meio PR; [F] ensaio 2, meio PR.

Os resultados gerais obtidos nos cultivos de *E. aerogenes* com o uso de glicerol subproduto adicionado aos meios com diferentes formulações (Ensaio M1, M2 e M3) são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados gerais dos cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, em biorreator de agitação mecânica, com o uso de glicerol subproduto adicionado aos meios com diferentes formulações (S_0 40 g/L). Ensaio M1 a M3.

Parâmetros	Meio PC	Meio MA	Meio PR
t_f (h)	9	12	11
S_0 (g/L)	$40,83 \pm 0,23^a$	$40,12 \pm 0,37^a$	$40,35 \pm 0,43^a$
X_i (g/L)	$0,27 \pm 0,06^a$	$0,28 \pm 0,03^a$	$0,33 \pm 0,02^a$
X_f (g/L)	$6,43 \pm 0,09^a$	$7,43 \pm 0,11^a$	$6,66 \pm 0,90^a$
μ_{xm} (h^{-1})	$0,703 \pm 0,002^b$	$0,455 \pm 0,001^c$	$0,834 \pm 0,020^a$
$Y_{X/S}$ (g/g)	$0,151 \pm 0,004^a$	$0,178 \pm 0,001^a$	$0,159 \pm 0,020^a$
p_{vx} (g/L/h)	$0,715 \pm 0,010^a$	$0,619 \pm 0,009^a$	$0,605 \pm 0,083^a$
P_f (g/L)	$11,37 \pm 0,12^a$	$10,94 \pm 0,50^a$	$7,36 \pm 0,11^b$
$Y_{P/S}$ (g/g)	$0,278 \pm 0,005^a$	$0,272 \pm 0,148^a$	$0,186 \pm 0,006^b$
ρ (%)	$56,96 \pm 0,93^a$	$55,79 \pm 3,07^a$	$38,02 \pm 1,14^b$
p_{vp} (g/L/h)	$1,263 \pm 0,013^a$	$0,912 \pm 0,042^b$	$0,669 \pm 0,009^c$
S_f (g/L)	$0 \pm 0,00^a$	$0 \pm 0,00^a$	$0,74 \pm 1,05^a$

t_f – tempo final de processo; S_0 – concentração inicial de substrato; X_i – concentração celular inicial; X_f – concentração celular final; μ_{xm} – máxima velocidade específica de crescimento microbiano; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; p_{vx} – produtividade volumétrica em células; P_f – concentração final de produto (2,3-BDO + AC); $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produto; ρ – rendimento; p_{vp} – produtividade volumétrica em produto; S_f – concentração final de substrato. Letras diferentes entre as colunas, resultados estatisticamente diferentes com $p < 0,05$, para duas repetições.

Pode-se observar que, quanto aos parâmetros relacionados ao crescimento microbiano, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas para X_f , $Y_{X/S}$ e p_{vx} , cujos resultados foram semelhantes aos obtidos com o meio controle PC. Quanto as máximas velocidades específicas de crescimento microbiano (μ_{xm}), pode ser observado que os resultados para μ_{xm} foram estatisticamente diferentes para todos os meios avaliados, tendo sido encontrados valores de $0,834 \pm 0,020$, $0,703 \pm 0,002$ e $0,455 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ para os meios PR, PC e MA, respectivamente.

Em meio PR, possivelmente em função da presença de menores quantidades de sais em sua composição e, conseqüentemente, menor pressão osmótica para a cultura, sugere-se que o crescimento microbiano tenha sido favorecido nas primeiras horas de cultivo, resultando em valor de μ_{xm} superior aos demais. Com relação ao meio MA, no qual foi obtido o menor μ_{xm} , considerou-se que a composição química do extrato de levedura e o conteúdo de impurezas do glicerol subproduto, aliados à composição da solução mineral do meio de cultivo, podem ter influenciado o crescimento celular. Este reflexo negativo em μ_{xm} pode ser devido a maior concentração de solutos presentes no meio, o que poderia ocasionar a redução da atividade de água (A_a) no meio.

Nos ensaios M1 a M3, os parâmetros P_f , $Y_{P/S}$ e ρ , relacionados aos produtos da fermentação, não foram estatisticamente diferentes. Exceção foi observada na produtividade volumétrica em produto (p_{vp}), que foi de $1,263 \pm 0,013$ e $0,912 \pm 0,042 \text{ g/L/h}$ para PC e MA, respectivamente, sendo influenciada pelo tempo de processo, que, neste caso, foi superior para o meio MA (12 h). Em relação ao meio PR (ensaio M3), os resultados para P_f , $Y_{P/S}$, ρ e p_{vp} , foram inferiores àqueles alcançados nos ensaios com os meios PC e MA (M1 e M2), sendo que a produção de 2,3-BDO e acetoina foi cerca de 34% inferior em relação aos outros meios, possivelmente em função da carência de nutrientes.

Importante observar os resultados atingidos com o meio PR, com destaque para o crescimento microbiano. Maior valor de μ_{xm} e concentrações celulares comparáveis aos outros meios estudados foram alcançados, o que indica que mesmo quantidades reduzidas de nutrientes podem suprir as necessidades nutricionais de *E. aerogenes* para o crescimento celular. Contudo, a menor produção do metabólito de interesse em meio PR, e, conseqüentemente, as diferenças encontradas para os parâmetros relacionados ao produto ressaltam a importância da identificação dos principais componentes do meio de cultivo que interferem diretamente na produção de 2,3-BDO e acetoina.

De forma geral, analisando os dados apresentados na Tabela 10, os melhores resultados foram obtidos com meio mineral PC, incluindo a maior produtividade volumétrica

em produto que foi de $1,263 \pm 0,013$ g/L/h, com o menor tempo de processo (9 h). Em função destes resultados, pressupõe-se que não haveria necessidade de adição de fontes de nitrogênio orgânico ao meio de fermentação, o que pode refletir nos custos associados para a viabilização desta fermentação.

Baseando-se nos resultados apresentados e discutidos, foi conduzido ensaio com o meio MD4, sendo também comparado ao meio controle (PC). O meio MD4 foi definido anteriormente a estes ensaios (M1 a M3), a partir de testes conduzidos em frascos agitados por 24 h, com 20 g/L de glicerol subproduto (dados não mostrados), nos quais foram mantidos no meio de cultivo (MD4) apenas os componentes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KOH e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, tendo também como base a composição do glicerol subproduto, uma vez que o substrato contém diversos íons como: Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} ou Fe^{3+} , K^+ e Ca^{2+} . Nestes ensaios (dados não mostrados) também observou-se que com a ausência de KOH no meio não houve crescimento microbiano.

Na Figura 19 pode ser observado um padrão de crescimento praticamente linear com o uso do meio simplificado MD4 (Ensaio M4), com ausência de fase *lag* e crescimento microbiano até o final do processo. Tal comportamento poderia estar ligado à transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida de forma facilitada, devido a menor concentração de solutos no meio em comparação aos demais meios estudados, favorecendo a respiração celular em detrimento da formação de produtos. Sob condições limitadas de suprimento de oxigênio, também identificou-se a formação de produtos, em perfil praticamente linear, sendo obtido, em média, 6 g/L em 10 h de cultivo.

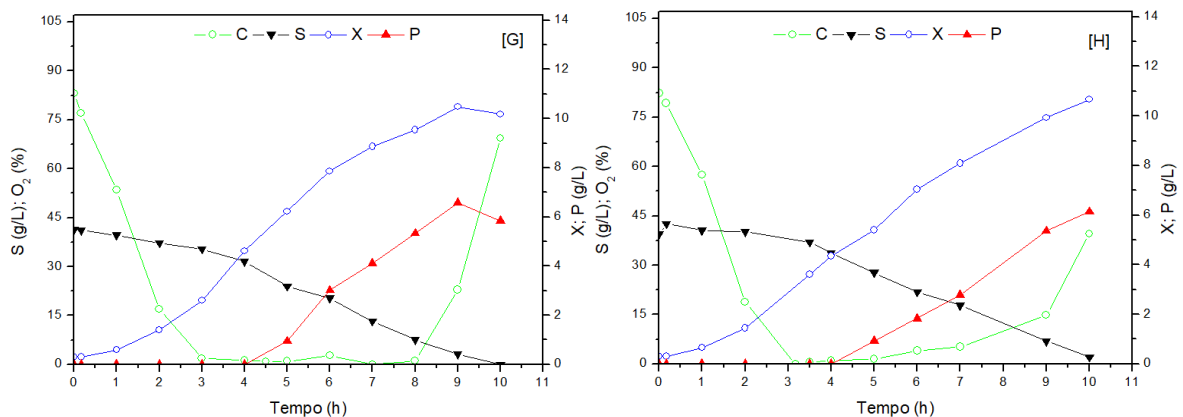


Figura 19. Perfil de crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos e concentração de oxigênio dissolvido nos cultivos com diferentes formulações de meio. $S_0 = 40$ g/L. [G] ensaio1, meio MD4; [H] ensaio 2, meio MD4.

Ao final da fermentação, a concentração de O₂ no meio aumentou tendo em vista as baixas concentrações residuais de substrato, uma vez que grande parte do glicerol disponível havia sido consumido e que as concentrações de produtos no meio não eram suficientes para causar inibição do processo. Além disso, o crescimento celular foi sustentado até o final da fermentação, indicando que não houve carência de nutrientes para a população microbiana (Figura 19).

Considerando os principais resultados alcançados com o uso do meio MD4 em cultivo de *E. aerogenes*, apresentados na Tabela 11, tanto parâmetros relacionados ao crescimento microbiano (X_f , $Y_{X/S}$ e p_{vx}), quanto parâmetros relacionados à formação de produtos (P_f , $Y_{P/S}$, ρ e p_{vp}) foram estatisticamente diferentes para os meios PC e MD4. A utilização do meio MD4 levou ao favorecimento da produção de biomassa e, conseqüentemente, a redução da quantidade de produtos formados. Entretanto, este resultado era esperado, uma vez que a concentração de glicerol subproduto de 40 g/L era baixa, sendo possivelmente inadequada para a avaliação da formação de produtos no comparativo entre os meios PC e MD4.

Tabela 11. Resultados gerais dos cultivos em biorreator de agitação mecânica com *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em meio PC e MD4 contendo glicerol subproduto (S_0 40 g/L). Ensaios M1 e M4.

Parâmetros	Meio PC	Meio MD4
t_f (h)	9	10
S_0 (g/L)	40,83 ± 0,23 ^a	40,33 ± 1,29 ^a
X_i (g/L)	0,27 ± 0,06 ^a	0,29 ± 0,01 ^a
X_f (g/L)	6,43 ± 0,09 ^b	10,42 ± 0,35 ^a
μ_{xm} (h ⁻¹)	0,703 ± 0,002 ^b	0,747 ± 0,019 ^a
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,151 ± 0,004 ^b	0,259 ± 0,027 ^a
p_{vx} (g/L.h)	0,715 ± 0,010 ^b	1,042 ± 0,035 ^a
P_f (g/L)	11,37 ± 0,12 ^a	5,99 ± 0,20 ^b
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,278 ± 0,005 ^a	0,153 ± 0,016 ^b
ρ (%)	56,96 ± 0,93 ^a	31,32 ± 3,27 ^b
p_{vp} (g/L.h)	1,263 ± 0,013 ^a	0,599 ± 0,020 ^b
S_f (g/L)	0 ± 0,00 ^a	1,05 ± 1,48 ^a

t_f – tempo final de processo; S_0 – concentração inicial de substrato; X_i – concentração celular inicial; X_f – concentração celular final; μ_{xm} – máxima velocidade específica de crescimento microbiano; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; p_{vx} – produtividade volumétrica em células; P_f – concentração final de produto (2,3-BDO e acetoina); $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produto; ρ – rendimento; p_{vp} – produtividade volumétrica em produto; S_f – concentração final de substrato. Letras diferentes entre as colunas, resultados estatisticamente diferentes com $p < 0,05$, para duas repetições.

A concentração celular final (X_f) foi cerca de 38% superior em meio MD4 ($10,42 \pm 0,35$ g/L) comparado ao meio PC ($6,43 \pm 0,09$ g/L), sugerindo que a composição do meio MD4, aliada as quantidades de íons Mg^{2+} , Fe^{2+} ou Fe^{3+} e Ca^{2+} naturalmente presentes no glicerol subproduto utilizado como substrato, podem ser suficientes para *E. aerogenes* nesta primeira etapa da fermentação. Além disso, como observado para a composição dos meios PR e MA, a presença de menores quantidades de sais em um meio de cultivo poderia indicar um aumento da atividade de água (A_a) e redução da pressão osmótica para a cultura, favorecendo o crescimento microbiano, no caso do meio MD4.

De modo geral, diversos autores avaliaram a influência da atividade de água (A_a) sobre o crescimento microbiano tendo como objetivo a preservação de alimentos, por exemplo. Contudo, nesta pesquisa, o parâmetro foi considerado visando-se estabelecer relações sobre as condições favoráveis ao crescimento microbiano de *E. aerogenes*.

Esener et al. (1981) avaliou a influência da A_a sobre a cinética de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em ensaios conduzidos em regime descontínuo. Os autores demonstraram que a máxima velocidade específica de crescimento microbiano é afetada por valores decrescentes de A_a (entre 0,996 e 0,970).

Desta forma, com o objetivo de investigar até que ponto diferenças na atividade de água (A_a) nos meios de cultivo utilizados poderiam efetivamente influenciar o crescimento microbiano nos cultivos de *E. aerogenes*, amostras iniciais dos meios PC, MA, PR e MD4, isentas de células, contendo 40 g/L de glicerol subproduto foram submetidas à análise deste parâmetro. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 12, os quais não apresentaram diferenças significativas a nível estatístico.

Tabela 12. Resultados obtidos para análise de atividade de água (A_a) realizada para os meios PC, MA, PR e MD4 (Ensaio M1 a M4).

PC	MA	PR	MD4
$0,972 \pm 0,001^a$	$0,965 \pm 0,006^a$	$0,973 \pm 0,011^a$	$0,969 \pm 0,001^a$

Letras diferentes entre as colunas representam resultados estatisticamente diferentes com $p < 0,05$.

Ainda, conforme supracitado, os processos fermentativos que envolvem microrganismos anaeróbios facultativos, exigem um adequado dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio devido a baixa solubilidade do O_2 no meio, sendo o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) um parâmetro importante na avaliação da eficiência atingida na transferência do oxigênio em biorreatores. Cabe ressaltar que a

dissolução de substâncias, solúveis ou não, no meio de cultivo, tais como: fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, aminoácidos, sais inorgânicos, dentre outros, assim como a presença de compostos que aumentam a viscosidade, reduzem ainda mais a concentração de oxigênio na saturação (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009; Girardi, 2014).

Na Tabela 13 são apresentados os valores obtidos para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La} inicial) dos cultivos conduzidos com os meios PC, MA, PR e MD4.

Tabela 13. Resultados obtidos para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio - K_{La} inicial dos meios PC, MA, PR e MD4 (frequência de agitadores, 650 rpm, fluxo específico de ar, 0,5 vvm, 37°C, pH 5,5, S_0 , 40 g/L). Ensaios M1 a M4.

PC	MA	PR	MD4
99,96 ± 1,84 ^b	89,13 ± 0,87 ^c	101,53 ± 0,46 ^b	104,59 ± 2,47 ^a

Letras diferentes entre as colunas representam resultados estatisticamente diferentes com $p < 0,05$.

A partir dos valores de K_{La} apresentados na Tabela 13, nota-se que a transferência de oxigênio foi dificultada com o uso do meio MA, o qual apresentou os menores valores de μ_{xm} . De fato, o extrato de levedura tem composição variada, podendo fornecer ao meio, além do nitrogênio, compostos de carbono e fatores de crescimento. Além disso, no preparo do meio de cultivo foi possível observar uma pequena quantidade de sólidos suspensos, os quais, podem ter refletido no valor encontrado para K_{La} inferior aos demais. Os dados apresentados reforçam a necessidade de uma adequada transferência de oxigênio para o meio, refletindo nos resultados globais e na produtividade dos processos fermentativos.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 10 e 11 e relacionando-os com os dados da Tabela 12 (A_a), pode-se sugerir que *E. aerogenes* apresentaria maior sensibilidade às concentrações específicas de determinados componentes do meio de cultivo, os quais poderiam ser considerados limitantes ou inibidores ao crescimento microbiano ou a formação de produtos. Porém, os resultados disponíveis até o momento, obtidos nestes ensaios, não seriam suficientes para determinar especificamente quais os componentes estão diretamente ligados a cada fase. Ressalta-se também que o principal objetivo destes ensaios foi, inicialmente, obter condições favoráveis ao crescimento microbiano e, posteriormente, a redução dos possíveis efeitos inibitórios na etapa de processo em regime descontínuo alimentado com a utilização de meios com diferentes composições. Deste modo, para a etapa de otimização do meio de cultivo, o meio MD4 foi selecionado, a fim de testá-lo com uma

concentração maior de substrato visando a avaliação dos parâmetros relacionados à formação de produtos.

Assim, a partir dos resultados atingidos com o uso do meio MD4 (Ensaio M4) e, tendo em vista a execução de planejamento experimental a fim de reduzir o número de variáveis a serem testadas na etapa de otimização do meio de cultivo, definiu-se o Ensaio M5. Na composição do meio neste ensaio foi considerada a retirada de KOH, sendo empregado, porém, com a função de controle de pH durante o cultivo (solução de KOH 7 mol/L) em substituição ao emprego de NaOH 7 mol/L. Os resultados gerais dos cultivos de *E. aerogenes* em meio M4 e M5 são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados gerais dos cultivos em biorreator de agitação mecânica com *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em meio MD4 com a utilização NaOH e KOH 7 mol/L para o controle de pH (S_0 40 g/L). Ensaios M4 e M5.

Parâmetros	Ensaio M4	Ensaio M5
t_f (h)	10	10
S_0 (g/L)	40,33 ± 1,29	40,2
X_i (g/L)	0,29 ± 0,01	0,29
X_f (g/L)	10,42 ± 0,35	10,51
μ_{xm} (h ⁻¹)	0,747 ± 0,019	0,689
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,259 ± 0,027	0,254
pv_x (g/L.h)	1,042 ± 0,035	1,051
P_f (g/L)	5,99 ± 0,205	5,49
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,153 ± 0,016	0,137
p (%)	31,32 ± 3,27	27,93
pv_p (g/L.h)	0,599 ± 0,020	0,549
S_f (g/L)	1,05 ± 1,48	0

t_f – tempo final de processo; S_0 – concentração inicial de substrato; X_i – concentração celular inicial; X_f – concentração celular final; μ_{xm} – máxima velocidade específica de crescimento microbiano; $Y_{x/s}$ – fator de conversão de substrato em células; pv_x – produtividade volumétrica em células; P_f – concentração final de produto; $Y_{p/s}$ – fator de conversão de substrato em produto; p – rendimento; pv_p – produtividade volumétrica em produto; S_f – concentração final de substrato.

Embora o Ensaio M5 não tenha sido conduzido em duplicata, os resultados apresentados na Tabela 14 indicam que a retirada de KOH do meio de cultivo e seu fornecimento através do controle de pH do meio não mostrou influencia negativa sobre o comportamento global do processo microbiano. Desta forma, na etapa de otimização este componente não foi variado, tendo em vista sua utilização no controle de pH do cultivo.

4.1.3 Otimização de meio de cultivo – Planejamento experimental *Box Behnken Design* – 3^k (BBD)

Com base nos resultados prévios, optou-se pela realização de uma etapa de planejamento experimental e otimização do meio simplificado para a produção de 2,3-BDO, tendo como objetivos, avaliar os efeitos das variações nas concentrações dos diferentes sais componentes do meio mineral, visando reduzir a possível inibição relacionada aos sais do meio de cultivo. Foi aplicado o método multivariado com um planejamento do tipo *Box-Behnken Design* – 3^k, com trinta experimentos, nos quais avaliou-se a influência das variáveis (NH₄)₂SO₄ (S2), (NH₄)₂HPO₄ (F8) e MgSO₄.7H₂O (S5), conforme a matriz de planejamento experimental mostrada no item 3.8.3. Os resultados gerais obtidos são apresentados na Tabela 15.

Conforme os resultados alcançados, nos experimentos 8 e 22, o pH inicial dos cultivos subiu até cerca de 7,8, entretanto, houve a adaptação da cultura após 12 horas de cultivo, obtendo-se concentrações celulares finais (X_f médio = 4,1 g/L) comparáveis aos demais cultivos. Contudo, o atraso inicial do processo pode ter ocasionado o consumo incompleto do substrato e formação de produtos em proporção inferior aos demais experimentos (P_f médio = 11,81 g/L).

Além da fonte de carbono, em geral, os microrganismos requerem quantidades variáveis de nitrogênio, enxofre e fósforo para a síntese de material celular, e a maior parte das enzimas que atuam na via glicolítica requer Mg²⁺ para sua atividade, assim como este componente também é requerido na via de produção de 2,3-BDO (Tortora et al., 2012; Nelson & Cox, 2014; Madigan et al., 2016).

O glicerol subproduto utilizado no estudo, apresenta um teor de cerca de 112,25; 0,868 e 2,946 mg/L de cálcio (Ca), ferro (Fe) e magnésio total (Mg), respectivamente, além de 66,41 ± 1,29 mg/L de nitrogênio amoniacal (NH₄⁺). A presença de íons sulfato (SO₄²⁻) e fosfato (PO₄³⁻) não foi identificada na caracterização prévia (Tabela 5 – item 3.3.2). Contudo, considerando a possível disponibilidade destes íons no glicerol subproduto, embora certamente em pequenas quantidades, nos experimentos realizados optou-se pela ausência do respectivo sal no nível baixo (-1) do planejamento. Dessa forma, nos experimentos conduzidos, tendo em vista a baixa disponibilidade de nitrogênio no glicerol subproduto e, possivelmente, devido a ausência de íons sulfato, não foi identificado crescimento microbiano nos experimentos 6 e 27 e, 2 e 16, respectivamente.

Tabela 15. Resultados gerais dos ensaios em agitador de bancada com *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em diferentes formulações a partir do meio MD4 com glicerol subproduto. S_0 80 g/L (planejamento experimental – Box Behnken Design) (48 h).

Exp.	S2	F8	S5	pH	X_f (g/L)	S_0 (g/L)	S_f (g/L)	P_f (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	P (g/L.h)
1	0 (7,2)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	7,94 – 5,12	5,73	80,050	4,414	23,348	0,075	0,309	4,075	0,486
3				7,92 – 5,02	5,16	79,997	8,958	20,940	0,073	0,295	4,058	0,436
2	-1 (0,0)	0 (6,0)	-1 (0,0)	6,45 – 5,82	0,35	83,265	81,070	0,000	0	0,000	0,000	0,000
16				6,78 – 6,06	0,33	84,193	80,800	0,000	0	0,000	0,000	0,000
4	+1 (14,4)	+1 (12,0)	0 (0,3)	6,20 – 5,22	8,8	79,401	9,965	19,46	0,127	0,280	2,211	0,405
17				6,02 – 4,97	10,31	78,092	4,911	22,426	0,141	0,306	2,175	0,467
5	0 (7,2)	+1 (12,0)	+1 (0,6)	6,11 – 4,76	6,68	80,871	4,045	26,165	0,087	0,340	3,917	0,545
15				5,85 – 4,87	7,15	79,450	3,623	25,120	0,094	0,331	3,513	0,523
6	-1 (0,0)	-1 (0,0)	0 (0,3)	7,84 – 7,48	0,04	80,522	80,720	0,000	0	0,000	0,000	0,000
27				7,91 – 7,56	0,14	80,051	84,330	0,000	0	0,000	0,000	0,000
7	0 (7,2)	0 (6,0)	0 (0,3)	6,43 – 5,29	7,69	82,455	3,580	22,203	0,097	0,269	2,887	0,462
11				6,47 – 5,40	8,31	79,364	0	22,004	0,105	0,290	2,649	0,458
12				7,02 – 4,90	5,61	79,282	2,077	25,868	0,073	0,335	4,611	0,539
20	0 (7,2)	0 (6,0)	0 (0,3)	7,10 – 5,01	5,66	81,999	2,659	24,400	0,071	0,308	4,311	0,508
25				6,21 – 4,87	5,16	78,279	0,904	24,023	0,067	0,310	4,656	0,500
28				6,22 – 5,12	4,07	79,664	0,624	24,763	0,051	0,313	6,084	0,516
8	+1 (14,4)	-1 (0,0)	0 (0,3)	7,83 – 5,34	4,18	83,228	43,709	11,303	0,106	0,286	2,704	0,235
22				7,89 – 5,27	4,00	83,769	41,130	12,323	0,094	0,289	3,081	0,257
9	0 (7,2)	-1 (0,0)	+1 (0,6)	7,85 – 5,20	4,36	78,587	0,682	25,849	0,056	0,332	5,929	0,539
10				7,90 – 5,20	3,92	81,183	0,998	25,909	0,049	0,323	6,609	0,540

Continua

...continuação.

Run	S2	F8	S5	pH	X _f (g/L)	S ₀ (g/L)	S _f (g/L)	P _f (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{P/X} (g/g)	P (g/L.h)
13	-1 (0,0)	0 (6,0)	+1 (0,6)	7,36 – 4,52	6,79	79,021	0	22,445	0,086	0,284	3,306	0,468
21				7,24 – 4,49	7,29	79,454	0	24,649	0,092	0,310	3,381	0,514
14	+1 (14,4)	0 (6,0)	-1 (0,0)	6,23 – 5,25	8,19	80,518	9,065	19,321	0,115	0,270	2,359	0,403
18				6,25 – 5,26	8,79	79,294	7,247	19,975	0,122	0,277	2,272	0,416
19	-1 (0,0)	+1 (12,0)	0 (0,3)	6,67 – 4,63	6,25	78,785	0	26,215	0,079	0,333	4,194	0,546
23				5,92 – 4,55	7,41	81,705	0,428	23,476	0,091	0,289	3,168	0,489
24	+1 (14,4)	0 (6,0)	+1 (0,6)	6,25 – 5,12	6,54	79,192	1,025	21,125	0,084	0,270	3,230	0,440
26				7,00 – 5,25	7,94	79,268	0	25,179	0,100	0,318	3,171	0,525
29	0 (7,2)	+1 (12,0)	-1 (0,0)	5,96 – 4,89	7,78	80,027	20,869	15,225	0,131	0,257	1,957	0,317
30				5,98 – 5,03	6,19	79,170	16,598	17,471	0,099	0,279	2,822	0,364

S2 – sulfato de amônio; F8 – fosfato de amônio dibásico; S5 – sulfato de magnésio heptahidratado; X_f – concentração celular final; S₀ – concentração inicial de substrato; S_f – concentração final de substrato; P_f – concentração final de produto (BDO + AC); Y_{X/S} – fator de conversão de substrato em células; Y_{P/S} – fator de conversão de substrato em produto; Y_{P/X} – produção específica em relação à biomassa; p – produtividade.

Considerando os resultados obtidos, a produção deste diol poderia ser realizada com o uso de um meio de cultivo formulado somente com glicerol subproduto, hidróxido de potássio (KOH) e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) (experimentos 1 e 3). Entretanto, resultados superiores em termos de 2,3-BDO e acetoína foram alcançados quando pelo menos dois dos três sais estudados na etapa de planejamento (S2, F8 e S5) estavam presentes no meio de cultivo. Além disso, nos experimentos 1 e 3, os quais continham apenas (NH₄)₂SO₄ entre os sais estudados, o consumo do substrato foi incompleto no período de 48 h.

Conforme os resultados apresentado na Tabela 15, quando utilizados somente (NH₄)₂SO₄ (S2) e MgSO₄.7H₂O (S5) - experimentos 9 e 10 - produção superior de 2,3-BDO e acetoína foi obtida, P_f médio = 25,88 g/L. O mesmo ocorreu nos experimentos 19 e 23, que continham apenas (NH₄)₂HPO₄ (F8) e MgSO₄.7H₂O (S5), com P_f médio = 24,84 g/L e nos experimentos 5 e 15, em que os três sais estudados estavam presentes, P_f médio = 25,64 g/L. Para todos os casos, a produção de 2,3-BDO e acetoína foi superior àquela obtida nos experimentos 1 e 3 (P_f médio = 22,14 g/L), que continham somente (NH₄)₂SO₄ (S2), entre os sais estudados no meio.

Na Figura 20, são apresentados os gráficos de contorno obtidos para P_f a partir dos fatores S2, F8 e S5. Na Figura 20A, observa-se que, para concentrações médias de sulfato de magnésio (S5), as concentrações de sulfato de amônio (S2) e de fosfato de amônio (F8), podem ser fixadas entre 8-10 e 12 g/L, respectivamente, para obtenção de concentrações de produto próximas ou superiores a 25 g/L.

Em comparação, na Figura 20B, observa-se que para valores médios de fosfato de amônio (F8) de 6 g/L, concentrações elevadas de sulfato de magnésio (S5) de 0,6 g/L são requeridas. Na Figura 20C, entretanto, em que as concentrações de sulfato de amônio (S2) são fixadas em 7,2 g/L, a superfície de contorno indica que concentrações elevadas de fosfato de amônio (F8) e sulfato de magnésio (S5) devem ser utilizadas. Assim, é possível observar que *E. aerogenes* possui uma capacidade de adaptação frente às diferentes condições impostas nos cultivos, necessitando de nutrientes essenciais, porém, adequando-se na presença de concentrações variáveis destes nutrientes.

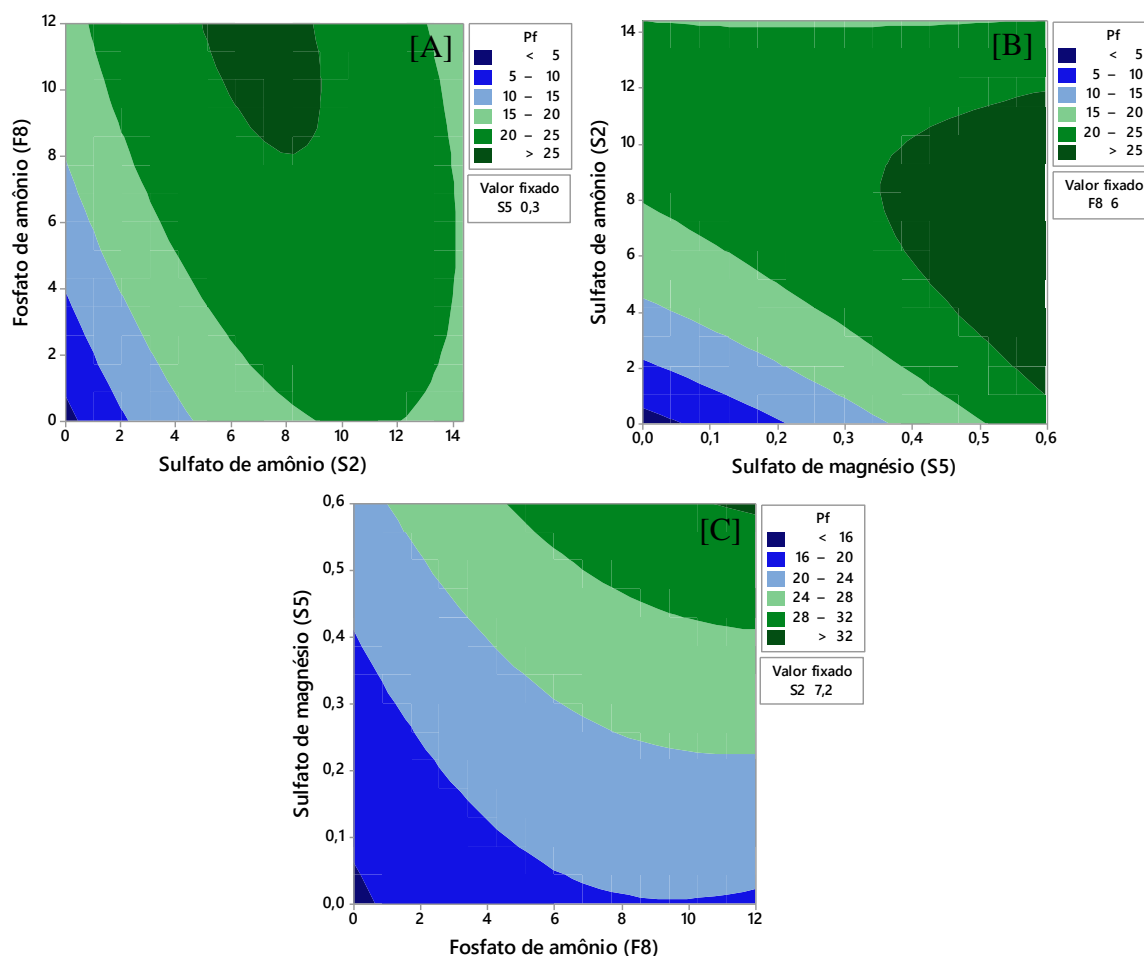


Figura 20. Gráficos de contorno obtidos para a variável P_f a partir dos fatores $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - S2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - S5 e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - F8.

Quanto a variação dos produtos formados em cada condição aplicada, os resultados são apresentados na Tabela 16. Observa-se que, independentemente da composição do meio, a produção de etanol foi em média 5,5 g/L e, não ultrapassando 8 g/L para experimentos com maior produção (experimentos 7 e 11). A maior concentração de *meso*-2,3-BDO (média = 18,63 g/L) foi atingida nos experimentos 5 e 15, os quais continham os três sais estudados (S2, F8 e S5). Para o isômero 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO, concentrações superiores foram alcançadas nos experimentos 9 e 10 (média = 8,10 g/L) e 13 e 21 (média = 7,60 g/L), que continham $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (S2) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (S5) e, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (F8) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (S5) no primeiro e segundo caso, respectivamente.

Tabela 16. Resultados gerais referentes aos diferentes produtos formados em ensaios de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em agitador de bancada a partir de glicerol subproduto e meio MD4 ($S_0 = 80$ g/L; planejamento experimental – *Box Behnken Design*; 48 h de cultivo).

Exp.	AC (g/L)	<i>meso</i> -2,3-BDO (g/L)	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -(+)-2,3-BDO(g/L)	ET (g/L)	2,3-BDO + AC (g/L)
1	2,193	14,834	6,321	5,473	23,348
3	1,763	14,652	4,525	7,735	20,940
2	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0
4	1,319	15,113	3,028	5,298	19,46
17	2,660	15,411	4,355	4,958	22,426
5	2,072	19,089	5,004	5,180	26,165
15	1,873	18,168	5,079	5,300	25,120
6	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0
7	2,982	14,083	5,138	7,112	22,203
11	5,101	10,816	6,087	7,958	22,004
12	8,916	9,474	7,478	4,820	25,868
20	8,081	8,861	7,458	5,697	24,400
25	5,340	13,151	5,532	5,262	24,023
28	3,946	14,695	6,122	6,633	24,763
8	2,518	7,5	1,285	0	11,303
22	2,639	8,222	1,462	0	12,323
9	5,179	12,481	8,189	6,629	25,849
10	5,804	12,099	8,006	4,773	25,909
13	7,577	7,462	7,406	5,611	22,445
21	10,964	5,887	7,798	3,719	24,649
14	1,900	14,066	3,355	5,409	19,321
18	1,725	14,870	3,380	5,547	19,975
19	10,362	7,603	8,250	4,985	26,215
23	5,389	11,808	6,279	5,171	23,476
24	3,097	13,348	4,680	4,773	21,125
26	6,946	11,367	6,866	5,876	25,179
29	2,175	10,85	2,200	3,115	15,225
30	2,133	12,491	2,847	3,458	17,471

AC – acetoina; ET – etanol.

De modo geral, os resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16 sugerem que a produção de 2,3-BDO por *E. aerogenes* a partir de glicerol subproduto pode ser influenciada

pela concentração dos íons nitrogênio (NH_4^+), sulfato (SO_4^{2-}), fosfato (PO_4^{3-}) e magnésio (Mg^{2+}). Ainda, foi identificado que, além da fonte de carbono utilizada, a composição do meio mineral também pode contribuir para as diferenças encontradas nas concentrações dos produtos formados.

Considerando os resultados destes experimentos e visando um processo em escala industrial, a produção de 2,3-BDO e acetoína por *E. aerogenes* poderia ser conduzida a partir de glicerol subproduto em meios simplificados, contendo apenas glicerol subproduto, hidróxido de potássio (KOH) e sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), o que representa um ganho econômico para a viabilização desta fermentação. No entanto, uma vez que a transferência do oxigênio é dificultada nestes ensaios em frascos sob agitação e que o controle do pH foi efetuado com adição de carbonato de cálcio (CaCO_3), estes parâmetros podem ter influenciado os resultados alcançados, sendo, talvez o mais importante, o controle do pH do meio, uma vez que tratando-se de diferentes sais solúveis, os mesmos podem encontrar-se em diferentes estados de dissociação, devido ao pH ao qual estão submetidos, influenciando a disponibilidade de seus íons e, conseqüentemente, os resultados finais dos ensaios.

Embora, admita-se que o pH pode ter sido um fator de grande relevância, realizou-se a análise de variância dos dados a fim de obter-se o modelo de superfície de resposta de 2ª ordem para as variáveis dependentes. Os dados indicam a presença de curvatura, uma vez que para as variáveis: produção específica em relação à biomassa ($Y_{P/X}$), fator de conversão de substrato em produtos ($Y_{P/S}$) e concentração final de produtos (P_f), o efeito do termo quadrático foi significativo, com $p = 0,002$, $0,002$ e $0,005$, respectivamente. Os resultados para R^2 ajustado mostram que 59,6; 77,8 e 64,1% da variabilidade de $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$ e P_f são explicadas pelas variáveis independentes do modelo (S2, F8, S5). As equações 12, 13 e 14, obtidas para $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$ e P_f , são mostradas a seguir, onde $X_1 = (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $X_2 = (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $X_3 = \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

$$Y_{P/X} = -1,113 + 0,830X_1 + 0,239X_2 + 6,50X_3 - 0,03607X_1^2 - 0,0038X_2^2 + 0,54X_3^2 - 0,02535X_1X_2 - 0,360X_1X_3 - 0,122X_2X_3 \quad (12)$$

$$Y_{P/S} = -0,0715 + 0,05316X_1 + 0,01620X_2 + 0,384X_3 - 0,001606X_1^2 + 0,000069X_2^2 + 0,023X_3^2 - 0,001768X_1X_2 - 0,03495X_1X_3 + 0,00583X_2X_3 \quad (13)$$

$$P_f = -4,64 + 3,851X_1 + 1,599X_2 + 26,1X_3 - 0,1485X_1^2 - 0,0494X_2^2 + 4,5X_3^2 - 0,0909X_1X_2 - 2,320X_1X_3 + 0,77X_2X_3 \quad (14)$$

Conforme mencionado anteriormente, os experimentos conduzidos em frascos agitados tem como característica o fato de alguns parâmetros de processo, os quais são considerados fixos, serem difíceis de controlar em função das limitações do sistema. Neste sentido, observou-se grande variabilidade para a mesma condição de ensaio considerada na repetição, refletindo nos cálculos dos parâmetros de avaliação. Essa variabilidade dos dados contribuiu para os desvios encontrados, podendo ter influência sobre o ajuste do modelo, resultando em equações com valores de R^2 baixos, as quais não são suficientes para descrever adequadamente a fermentação.

Considerando os aspectos expostos, optou-se pela manutenção dos três componentes estudados no meio de cultivo e os resultados da otimização visando maximizar as respostas a partir da aplicação da função desejabilidade, apontam para a utilização de um meio contendo (g/L): glicerol, 80; $(NH_4)_2SO_4$, 7,71; $(NH_4)_2HPO_4$, 3,15; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,6; KOH, 0,45.

Na Figura 21 é apresentado o gráfico de otimização obtido para as variáveis resposta avaliadas. Analisando a Figura 21 é possível observar que através da função desejabilidade visando maximizar múltiplas respostas, a combinação das desejabilidades (d_i) para as variáveis dependentes $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$ e P_f resulta em uma desejabilidade geral (D) de 0,9374, muito próxima de 1. Entretanto, é necessária a confirmação experimental dos resultados preditos para verificação da aplicabilidade do modelo proposto

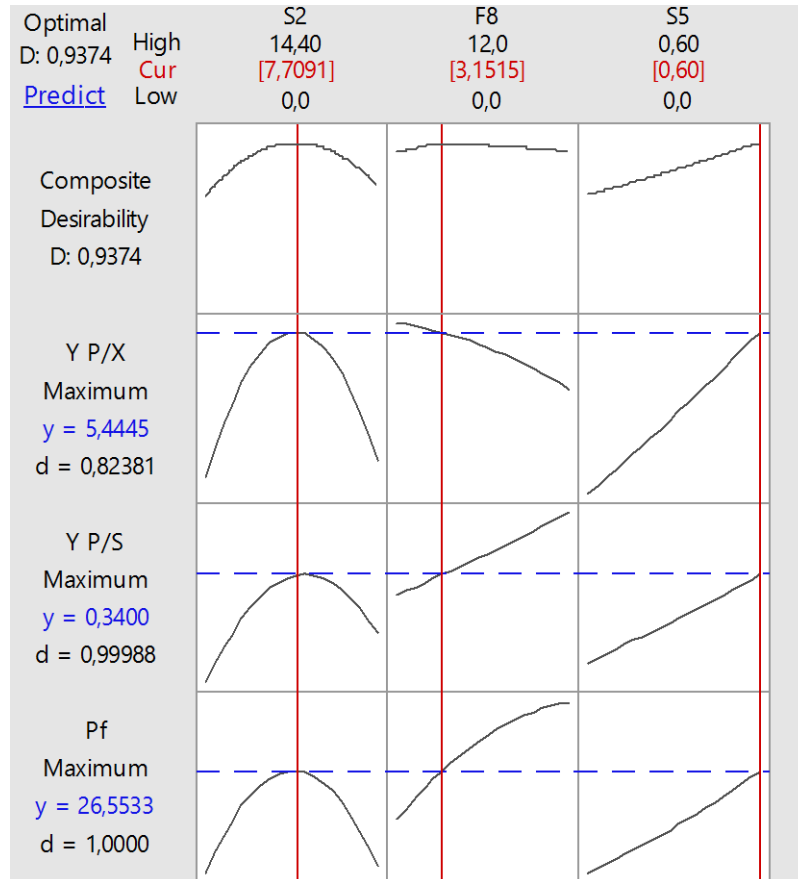


Figura 21. Resultados de otimização obtidos para a função desejabilidade através de ensaios executados por planejamento experimental *Box-Behnken Design* visando a maximização das variáveis $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$ e P_f a partir do meio MD4.

4.1.4 Cultivo de *Enterobacter aerogenes* em meio simplificado por otimização e meio controle

Os resultados alcançados em 4.1.3 permitiram constatar a possibilidade da utilização de meios minerais simplificados com o emprego de glicerol subproduto como substrato. No estudo de otimização (item 4.1.3) os ensaios foram conduzidos em frascos agitados em condições de cultivo que naturalmente apresentam limitações quanto ao controle dos parâmetros de processo. O conjunto destes fatores indica a necessidade de avaliar o processo em biorreator, que permite o emprego de condições controladas.

Neste contexto, foram realizados ensaios tendo como objetivo avaliar, de forma comparativa, o comportamento cinético de *E. aerogenes* em meio otimizado, denominado meio MD5, e em meio controle (meio PC). Os cultivos em regime descontínuo, foram conduzidos com valores fixos de frequência de agitadores (700 rpm) e de fluxo específico de

ar (0,50 vvm), S_0 de 80 g/L de glicerol subproduto, 4,0 L de meio, em condições de pH e temperatura controlados, em biorreator.

Na Figura 22 são mostrados os perfis cinéticos obtidos com relação às variações das concentrações de células (X), substrato (S), produtos (P) (2,3-BDO e acetoina) e oxigênio dissolvido (C), com meio otimizado (MD5) e meio controle (PC).

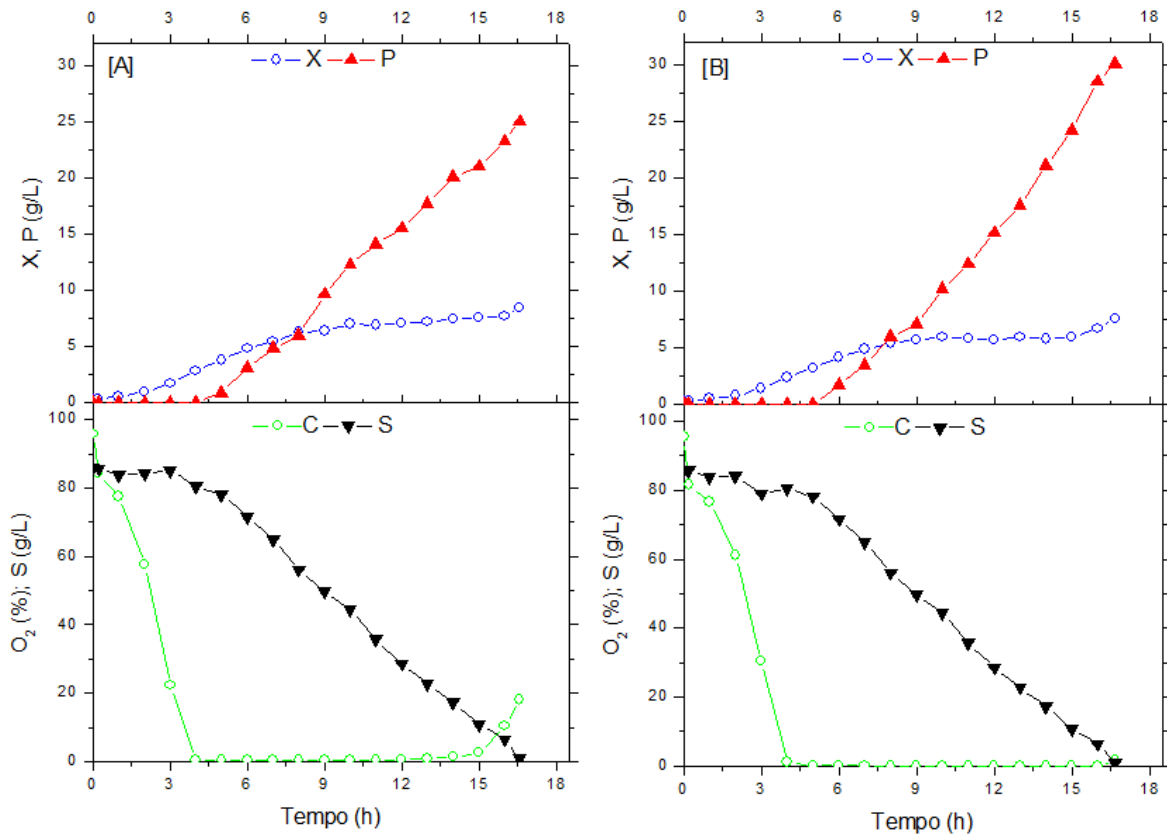


Figura 22. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol subproduto e produto final com o tempo em cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em [A] meio MD5 e [B] meio PC, a 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC); (○) Oxigênio dissolvido (C) e (▼) glicerol subproduto (S).

Em linhas gerais, na Figura 22 podem ser observados perfis de crescimento microbiano e de consumo de substrato semelhantes para ambos os cultivos. Quanto ao crescimento microbiano, a fase de adaptação da cultura foi de aproximadamente 2 h para a utilização de ambos os meios. Após este período inicial, a fase exponencial de crescimento foi observada até, aproximadamente, 5 h de fermentação para os meios MD5 e PC. O início da formação de produtos pode ser observado entre 5 e 6 h de cultivo, ainda durante a fase de crescimento microbiano e com concentrações nulas de oxigênio dissolvido no meio. Este

comportamento de consumo de oxigênio foi muito similar para ambas as condições avaliadas. Contudo, em 15 horas, é possível notar concentrações crescentes de O_2 no ensaio com o meio MD5 (Figura 22A), chegando a cerca de 20% da saturação ao final do processo. Até este período, o perfil de formação de produtos (2,3-BDO e acetoína), mostrado na Figura 23, foi semelhante. Após, é notado atraso na formação do diol e acetoína em meio MD5, indicando, possivelmente, que houve uma carência de nutrientes relacionados à via de formação de produtos. Entretanto, foi observado crescimento microbiano até o final da fermentação, sendo atingidos cerca de 8,48 g/L de células.

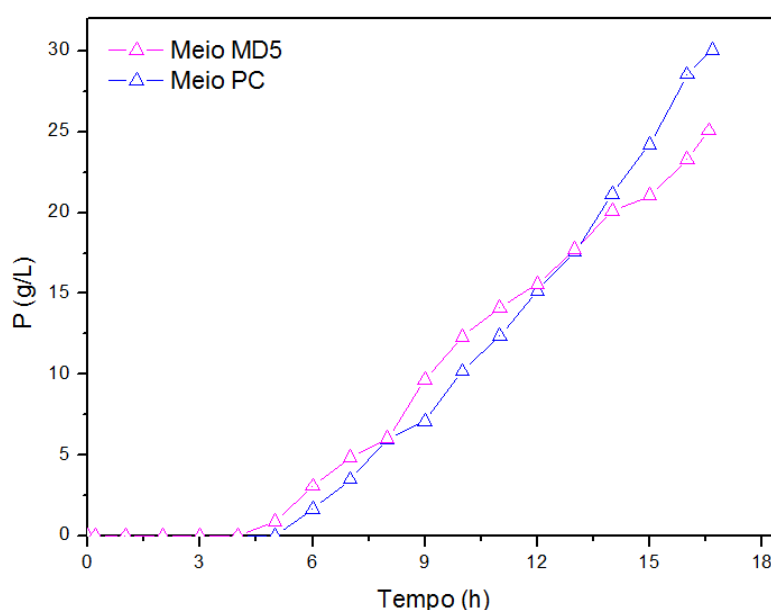


Figura 23. Variação das concentrações de produto final com o tempo em cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em meio MD5 e meio PC, a 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (Δ) produto final (2,3-BDO + AC) e (Δ) produto final (2,3-BDO + AC).

Considerando que os meios MD5 e PC continham cerca de 3,15 e 6,0 g/L de fosfato de amônio dibásico na composição, a concentração de íons fosfato foi monitorada ao longo do tempo, conforme é mostrado na Figura 24. A molécula de fosfato de amônio dibásico é representada por cerca de 72% de íons fosfato (PO_4^{3-}), os quais tratam-se de uma fonte de fósforo para os microrganismos. Assim, os dados apresentados na Figura 24 foram corrigidos considerando essa relação (72%), uma vez que as condições de análise empregadas não permitem a quantificação dos íons amônio.

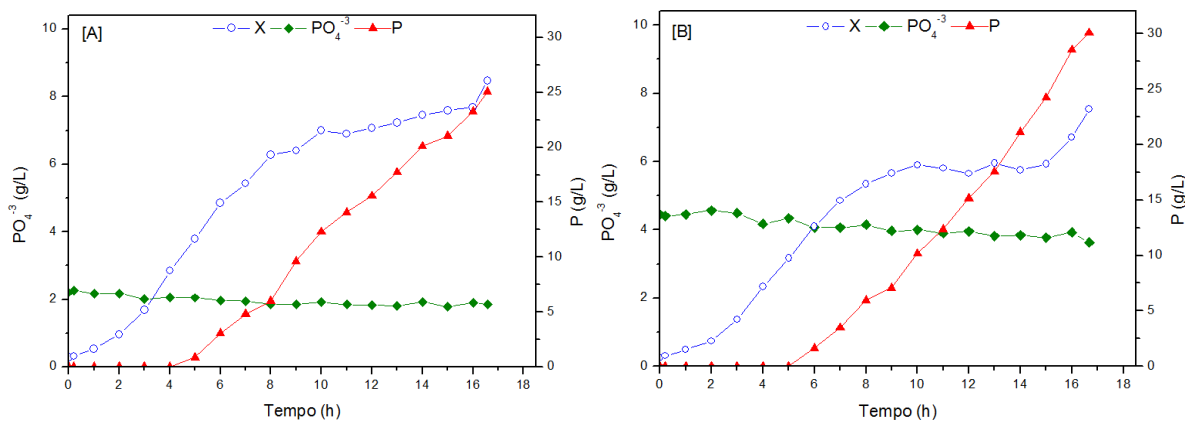


Figura 24. Variação das concentrações de biomassa celular, produto final e íons fosfato com o tempo em cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em [A] meio MD5 e [B] meio PC, a 700 rpm; 0,50 vvm; 37°C; pH 5,5; S_0 , 80 g/L. (○) biomassa (X); (▲) produto final (P) (2,3-BDO + AC) e PO_4^{-3} (◆).

O fósforo é um elemento utilizado pelos microrganismos para a síntese dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e dos fosfolipídeos das membranas celulares, sendo também utilizado na síntese de ATP, que é a molécula responsável pelo armazenamento e pela transferência de energia dentro da célula (Tortora et al., 2012). As reações de transferência de grupos fosforil são um tipo especialmente importante de transferência de grupos nas células, necessário para a ativação de moléculas para as reações que de outra forma seriam altamente desfavoráveis (Nelson & Cox, 2014).

Conforme discussão anterior, apontada no item 4.1.3, independentemente da concentração de fosfato de amônio empregada nos cultivos - 3,15 e 6,0 g/L, para os meios MD5 e PC -, *E. aerogenes* é capaz de adaptar-se às diferentes concentrações dos componentes do meio. Com a utilização do meio MD5, entre o início e final do cultivo, foram consumidos aproximadamente 0,6 g/L de íons fosfato. Em meio PC, o consumo para o mesmo período foi de aproximadamente 1 g/L. Os dados apresentados indicam que o conteúdo de fósforo fornecido ao microrganismo, através dos íons fosfato presentes no meio de cultivo, não foi limitante ao processo.

Na Tabela 17 são apresentados os principais resultados obtidos nos dois cultivos com relação ao crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos e a proporção de diferentes isômeros de BDO atingidos nos meios aplicados. Nota-se que a máxima velocidade específica de crescimento (μ_{xm}) foi semelhante para ambas as condições, de 0,585 e 0,539 h^{-1} . Os valores alcançados para $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ indicam a mudança do metabolismo respiratório para fermentativo com a utilização de 80 g/L de glicerol subproduto.

Tabela 17. Resultados gerais obtidos com *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em meio MD5 e PC contendo glicerol subproduto como substrato em regime descontínuo (frequência de agitadores, 700 rpm, fluxo específico de ar, 0,5 vvm, 37°C, pH 5,5, S₀, 80 g/L).

Parâmetros	Meio MD5	Meio PC
t _f (h)	17	17
S ₀ (g/L)	85,79	86,65
X _i (g/L)	0,28	0,26
X _f (g/L)	8,48	7,54
μ _{xm} (h ⁻¹)	0,585	0,539
Y _{X/S} (g/g)	0,095	0,084
p _{vx} (g/L/h)	0,492	0,439
Acetoína (g/L)	3,65	3,68
meso-2,3-BDO (g/L)	12,43	16,88
2S,3S-(+)-2,3-BDO (g/L)	8,99	9,52
P _f (g/L)	25,07	30,08
Etanol (g/L)	0,00	3,94
Y _{P/S} (g/g)	0,292	0,347
Y _{P/X} (g/g)	2,956	3,989
ρ (%)	59,7	70,9
p _{vp} (g/L/h)	1,504	1,814
S _f (g/L)	0	0

t_f – tempo final de processo; S₀ – concentração inicial de substrato; X_i – concentração celular inicial; X_f – concentração celular final; μ_{xm} – máxima velocidade específica de crescimento microbiano; Y_{X/S} – fator de conversão de substrato em células; p_{vx} – produtividade volumétrica em células; P_f – concentração final de produto (2,3-BDO e acetoína); Y_{P/S} – fator de conversão de substrato em produto (2,3-BDO e acetoína); ρ – rendimento; p_{vp} – produtividade volumétrica em produto; S_f – concentração final de substrato.

Quanto aos parâmetros de formação de produtos, rendimento (ρ), produtividade (p_{vp}) e concentração final de produtos (P_f) (2,3-BDO e acetoína) inferiores foram obtidos com a utilização do meio simplificado (MD5).

Considerando a adaptação da cultura às condições de disponibilidade e concentração dos sais impostas nos cultivos, estes resultados também indicam que a composição do meio pode ter influência na formação e nos tipos de metabólitos microbianos produzidos. Observa-se que no cultivo conduzido com o meio MD5, houve produção inferior do isômero meso-2,3-BDO e não foi detectada a formação de etanol, quando comparado com o meio PC (Tabela 17). A deficiência de Zn²⁺ diminui a atividade da álcool-desidrogenase (Nelson & Cox, 2014), sendo um motivo que influenciaria a produção de etanol com o uso do meio

MD5. Entretanto, seria necessário avaliar outras condições de processo, uma vez que nos ensaios apresentados no item 4.1.3, com o emprego de meios de composição semelhante ao MD5, a produção de etanol foi identificada. Apesar da composição do meio simplificado ter influenciado a formação de produtos, o crescimento microbiano e o consumo de substrato não foram afetados.

É importante ressaltar que os resultados alcançados com o meio MD5, conduzido em biorreator, foram muito próximos aos resultados preditos através da otimização, uma vez que foram atingidos valores de 0,292 g/g e 25,07 g/L para $Y_{P/S}$ e P_f , respectivamente, sendo os valores preditos de 0,340 g/g e 26,55 g/L. Contudo, o valor obtido para $Y_{P/X}$ (2,96 g/g), foi notavelmente inferior ao valor predito (5,44 g/g), devido ao fato de que em biorreator a transferência de oxigênio é facilitada através da agitação e aeração, favorecendo a obtenção de biomassa, enquanto em frascos agitados, a transferência do O_2 é proporcionada pelo movimento recíproco do sistema, sendo limitada.

A partir dos dados obtidos nestes ensaios, além da observação de adaptação da cultura - corroborando com os resultados obtidos em frascos agitados (item 4.1.3) - pode-se também sugerir que a formação de produtos em maior proporção estaria ligada a outros íons, como Ca^{2+} e Fe^{2+} ou Fe^{3+} , naturalmente presentes no glicerol subproduto, porém em pequenas concentrações, ou, ainda, em função de Zn^{2+} , Mn^{2+} , fornecidos no meio PC. Neste sentido, embora os resultados obtidos até o momento não permitam afirmar quais entre os íons citados estariam vinculados à maior produção de 2,3-BDO em meio PC, abre-se a possibilidade de utilização de meios simplificados na primeira etapa da fermentação para a produção de 2,3-BDO. Estudos adicionais são necessários para a determinação de quais nutrientes seriam necessários na segunda etapa de cultivo, sobre o devido fornecimento no meio ou de forma parcelada, em cultivos em regime descontínuo alimentado, para evitar o acúmulo de componentes não metabolizados, que poderiam afetar negativamente a fermentação.

4.2 Validação de metodologias

As metodologias analíticas adaptadas ou desenvolvidas foram validadas com o objetivo de garantir a confiabilidade dos resultados dos ensaios fermentativos. Nos itens a seguir são descritos os resultados alcançados.

4.2.1 Validação de metodologia cromatográfica para determinação de glicerol, acetoína, *meso*-2,3-butanodiol, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-butanodiol e etanol em amostras de fermentação

No presente estudo foi validado um método cromatográfico para quantificação de glicerol, acetoína, *meso*-2,3-BDO, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO e etanol por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE). Cabe ressaltar que a validação da metodologia nas condições descritas neste trabalho não é relatada na literatura correlata.

Na metodologia descrita por Girardi (2014) e Romio (2014) - utilizada como base neste estudo -, não é alcançada a separação total dos picos quando em solução, sendo que os autores optaram por realizar a quantificação de acetoína e 2,3-BDO em conjunto. Entretanto, quando a separação total de dois ou mais picos não pode ser alcançada, a resposta de cada um pode ser representada como a altura de cada pico segundo a Farmacopéia Européia (European Pharmacopeia, 2017).

A literatura traz diversos exemplos de metodologias cromatográficas baseadas na quantificação dos compostos pela altura do pico (Catignani & Bieri, 1983; Lou et. al, 2017; Plescakova et. al, 2017). Plescakova e colaboradores (2017) desenvolveram um método para quantificação simultânea de ácido úrico, xantina e hipoxantina em plasma e soro humano por CLAE. O processamento dos dados e a validação do método foram feitos utilizando-se a altura dos picos cromatográficos para xantina e hipoxantina e a área dos picos para ácido úrico. Da mesma forma, Lou e colaboradores (2017) desenvolveram um método para quantificação de traços de fluoreto (F⁻) em amostras de soro e urina por cromatografia de íons, em que, obtiveram desvios padrão relativos para área e altura dos picos inferiores a 5,15%. Catignani & Bieri (1983) relataram um método para a determinação de α -tocoferol (vitamina E) e retinol (vitamina A) em amostras de soro e plasma por CLAE, no qual, ambos os compostos, foram quantificados através da altura dos picos cromatográficos, com boa precisão e exatidão, obtendo-se resultados comparáveis aos métodos convencionais para essas vitaminas.

O tempo de retenção dos picos cromatográficos foi confirmado pela injeção de cada padrão separadamente. Optou-se pela quantificação dos metabólitos acetoína, *meso* e 2*R*,3*R*-($-$)- ou 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO, separadamente, usando a altura do pico detectado por IR. Os demais compostos, glicerol e etanol, também foram quantificados pela altura dos picos fazendo uso do mesmo critério. Na Figura 25, são apresentados os perfis de separação cromatográfica para as substâncias estudadas.

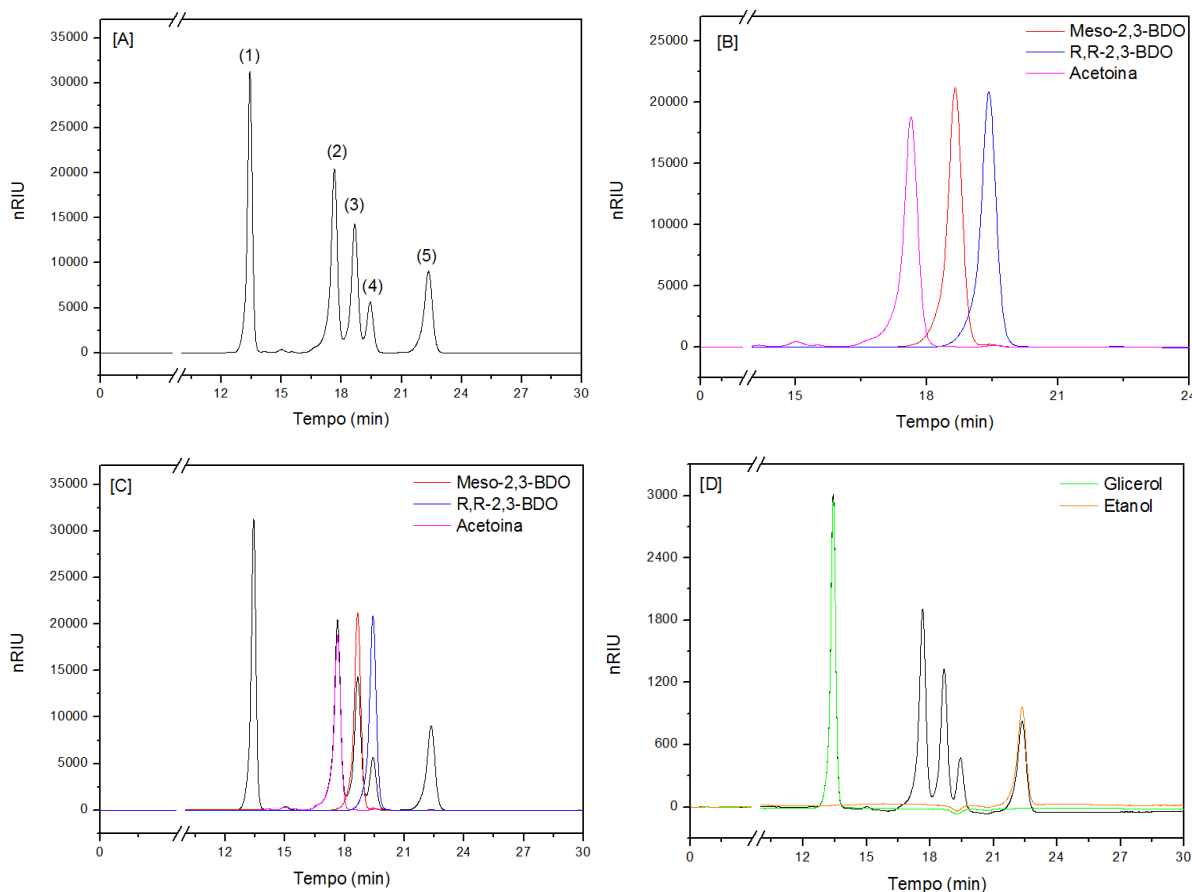


Figura 25. Perfil de separação cromatográfica (CLAE) de amostras de glicerol (1), acetoína (2), *meso*-2,3-BDO (3), *R,R*-2,3-BDO (4) e etanol (5). Mistura das substâncias de referência [A], padrões puros: acetoína, *meso*-2,3-BDO e *R,R*-2,3-BDO [B], mistura das substâncias de referência (10 g/L) e padrões sobrepostos [C] e, mistura das substâncias de referência (1 g/L) e padrões de glicerol e etanol sobrepostos [D].

O padrão (Figura 25A) foi preparado utilizando uma solução contendo a mistura de glicerol, acetoína, 2,3-butanodiol e etanol na concentração de 10g/L de cada.

Anteriormente à etapa de validação da metodologia, realizou-se a determinação das parcelas correspondentes aos isômeros *meso*, *2S,3S*-(+)- ou *2S,3S*-(+)- no padrão 2,3-BDO empregado na mistura das substâncias de referência utilizada nos testes. Para tanto, foram injetados os padrões puros disponíveis, *meso* e *2R,3R*-($-$)-2,3-BDO, em concentrações de 1 a 8 g/L e construídas as curvas de calibração (Figura 26). Após, o padrão 2,3-BDO foi analisado nas condições cromatográficas definidas, em concentrações de 1 a 10 g/L e a quantificação das parcelas de *meso* e *2R,3R*-($-$)- ou *2S,3S*-(+)-, foi feita através das curvas obtidas para as substâncias puras.

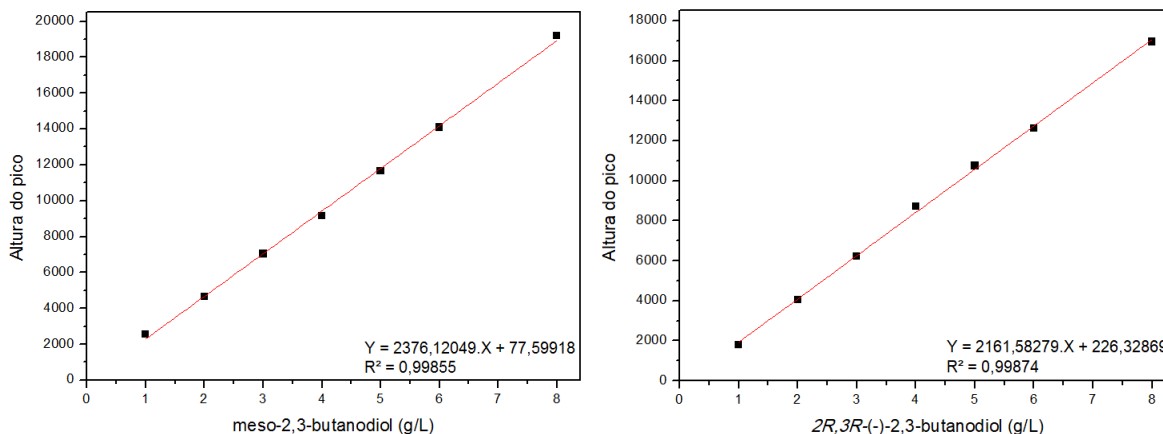


Figura 26. Curvas de calibração obtidas a partir da análise de soluções padrão de *meso*-2,3-butanodiol e 2*R*,3*R*-(-)-2,3-butanodiol entre 1 e 8 g/L.

Como resultado da determinação dos diferentes isômeros, inferiu-se que a mistura de 2,3-BDO, utilizada como padrão, apresenta cerca de 67 e $33 \pm 2,15\%$ de *meso* e 2*R*,3*R*-(-)- ou 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO, respectivamente. Estes resultados foram utilizados para a validação e quantificação das diferentes parcelas dos isômeros nas amostras.

Jurchescu et al. (2013) destaca que a coluna Aminex HPX-87H permite uma boa diferenciação de *meso*-2,3-BDO dos demais estereoisômeros 2*R*,3*R*-(-)- e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO, no entanto, não é possível distinguir a produção de 2*R*,3*R*-(-)- ou 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO por este método. Uma vez que as linhagens do gênero *Klebsiella* e *Enterobacter* produzem uma mistura dos isômeros *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO (Zeng & Sabra, 2011; Ji et al., 2011; Jurchescu et al., 2013), pode-se sugerir que o segundo pico identificado para BDO corresponde ao isômero 2*S*,3*S*-(+)- nas amostras de cultivo. Neste contexto, na discussão dos resultados da validação, o segundo pico observado é referido apenas como o isômero 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO.

A linearidade do método foi determinada pela análise de três curvas de calibração construídas para uma mistura das substâncias de referência em concentrações de 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10 g/L, realizadas em três dias distintos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 18. As curvas de calibração obtidas foram lineares na faixa de concentração entre 0,5 e 10 g/L, com coeficientes de regressão (R^2) superiores a 0,9998.

Tabela 18. Parâmetros de linearidade para as substâncias de referência - glicerol, acetoína, *meso*-2,3-butanodiol, 2*S*,3*S*-(+)-2,3-butanodiol e etanol - analisadas por cromatografia em fase líquida.

Amostra	R ²	a	b	DPR (%)
Glicerol	0,9998	-24,78	3132,53	0,02
Acetoína	0,9999	-133,92	2057,24	0,08
<i>meso</i> -2,3-BDO	0,9999	-70,59	2151,48	0,07
2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -(+)-2,3-BDO	0,9998	-57,35	1740,10	0,17
Etanol	0,9999	-53,57	913,01	0,07

R² – coeficiente de regressão linear; a – intersecção; b – inclinação; DPR – desvio padrão relativo da inclinação da reta em três dias consecutivos.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados de acordo com a RDC nº 166 (Brasil, 2017) são apresentados na Tabela 19. A faixa de concentração utilizada para calcular os limites de detecção e quantificação foi de 0,5 a 10 g/L, sendo que o limite de detecção calculado para todas as substâncias foi inferior à faixa de concentração estudada. Desta forma, concentrações a partir de 0,5 g/L podem ser quantificadas com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Estes resultados também indicam a alta sensibilidade do método proposto.

Tabela 19. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados para as substâncias de referência.

Amostra	LD (g/L)	LQ (g/L)
Glicerol	0,004	0,013
Acetoína	0,019	0,062
<i>meso</i> -2,3-BDO	0,011	0,035
2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -(+)-2,3-BDO	0,015	0,051
Etanol	0,016	0,054

A precisão de um método analítico pode ser avaliada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (Brasil, 2017). Os resultados para os parâmetros repetibilidade (intra-corrída) e precisão intermediária (inter-corrída) do método são apresentados nas Tabelas 20 e 21.

Os resultados para repetibilidade (Tabela 20) foram obtidos a partir de nove determinações, na concentração de 5 g/L das substâncias de referência, analisadas em um mesmo dia. Importante lembrar que para butanodiol, a mistura de 5 g/L apresenta cerca de

67 e 33% dos isômeros *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO, sendo representada por 3,35 e 1,65 g/L, respectivamente. Para a precisão intermediária (Tabela 21), os desvios foram calculados a partir de concentrações de 2, 5 e 8 g/L, avaliadas em três dias consecutivos. Da mesma forma, foram consideradas as proporções dos isômeros de BDO nas diferentes concentrações.

Tabela 20. Resultados para repetibilidade do método cromatográfico para quantificação de glicerol, acetoína, 2,3-butanodiol e etanol, determinadas no mesmo dia.

Amostra	C (g/L)	DP	DPR (%)
Glicerol	5,025	0,002	0,032
Acetoína	5,035	0,002	0,041
<i>meso</i> -2,3-BDO	3,381	0,001	0,025
2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -(+)-2,3-BDO	1,664	0,001	0,078
Etanol	5,047	0,004	0,089

C- média de 3 determinações; DP – desvio padrão da média; DPR – desvio padrão relativo (repetibilidade). Critério aceitável, $DPR \leq 5\%$.

Tabela 21. Resultados para precisão intermediária do método cromatográfico para quantificação de glicerol, acetoína, 2,3-butanodiol e etanol, em três dias consecutivos.

Amostra	DPR (%)		
	2 g/L	5 g/L	8 g/L
Glicerol	0,016	0,011	0,060
Acetoína	0,936	0,010	0,040
<i>meso</i> -2,3-BDO	1,879	0,062	0,083
2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -(+)-2,3-BDO	3,826	0,072	0,087
Etanol	0,616	0,166	0,219

DPR – desvio padrão relativo (precisão intermediária). Critério aceitável, $DPR \leq 5\%$.

Os resultados obtidos para repetibilidade (Tabela 20) oscilaram entre 0,025 e 0,089% e dentro dos padrões estabelecidos ($DPR \leq 5\%$). Da mesma forma, para precisão intermediária (Tabela 21), independentemente da concentração analisada, o desvio padrão relativo (DPR) foi inferior a 5% para todos os compostos avaliados, demonstrando que a precisão do método é adequada.

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, podendo ser verificada a partir de nove determinações, em concentrações baixa, média e alta, com três réplicas, das substâncias de referência (Brasil, 2017). Na Tabela 22 são apresentados os resultados alcançados para os

testes de exatidão do método, com concentrações teóricas das substâncias de referência de 2, 5 e 8 g/L, considerando-se as proporções dos isômeros de BDO. Como pode ser observado, a exatidão atingida para a mistura das substâncias de referência, glicerol, acetoína, butanodiol e etanol oscilou entre 97,93 e 100,93%. Apesar de não haver separação total dos picos correspondentes a acetoína, *meso* e 2*S*,3*S*-(+)-2,3-BDO, foi possível quantificar estes compostos com exatidão aceitável por meio da altura de seus respectivos picos cromatográficos.

Tabela 22. Resultados para os testes de exatidão do método analítico por cromatografia líquida, relativo às análises de glicerol, acetoína, 2,3-butanodiol e etanol.

Amostra	Concentração teórica (g/L)	Concentração média experimental (g/L)	Exatidão (%)
Glicerol	2	1,947	97,36
	5	5,026	100,53
	8	7,998	99,98
Acetoína	2	1,972	98,59
	5	5,033	100,67
	8	7,994	99,92
<i>meso</i> -2,3-BDO	1,34	1,322	98,66
	3,35	3,381	100,93
	5,36	5,353	99,88
2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -(+)-2,3-BDO	0,66	0,649	98,33
	1,65	1,663	100,81
	2,64	2,637	99,88
Etanol	2	1,959	97,93
	5	5,038	100,77
	8	7,988	99,85

Posteriormente, avaliou-se a recuperação das substâncias de referência quando são adicionadas à matriz (amostra de fermentação) concentrações conhecidas de cada um dos compostos estudados. A amostra de cultivo foi previamente diluída três vezes e analisada por CLAE, a fim de determinar as concentrações de cada um dos compostos na matriz. Após, foram adicionados à amostra, concentrações de 2, 5 e 8 g/L das substâncias de referência, especialmente preparadas para tal. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 23 a 25.

Tabela 23. Resultados prévios obtidos para amostra de fermentação (matriz) em análise por cromatografia em fase líquida.

Composto	Glicerol	Acetoína	<i>meso</i> -2,3-BDO	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -(+)-2,3-BDO	Etanol
Concentração média (g/L)	5,727 ± 0,001	0,511 ± 0,001	4,780 ± 0,003	1,384 ± 0,001	1,291 ± 0,003

Tabela 24. Resultados prévios obtidos para os padrões das substâncias de referência adicionados à matriz, em análise por cromatografia em fase líquida.

Amostra/Padrão		Concentração teórica (g/L)	Concentração média experimental (g/L)	Exatidão (%)
Glicerol	Padrão 2	2	1,986	99,32
	Padrão 5	5	5,018	100,37
	Padrão 8	8	7,978	99,37
Acetoína	Padrão 2	2	2,016	100,78
	Padrão 5	5	5,026	100,53
	Padrão 8	8	7,954	99,42
<i>meso</i> -2,3-BDO	Padrão 2	1,34	1,347	100,49
	Padrão 5	3,35	3,374	100,72
	Padrão 8	5,36	5,339	99,61
2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -(+)-2,3-BDO	Padrão 2	0,66	0,661	100,11
	Padrão 5	1,65	1,658	100,52
	Padrão 8	2,64	2,626	99,48
Etanol	Padrão 2	2	2,009	100,47
	Padrão 5	5	5,022	100,45
	Padrão 8	8	7,938	99,22

Tabela 25. Exatidão do método correspondente à análise cromatográfica de uma amostra de fermentação contendo metabólitos, adicionada com diferentes concentrações das substâncias de referência (glicerol, acetoína, butanodiol e etanol).

Amostra	CT (g/L)	C (g/L)	DPR (%)	Recuperação (%)
Glicerol	7,714	7,625	0,051	98,85
	10,745	10,741	0,089	99,96
	13,705	13,672	0,054	99,76
Acetoína	2,526	2,494	0,060	98,73
	5,538	5,514	0,093	99,57
	8,465	8,386	0,033	99,07

Continua

...continuação

Amostra	CT (g/L)	C (g/L)	DPR (%)	Recuperação (%)
<i>meso</i> -2,3-BDO	6,123	6,037	0,039	98,61
	8,154	8,123	0,067	99,62
	10,119	10,087	0,005	99,68
2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> (+)-2,3-BDO	2,045	2,005	0,057	98,07
	3,043	3,018	0,101	99,17
	4,011	3,974	0,044	99,08
Etanol	3,301	3,247	0,078	98,37
	6,313	6,280	0,020	99,48
	9,229	9,164	0,028	99,30

CT – concentração teórica; C- média experimental; DPR – desvio padrão relativo.

Com relação aos resultados, como observado na Tabela 24, após a adição dos padrões à matriz, valores médios de recuperação de 99% foram obtidos para todas as substâncias estudadas.

Pode-se concluir que o método analítico adaptado e validado utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a quantificação de glicerol, acetoína, *meso*-2,3-BDO, 2*S*,3*S*(+)-2,3-BDO e etanol. O conjunto de características do método, como especificidade, linearidade, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão o tornam adequado para a quantificação dos compostos e para o monitoramento do processo de produção de 2,3-BDO.

4.2.2 Validação de metodologia espectrofotométrica para determinação de glicerol em amostras de fermentação

O método original desenvolvido por Sanchez (1998) foi adaptado para a quantificação de glicerol em amostras de fermentação. As adaptações realizadas, bem como as especificações da metodologia original desenvolvida por Sanchez (1998) são apresentadas nas Tabelas 26 e 27, em complementação à Tabela 7 (item 3.5.4). Outros autores foram considerados com relação às adaptações, principalmente, com relação aos parâmetros pH, tempo e temperatura adequada das reações (Bradford et al., 1942; Lambert & Neish, 1950; Nash, 1953; Sanchez, 1998; Bondioli & Bella, 2005; Carra, 2012; Bompelly & Skaf, 2014).

Tabela 26. Parâmetros da metodologia descrita por Sanchez (1998) e adaptações realizadas.

Método	Linearidade	Comprimento(λ)	Reagentes
Sanchez	5 – 150 nmol	412 nm	Reagente 1 – Tampão Formato 0,5 mol/L, pH 3,0 Reagente 2 – Periodato de sódio 5 mmol/L Reagente 3 – Acetilacetona 0,1 mol/L Acetato de amônio 2 mol/L Tiosulfato de sódio 0,02 mol/L
Adaptado 1	100 – 800 mg/L	450 nm	Reagente 1 – Tampão Formato 0,5 mol/L, pH 3,0 Periodato de sódio 3,5 mmol/L Reagente 2 – Acetilacetona 0,1 mol/L Acetato de amônio 2 mol/L Tiosulfato de sódio 0,02 mol/L
Adaptado 2	100 – 800 mg/L	450 nm	Reagente 1 – Tampão Formato 0,5 mol/L, pH 5,5 Reagente 2 – Periodato de sódio 3,5 mmol/L Reagente 3 – Acetilacetona 0,1 mol/L Acetato de amônio 2 mol/L Tiosulfato de sódio 0,02 mol/L
Adaptado 3	100 – 800 mg/L	450 nm	Reagente 1 – Tampão Formato 0,5 mol/L, pH 5,5 Periodato de sódio 3,5 mmol/L Reagente 2 – Acetilacetona 0,1 mol/L Acetato de amônio 2 mol/L Tiosulfato de sódio 0,02 mol/L

Tabela 27. Tempos e volume de reação da metodologia descrita por Sanchez (1998) e adaptações realizadas.

Método	Reação	Volume	Tempo	Temperatura
Sanchez (1998)	Reação 1	0,1 mL amostra diluída + 0,5 mL - Reagente 1	Imediato	ambiente
		+ 0,3 mL - Reagente 2	15 segundos (sob agitação)	ambiente
	Reação 2	+ 0,3 mL - Reagente 3	2 minutos (água fervente)	100 °C
O volume final das reações é de 1,2 mL, os quais são resfriados em água corrente após o término da reação 2 e lidos à 412 nm.				
Método	Reação	Volume	Tempo	Temperatura
Adaptado 1	Reação 1	0,1 mL amostra diluída + 1,5 mL - Reagente 1	60 segundos	ambiente
	Reação 2	+ 0,75 mL - Reagente 2	2 minutos (água fervente)	100 °C

Continua

...continuação.

Adaptado 2	Reação 1	0,1 mL amostra diluída + 0,5 mL - Reagente 1	Imediato	ambiente
		+ 1,0 mL - Reagente 2	60 segundos	ambiente
	Reação 2	+ 0,75 mL - Reagente 3	2 minutos (água fervente)	100 °C
Adaptado 3	Reação 1	0,1 mL amostra diluída + 1,5 mL - Reagente 1	60 segundos	ambiente
		Reação 2	+ 0,75 mL - Reagente 2	2 minutos (água fervente)
	O volume final das reações na adaptação 1, 2 e 3 é de 2,35 mL, os quais são resfriados em banho de gelo após o término da reação 2. Após o resfriamento, são adicionados 2,5 mL de água destilada e a leitura imediata é feita a 450 nm.			

A metodologia original consiste na oxidação de alditóis com periodato de sódio (reação de Malaprade) em condições ácidas, seguida da reação do formaldeído resultante com acetilacetona em meio contendo amônia (reação de Hantzsch), uma vez que a reação de Hantzsch requer um aldeído e uma amina, para produzir um composto heterocíclico colorido, 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL) (Belman, 1963; Sanchez, 1998).

Em uma busca pela literatura especializada, encontrou-se que o periodato (de sódio ou potássio) é um agente oxidante seletivo que cliva estequiometricamente compostos orgânicos contendo grupos vicinais hidroxila, grupos carbonila ou um grupo amino (Malaprade, 1934 apud Bradford et al., 1942; Stewart, 1964 apud Speckman & Collins, 1982). Na oxidação do glicerol com periodato, a cadeia de carbonos é então quebrada, sendo que os dois carbonos da extremidade produzem formaldeído e o carbono central produz ácido fórmico (Bradford et al., 1942).

Considerando os possíveis interferentes da metodologia proposta, o álcool 2,3-BDO é um diol vicinal, no qual seus dois grupos hidroxila estão ligados a átomos adjacentes. Neste caso, segundo Speckman & Collins (1982), 2,3-BDO pode sofrer clivagem a acetaldeído pela ação do ácido periódico. Entretanto, de acordo com Nash (1953), o acetaldeído formado produz diacetil-hidrocolidina (diacetylhydrocollidine), o qual apresenta um pico de absorção a 338 nm, de intensidade similar ao DDL que tem absorção máxima em 412 nm, desta forma, não interferindo na metodologia, desde que não estejam presentes grandes quantidades de acetaldeído nas reações.

Quanto aos resultados obtidos com as diferentes adaptações propostas, de acordo com a análise dos valores de R^2 (Figura 27) para as diferentes condições avaliadas (Tabela 27), a utilização do tampão formato com pH 5,5 se mostrou mais adequada. Os resultados obtidos

corroboram com as observações de outros autores, os quais descrevem valores de pH entre 5,5 e 6,5 como adequados para a reação de Hantzsch entre formaldeído e acetilacetona em meio contendo amônia (Bondioli & Bella, 2005; Nash, 1953).

Observa-se também que foram obtidos resultados satisfatórios ($R^2 = 0,99845$) para a utilização do reagente periodato de sódio em solução tamponada pH 5,5. No entanto, por questões operacionais específicas, optou-se pela utilização das soluções separadamente conforme a adaptação 2 (Tabela 27).

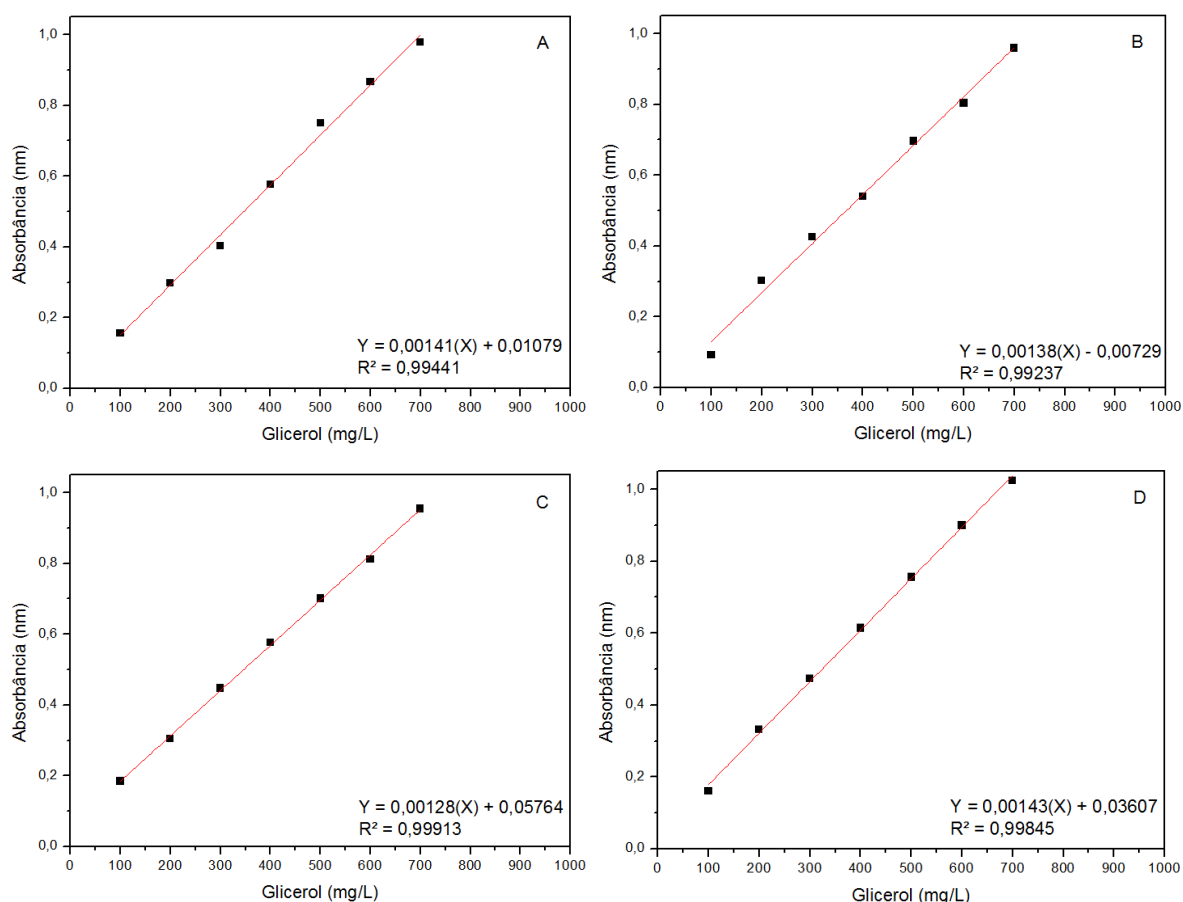


Figura 27. Curvas de calibração obtidas a partir da análise de soluções padrão de glicerol em duplicata sob diferentes condições de pH das reações. [A] Sanchez (1998) – pH 3,0; [B] Adaptação 1 – reagente tamponado pH 3,0; [C] Adaptação 2 – reagentes separados, pH 5,5; [D] Adaptação 3 - reagente tamponado pH 5,5.

Com base na literatura correlata, as temperaturas das reações foram mantidas, uma vez que a oxidação por periodato (reação 1) pode ser realizada em condições suaves, optou-se pela temperatura ambiente (Burton, 1957; Sanchez, 1998), pois condições drásticas reduzem a especificidade da reação (Sanchez, 1998). Cabe ressaltar, que outros polialcóis, nos quais os

grupos hidroxila não estão ligados a átomos adjacentes, não são oxidados a temperaturas normais (brandas) (Bradford et al., 1942). Bondioli & Bella (2005) sugerem a temperatura de 70°C para a reação 2, responsável pela formação do composto colorido. No entanto, a temperatura de 100°C utilizada no método original promove a aceleração da reação, sendo completada em 2 minutos (Sanchez, 1998).

Com relação ao tempo da reação 2, nos testes realizados para quantificação de diferentes concentrações dos padrões, os resultados médios obtidos para 2, 3 e 4 minutos de reação foram semelhantes (Tabela 28), optando-se pela manutenção do tempo de 2 minutos. Ainda, Sanchez (1998) relatou que para manitol à 100°C, tempos de reação a partir de 3 minutos levaram ao branqueamento das amostras.

Tabela 28. Resultados de concentração obtidos para diferentes padrões em tempos de reação de 2, 3 e 4 minutos.

Concentração teórica (g/L)	Tempo de reação		
	2 min	3 min	4 min
5	5,099	5,099	4,885
10	10,100	10,150	9,982
20	20,620	20,719	19,885
40	39,595	41,761	38,053

Desta forma, utilizando-se as especificações descritas na adaptação 2 (Tabela 27), a metodologia para determinação de glicerol por espectrofotometria apresentou resultados de linearidade satisfatórios a 450 nm para o intervalo das concentrações estudadas, entre 100 e 800 mg/L. Os resultados obtidos para a média de três curvas de calibração foram submetidos ao método dos mínimos quadrados para o cálculo dos parâmetros de regressão linear (Tabela 29).

A equação da regressão linear foi $y = 0,00112x + 0,02306$, em que y é a absorbância (nm) e x a concentração de glicerol (mg/L) (Figura 28). O coeficiente de correlação ($R^2 = 0,99914$) comprova a adequação do método ao intervalo avaliado, indicando uma forte correlação positiva e atende às exigências para validação de métodos da RDC nº 166 da ANVISA, que estabelece como critério mínimo aceitável correlação linear $\geq 0,99$ (Brasil, 2017).

Tabela 29. Cálculo dos parâmetros de regressão da equação linear – método de mínimos quadrados (valores médios de y).

Padrão (X_i)	Abs (Y_i)	X_i^2	Y_i^2	$X_i Y_i$	S_{XX}	S_{YY}	S_{XY}	b	a
100	0,125	12,5	10000	0,016	420000	0,532	472,367	0,00112	0,02306
200	0,247	49,4	40000	0,061					
300	0,366	109,7	90000	0,134					
400	0,488	195,2	160000	0,238					
500	0,583	291,6	250000	0,340					
600	0,697	418,2	360000	0,486					
700	0,809	566,5	490000	0,655					
800	0,918	734,1	640000	0,842					
Soma	3600	4,233	2377,4	2040000	2,772				
Média	450	0,529	297,2	255000	0,346				

X_i – concentração do padrão (mg/L); Y_i – absorvância média (nm); b – coeficiente angular; a – coeficiente linear (intercepto).

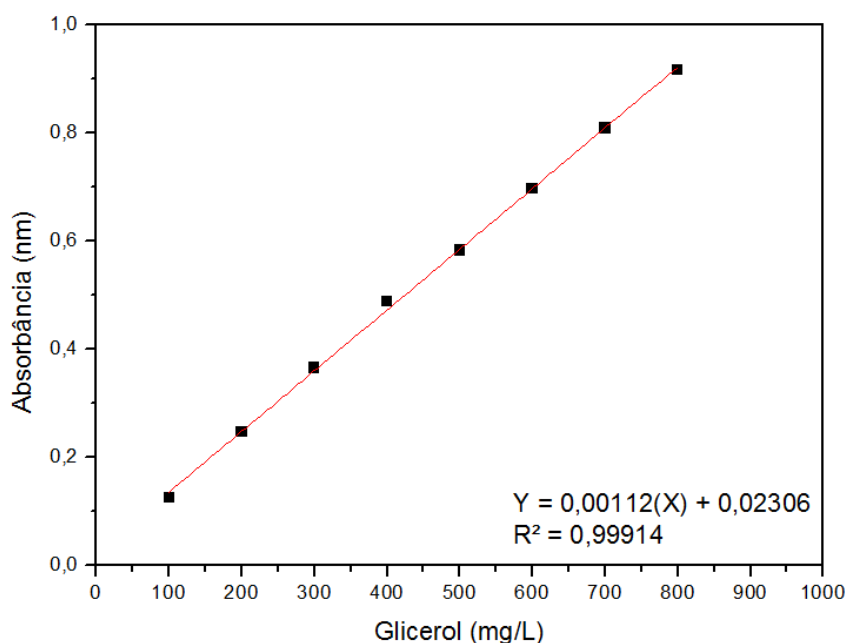


Figura 28. Curva de calibração média obtida a partir da análise de soluções padrão de glicerol entre 100 e 800 mg/L.

Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados foram 6,901 e 23,004 mg/L, respectivamente. Pode-se inferir que o método possui alta sensibilidade para

detectar e quantificar o padrão glicerol, sem sofrer alterações significativas devido a fatores intrínsecos à metodologia empregada.

A Tabela 30 mostra os resultados para a análise de variância (ANOVA) do modelo de regressão $y = 0,00112x + 0,02306$. Os resultados obtidos confirmam que para o método adaptado o modelo de regressão linear é estatisticamente significativo, uma vez que $F > F_{\text{Crítico}}$.

Tabela 30. Resultados da análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão obtido a partir dos valores médios de y.

Fonte	gl	SQ	MQ	F	F _{Crítico}
Regressão	1	0,531262542	0,531262542	8142,835056	1,24778E-10
Resíduo	6	0,000391458	6,52429E-05		
Total	7	0,531654			

gl – graus de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – quadrado médio; F – valor da distribuição F calculado; F_{crítico} – valor tabelado.

Os resultados para os parâmetros repetibilidade (intra-corrída), precisão intermediária (inter-corrída) e exatidão do método são apresentados na Tabela 31. Os resultados obtidos para precisão intra e inter-corrída encontram-se compreendidos entre 0,643 e 2,867% e sendo inferiores ao critério de aceitação estabelecido, $DPR \leq 5\%$. Da mesma forma, o parâmetro exatidão situou-se entre 99,02 e 105,93%, sendo possível concluir que o método adaptado permite quantificar o padrão glicerol de forma precisa e exata.

Tabela 31. Resultados para repetibilidade, precisão intermediária e exatidão do método espectrofotométrico para quantificação de glicerol.

Ensaio	Concentração teórica (mg/L)	N	C (mg/L)	DP	DPR (%)	Exatidão (%)
Repetibilidade (mesma concentração)	400	9	412,903	11,838	2,867	103,22
Repetibilidade (mesmo dia)	200	3	206,524	2,716	1,315	103,26
	500	3	498,754	3,206	0,643	99,75
	800	3	792,171	12,448	1,571	99,02
Precisão intermediária	200	3	211,859	4,202	1,983	105,93
	500	3	497,865	6,224	1,250	99,57
	800	3	799,284	20,020	2,505	99,91

C – concentração média de N determinações; DP – desvio padrão da média; DPR – desvio padrão relativo (precisão); E – exatidão. Critério aceitável repetibilidade e precisão intermediária, $DPR \leq 5\%$.

Por fim, são apresentados os resultados comparativos para a quantificação do conteúdo de glicerol em uma amostra de cultivo, em triplicata. Para tanto, uma amostra de fermentação foi previamente diluída três vezes e analisada por CLAE (Tabela 32). A essa amostra de cultivo, foram adicionadas concentrações de 200, 500 e 800 mg/L do padrão glicerol, sendo que, no preparo das amostras para o estudo de recuperação utilizaram-se volumes de 50% de amostra e 50% de cada padrão, ou seja, devendo ser considerada a diluição.

Os padrões preparados foram analisados em triplicata, conforme resultados apresentados na Tabela 33. Após a adição dos padrões ao caldo, as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento de análise, em triplicata (Tabela 33).

Tabela 32. Resultados prévios obtidos para amostra de caldo fermentado em análise por cromatografia em fase líquida.

Composto	Glicerol	Acetoína	<i>meso</i> -2,3-BDO	<i>2S,3S</i> -(+)-2,3-BDO	Etanol
Concentração média (mg/L)	424 ± 0,002	565 ± 0,002	3242 ± 0,002	1290 ± 0,001	1036 ± 0,001

Tabela 33. Resultados obtidos para análise espectrofotométrica de uma amostra de caldo fermentado contendo metabólitos microbianos e adicionada com diferentes concentrações do padrão glicerol.

Amostra	Concentração teórica (mg/L)	N	C (mg/L)	DP	DPR (%)	R (%)
Padrão 200	200	3	206,524	2,716	1,315	103,26
Padrão 500	500	3	498,754	3,206	0,643	99,75
Padrão 800	800	3	792,171	12,448	1,571	99,02
caldo + 200	630,524	3	652,279	11,570	1,774	103,45
caldo + 500	922,754	3	911,315	12,448	1,366	98,76
caldo + 800	1216,171	3	1194,654	34,771	2,911	98,23

C – concentração média de N determinações; DP – desvio padrão da média; DPR – desvio padrão relativo (precisão); R – recuperação (exatidão).

A partir dos dados apresentados nas Tabelas 32 e 33, observa-se que, apesar das altas concentrações de metabólitos presentes no caldo de fermentação, o método apresentou resultados adequados para glicerol em amostras de cultivo, com precisão entre 1,366 e 2,911%, inferiores ao critério de aceitação estabelecido, $DPR \leq 5\%$. Além disso, após a adição dos padrões ao caldo, valores médios de recuperação entre 98,23 e 103,45% foram obtidos. Adicionalmente, a confiabilidade do método também pode ser verificada na

Figura 29, que mostra um perfil de cultivo comparando-se os resultados para glicerol obtidos por cromatografia e espectrofotometria.

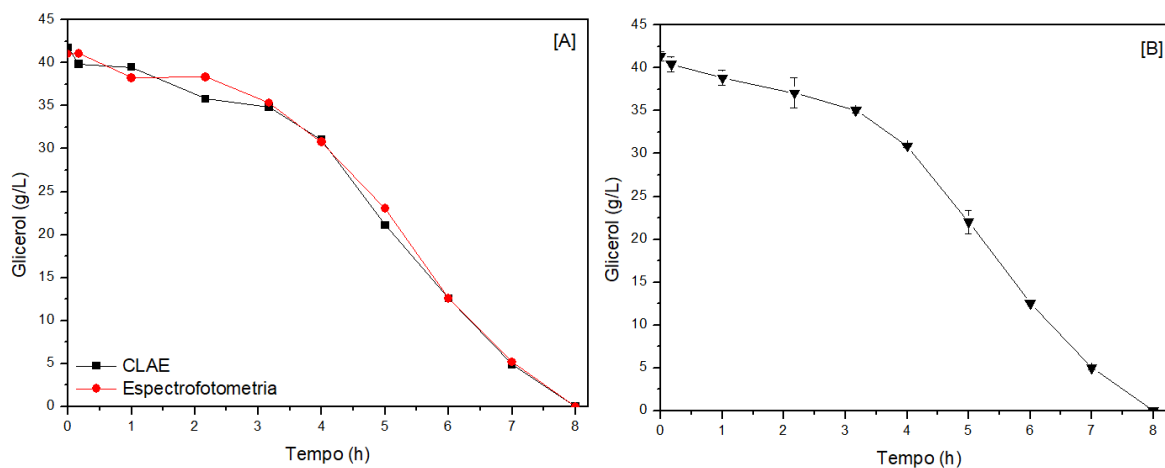


Figura 29. Perfil comparativo para concentrações de glicerol determinadas por cromatografia e espectrofotometria ao longo de um cultivo em batelada. $S_0 = 40$ g/L. Concentrações médias - CLAE e Espectrofotometria [A]; média e desvio padrão relativo (DPR) entre os métodos [B].

Conforme observado na Figura 29, a determinação de glicerol por ambos os métodos não foi afetada pela presença de altas concentrações de sais minerais no meio no início do cultivo e de produtos no final do cultivo, além de outras impurezas características da origem do glicerol subproduto. Os resultados obtidos para ambos os métodos apresentaram desvio padrão relativo (DPR) inferior a 7%, demonstrando precisão adequada entre os métodos.

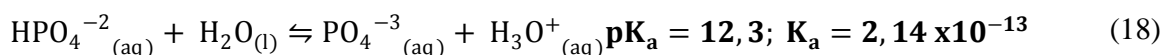
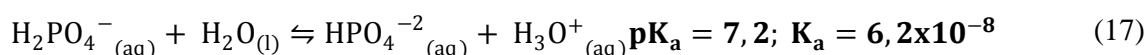
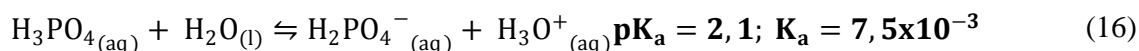
Considerando a necessidade do monitoramento do consumo de substrato ao longo de cultivos microbianos, principalmente quando se trata de cultivos conduzidos em regime descontínuo alimentado e, em particular, a indisponibilidade de equipamentos de cromatografia para o devido acompanhamento, o método espectrofotométrico, por sua vez, proporcionaria o controle adequado durante todo processo. Ainda, apresenta facilidade de execução, fornecendo resultados de forma rápida, precisa e exata e, não exige etapas laboriosas de preparação das amostras. O método espectrofotométrico também poderia ser considerado economicamente mais atrativo.

4.2.3 Validação de método cromatográfico para a determinação de ácido fosfórico proporcionalmente ao conteúdo de íons fosfato em amostras de fermentação

Devido à impossibilidade técnica relacionada à determinação das concentrações dos demais componentes do meio de fermentação, neste trabalho, em particular, atenção será dada à quantificação de íons fosfato. Quando no meio de cultivo em solução, em pH 5,5, o fosfato de amônio dibásico ((NH₄)₂HPO₄) sofre dissociação (Equação 15), liberando íons inorgânicos que ficam disponíveis às bactérias presentes no meio.



Considerando-se que o ácido fosfórico (H₃PO₄), neste caso, presente como base conjugada ((NH₄)₂HPO₄), trata-se de um ácido fraco poliprótico, ou seja, que se dissocia em mais de uma etapa de equilíbrio, os respectivos valores da constante de dissociação (pK_a) específicos para cada ionização devem ser considerados a fim de determinar as diferentes formas fosfatadas que podem estar presentes no meio, conforme as Equações 16, 17 e 18 (25°C).



Com relação a espécies que são carregadas negativamente em solução aquosa, estas podem ser retidas em uma coluna de troca iônica. Segundo Guo (2005) e colaboradores, estas espécies podem ser eluídas em fase aquosa simples ou em soluções ácidas com valores de pH entre 2,1 e 5,5. Aliás, no estudo de Guo et al. (2005), em que os autores empregaram o sistema LC-ICP-MS para determinação de glifosato e fosfato, foi identificado que soluções ácidas com valores de pH de 2,45 e 2,35, como os ácidos cítrico e tartárico, 20 mmol/L, foram os eluentes mais adequados para as espécies determinadas.

Considerando o exposto, no presente estudo utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para desenvolver e validar um método cromatográfico para determinação de ácido fosfórico em amostras de caldo fermentado proporcionalmente à concentração de íons fosfato disponíveis no meio de cultivo, partindo das condições cromatográficas descritas

no item 3.5.5. Sabendo-se que um ácido fraco encontra-se 50% dissociado em uma condição de pH igual ao valor do seu pK_a , neste caso, pode-se inferir que no meio de cultivo em pH 5,5, existe uma predominância das formas ionizadas $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} . Todavia, a fase móvel de ácido sulfúrico 5 mmol/L (pH 1,9) foi utilizada de forma a garantir que todo o conteúdo de espécies fosfatadas contidas nas amostras analisadas estivessem na forma predominante de ácido fosfórico (H_3PO_4), para que pudessem ser quantificadas.

Na Figura 30 é mostrado o perfil cromatográfico obtido para padrões de fosfato de amônio e a sobreposição do padrão juntamente com uma amostra de caldo fermentado. Embora a supressão iônica do analito de interesse não tenha sido avaliada, como resultados (Figura 30A), pode-se sugerir que não houve supressão da ionização do ácido fosfórico e presença de cauda utilizando-se H_2SO_4 5 mmol/L como fase móvel devido ao seu baixo valor de pH (1,9). Estes resultados corroboram com os relatados por Valls-Cantenys et al. (2012), nos quais o pH teve um papel importante na separação cromatográfica em metodologia para especificação de oxiácidos de fósforo. Segundo os autores, as espécies estudadas apresentam um forte caráter ácido, necessitando de uma fase móvel de pH baixo para eluir eficientemente da coluna. Valls-Cantenys et al. (2012) demonstraram que um pH baixo permite a eluição das espécies mais retidas e que, a um pH inferior a 1,8, o suporte polimérico pode sofrer alterações estruturais, enquanto que a pH superior a 2,3 a separação cromatográfica foi degradada.

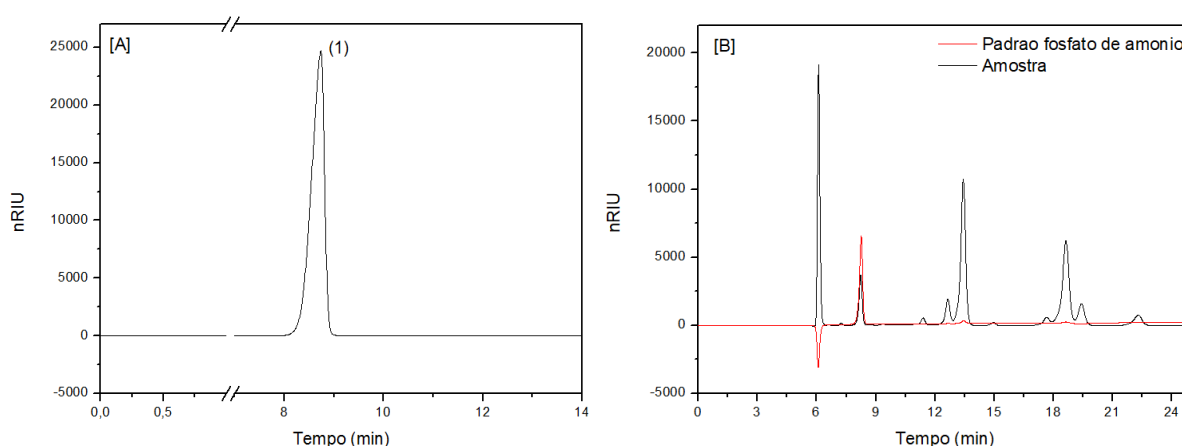


Figura 30. Perfil cromatográfico (CLAE) de amostras de fosfato de amônio (1) [A] e amostra de fermentação contendo metabólitos juntamente com padrão fosfato de amônio [B], utilizando detector IR, a 60°C, em fase móvel de H_2SO_4 5 mmol/L e fluxo 0,6 mL/min.

A faixa de linearidade do método foi determinada pela análise de três curvas de calibração, construídas utilizando-se como padrão o sal de fosfato de amônio dibásico ((NH₄)₂HPO₄) em concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 g/L, realizadas em três dias distintos. Considerando que na molécula de fosfato de amônio, proporcionalmente, o conteúdo do íon PO₄³⁻ corresponde a cerca de 72%, os resultados obtidos foram corrigidos considerando-se este percentual. No entanto, graficamente são representados como ácido fosfórico, uma vez que a cromatografia utilizada não permite a quantificação de íons. As concentrações correspondentes consideradas para os padrões e utilizadas nos cálculos foram: 0,18; 0,36; 0,72; 1,08; 1,44; 1,80; 2,16 e 2,52 g/L.

A equação da regressão linear obtida foi $y = 4406,86934x + 97,02341$, com coeficiente de correlação (R²) de 0,99826 (Figura 31), comprovando a adequação do método ao intervalo de concentração avaliado.

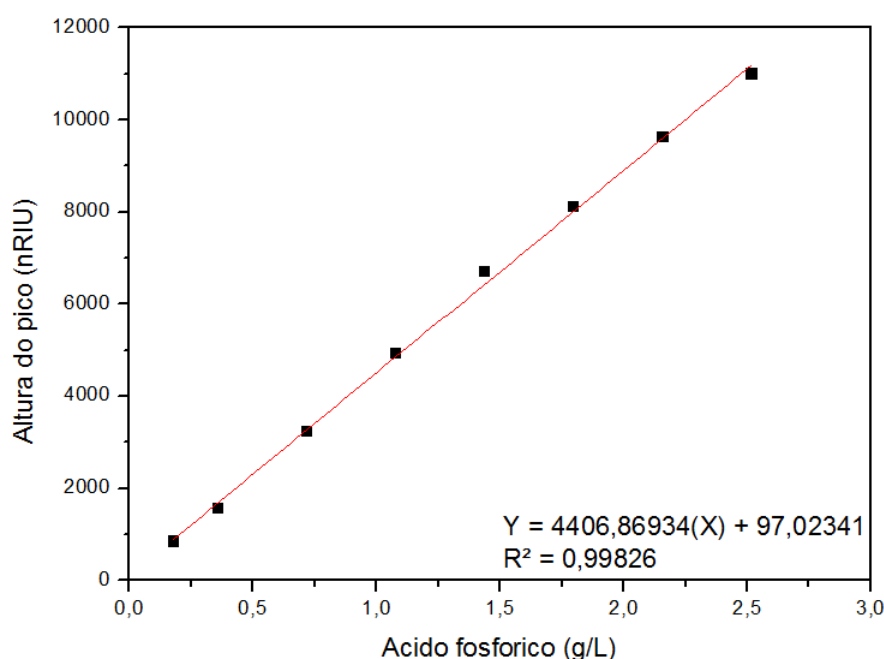


Figura 31. Curva de calibração média obtida a partir da análise de soluções padrão de fosfato de amônio com concentrações corrigidas para íons fosfato (PO₄³⁻) e expressos graficamente como ácido fosfórico.

Os valores calculados para os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram 0,001 e 0,004 g/L, respectivamente, indicando uma alta sensibilidade do método nas condições definidas para operação do sistema. Além disso, ambos ficaram abaixo da faixa de concentração utilizada no desenvolvimento da metodologia.

A precisão do método analítico foi avaliada segundo os parâmetros repetibilidade (intra-corrída) e precisão intermediária (inter-corrída). Os resultados para repetibilidade foram obtidos a partir de nove determinações, na concentração de 1,44 g/L da substância de referência, analisada em um mesmo dia. Para a precisão intermediária, os desvios foram calculados a partir de concentrações de 0,36; 1,44 e 2,52 g/L, avaliados em três dias consecutivos. A exatidão foi verificada a partir de nove determinações, em concentrações baixa, média e alta, em triplicata, da substância de referência (Brasil, 2017). Os resultados são apresentados na Tabela 34.

Tabela 34. Resultados para repetibilidade, precisão intermediária e exatidão do método cromatográfico para quantificação de ácido fosfórico.

Ensaio	Concentração teórica (g/L)	N	C (g/L)	DP	DPR (%)	Exatidão (%)
Repetibilidade (mesma concentração)	1,44	9	1,499	0,002	0,109	104,12
Repetibilidade (mesmo dia)	0,36	3	0,354	0,000	0,074	98,48
	1,44	3	1,442	0,001	0,039	100,18
	2,52	3	2,391	0,001	0,030	94,88
Precisão intermediária	0,36	3	0,338	0,014	4,049	94,00
	1,44	3	1,479	0,032	2,200	102,75
	2,52	3	2,446	0,047	1,918	97,05

C – concentração média de N determinações; DP – desvio padrão da média; DPR – desvio padrão relativo (precisão); E – exatidão. Critério aceitável repetibilidade e precisão intermediária, $DPR \leq 5\%$.

Os resultados obtidos para repetibilidade (Tabela 34) oscilaram entre 0,030 e 0,109%, e encontram-se dentro dos padrões aceitáveis ($DPR \leq 5\%$). Com relação à precisão intermediária, independentemente da concentração analisada, o desvio padrão relativo (DPR) foi inferior a 5% demonstrando que a precisão do método é adequada. Entretanto, observa-se maior variação no método para a avaliação inter-corrída, o que ressalta que sejam tomados cuidados no preparo e conservação das amostras e, sugere a necessidade de um estudo de estabilidade dos padrões.

A exatidão do método analítico, a qual foi avaliada para concentrações teóricas do padrão de referência oscilou entre 94,00 e 104,12% (Tabela 34) demonstrando que a metodologia desenvolvida utilizando a altura dos picos cromatográficos para a quantificação dos compostos é adequada.

Como etapa final desta validação, avaliou-se a recuperação do analito de interesse quando este é adicionado à matriz em concentrações conhecidas. Para tanto, uma amostra de fermentação foi previamente diluída três vezes e analisada por CLAE, a fim de caracterizá-la. A essa amostra de cultivo, foram adicionadas concentrações de 0,36, 1,44 e 2,52 g/L do padrão fosfato de amônio. No preparo das amostras para o estudo de recuperação utilizaram-se volumes de 50% de amostra e 50% de cada padrão, ou seja, devendo ser considerada a diluição. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 35 e 36.

Tabela 35. Resultados prévios obtidos para amostra de fermentação (matriz) em análise por cromatografia em fase líquida.

Composto	Glicerol	Acetoína	<i>meso</i> -2,3-BDO	<i>2S,3S</i> -(+)-2,3-BDO	Etanol
Concentração média (g/L)	3,397 ± 0,010	0,345 ± 0,005	2,909 ± 0,001	0,967 ± 0,001	0,612 ± 0,005

Tabela 36. Exatidão do método correspondente à análise cromatográfica de uma amostra de fermentação contendo metabólitos microbianos adicionada com diferentes concentrações do padrão fosfato de amônio.

Amostra/Padrão	Concentração teórica (g/L)	N	C (g/L)	DP	DPR (%)	R (%)
Amostra	1,0864	3	0,818	0,001	0,070	75,30
Padrão 1	0,36	3	0,355	0,007	0,195	98,56
Padrão 2	1,44	3	1,442	0,006	0,039	100,18
Padrão 3	2,52	3	2,391	0,007	0,030	94,88
Amostra + Padrão 0,36	0,721	3	0,636	0,000	0,021	88,22
Amostra + Padrão 1,44	1,264	3	1,151	0,007	0,060	90,99
Amostra + Padrão 2,52	1,738	3	1,641	0,002	0,128	94,40

C – concentração média de N determinações; DP – desvio padrão da média; DPR – desvio padrão relativo (precisão); R – recuperação (exatidão).

O método proposto proporcionou a obtenção de resultados satisfatórios para precisão e após a adição do padrão à matriz, valores médios de recuperação de 91% foram atingidos (Tabela 36). Pode-se concluir que o método analítico desenvolvido por CLAE permitiu a quantificação de ácido fosfórico, proporcionalmente à concentração de íons fosfato em solução, de forma adequada para aplicação no monitoramento e análise de processos de fermentação. No entanto, estes dados também demonstram que o método proposto é afetado

pela composição da matriz, uma vez que o percentual de recuperação observado para a amostra de cultivo foi de 75%.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O processo de obtenção de 2,3-butanodiol e acetoína pelas bactérias anaeróbias facultativas *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 foi avaliado, identificando-se a aplicabilidade do glicerol subproduto da produção de biodiesel como substrato adicionado ao meio mineral de fermentação. Os resultados de obtenção de 2,3-BDO e acetoína a partir de glicerol subproduto são comparáveis ao uso de glicose e glicerol puro.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as conclusões apresentadas a seguir:

- concentrações finais de produtos (2,3-BDO e acetoína) de 88,8 e 67,5 g/L podem ser alcançadas utilizando-se glicerol subproduto como substrato para *K. oxytoca* e *E. aerogenes*;
- ambas as fontes de glicerol - puro e subproduto - são preferencialmente convertidas nos produtos de interesse, pois tanto em cultivos de *K. oxytoca* quanto de *E. aerogenes* em regime descontínuo alimentado, rendimentos em produtos (2,3-BDO e acetoína) da ordem de 93 e 96% e 82 e 84% são atingidos, superiores aos obtidos com glicose, de 79 e 71%;
- a fonte de carbono empregada no cultivo tem influência sobre a formação dos isômeros de 2,3-BDO, com cerca de 52-53% e 46-47% dos isômeros *meso* e 2*S*,3*S*-(+)- sendo obtidos em cultivos de *K. oxytoca* e 61-56% e 39-44% com *E. aerogenes* para os substratos glicerol puro e subproduto, respectivamente; com o uso de glicose, cerca de 85-88 e 15-12% dos isômeros *meso* e 2*S*,3*S*-(+)- são formados em cultivos de *K. oxytoca* e *E. aerogenes*, respectivamente;
- o metabolismo de ambas as linhagens é afetado pela utilização do glicerol subproduto, tanto em termos de crescimento como formação de produtos, provavelmente devido à presença das impurezas no substrato;
- meios de cultivo de formulações distintas - relatados na literatura -, associados à presença de glicerol subproduto ($S_0 = 40$ g/L) são aplicáveis, em particular, para a produção de 2,3-BDO e acetoína por *E. aerogenes*; a linhagem é capaz de crescer em meios simples, contendo apenas fontes de nitrogênio inorgânico;
- com a aplicação de planejamento experimental, foi mostrado que a linhagem *E. aerogenes* se adapta metabolicamente quando submetida às diferentes concentrações dos sais testadas em associação à presença de glicerol subproduto no meio de cultivo;
- os perfis cinéticos dos cultivos conduzidos com meio otimizado (MD5) e meio controle (PC), em regime descontínuo, em biorreator de bancada, são muito semelhantes; contudo, a formação de produtos ao final da fermentação indica, possivelmente, uma carência de nutrientes no meio MD5;

- a partir dos ensaios em biorreator com os meios MD5 e PC, sugere-se ainda, que a continuidade da formação de produtos pode estar ligada às concentrações de íons como Ca^{2+} e Fe^{2+} naturalmente presentes no glicerol subproduto ou à presença de íons Zn^{2+} , Mn^{2+} , fornecidos no meio PC;
- o método cromatográfico validado para a determinação de glicerol, acetoína, *meso*-2,3-BDO, *2S,3S*-(+)-2,3-BDO e etanol em amostras de fermentação se mostra adequado para o monitoramento de processos fermentativos, tendo em vista o atendimento aos critérios estabelecidos na RDC nº 166 da ANVISA;
- o método espectrofotométrico adaptado e validado para o monitoramento das concentrações de glicerol no cultivo se mostra adequado para este propósito e, importante, não é afetado pela presença de impurezas do glicerol subproduto e de concentrações elevadas de 2,3-BDO no meio fermentado;
- o método cromatográfico proposto para a quantificação de ácido fosfórico, proporcionalmente à concentração de íons fosfato no meio fermentado, proporciona a obtenção de resultados razoáveis do ponto de vista do monitoramento do processo, sendo, entretanto, afetado pela composição da matriz, com resultados de recuperação de 75%.

Como perspectivas para a continuidade dos estudos de produção de 2,3-BDO e acetoína por bactérias anaeróbias facultativas a partir de glicerol subproduto, sugerem-se:

- condução de cultivos de *E. aerogenes* em regime descontínuo alimentado, utilizando o meio otimizado, com o uso de diferentes estratégias de adição posterior de sais nutrientes;
- aperfeiçoamento das condições operacionais de cultivos conduzidos em regime descontínuo alimentado, com ambas as linhagens bacterianas utilizadas no trabalho, envolvendo estratégias de alimentação (substrato e sais nutrientes) nas diferentes etapas da fermentação, buscando também reduzir o tempo de processo;
- avaliação da ambientação das culturas bacterianas em concentrações crescentes de substrato, buscando a seleção de indivíduos capazes de metabolizar altas concentrações de glicerol subproduto;
- desenvolvimento e aperfeiçoamento de metodologias analíticas que possibilitem o monitoramento da concentração elementar dos diferentes componentes do meio de cultivo no decorrer do processo;
- desenvolvimento de metodologias para a separação/recuperação de 2,3-BDO e acetoína do meio fermentado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afschar A.S., Rossell C.E.V., Jonas R., Chanto A.Q., Schaller, K. (1993). Microbial production and downstream processing of 2,3-butanediol. **J Biotechnol.** 27: 317–29.
- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. (2018). **Dados estatísticos – Produção de biocombustíveis.** Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acessado em: 25 jul 2018.
- Almeida J.R.M., Favaro L.C.L., Quirino B.F. (2012). Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges from microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnol Biofuels.** 5: 48-48.
- Amaral P.F.F., Ferreira T.F., Fontes G.C., Coelho M.A.Z. (2009). Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food Bioprod. Process.** 87: 179-186.
- Andrade C. J. (2013) Bioprodução de biosurfactantes, enzimas e aromas, associada à utilização de resíduos agroindustriais. **Revista Citino.** Vol. 3, Nº 1, Janeiro-Março de 2013.
- Arruda P. V., Rodrigues R. C. L. B., Felipe M. G. A. (2007). Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica.** 26: 56-62.
- Barbosa C.R. (2009). Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para a produção de endotoxinas por *Bacillus thurigiensis var. israelensis*. **Dissertação Mestrado.** Universidade de São Paulo. Lorena, Brasil.
- Baumgarten S. (2015). INVISTA, LanzaTech advance on bio-derived butadiene. ICIS Chemical Business. Disponível em: <<http://www.icis.com>>. Acessado em: 07 abr. 2018.
- Becker C. M., Barsé B., Hartmann C., Carra S., Girardi V., Silveira M. M., Malvessi, E. (2013). Crescimento de *Enterobacter aerogenes* em glicerol frente a diferentes temperaturas. In: XXI Encontro de Jovens Pesquisadores e III Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia. **Resumos.** Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Berbert-Molina M. A., Sato S., Silveira M. M. (2001). Ammonium phosphate as a sole nutritional supplement for the fermentative production of 2,3-butanediol from sugar cane juice. **Zeitschrift für Naturforschung.** 56: 787-791.
- Berbert-Molina M.A. (1995). Avaliação de caldo de cana-de-açúcar para obtenção de 2,3-butanodiol. **Dissertação Mestrado.** Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- Białkowska A.M. (2016). Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. **World J Microbiol Biotechnol.** 32, 200.
- Biebl H., Menzel K., Zeng A-P., Deckwer W-D. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. **Appl Microbiol Biotechnol.** 52: 289–297.
- Bompelly R., Skaf D.W. (2014). Optimization of a colorimetric test method for quantifying glycerol in aqueous solution. **J Am Oil Chem Soc.** 91:1605–1610.
- Bondioli P., Bella L.D. (2005). An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **Eur J Lipid Sci Technol.** 107: 153–157.
- Boutron P. (1990). Levo- and dextro-2,3-butanediol and their racemic mixture: very efficient solutes for vitrification. **Cryobiology.** 27: 55-69.
- Boutron P. (1992). Cryoprotection of red blood cells by a 2,3-butanediol containing mainly the levo and dextro isomers. **Cryobiology.** 29: 347-358.
- Bradford, P., Pohle, W.D., Gunther, J.K., Mehlenbacher, V.C. (1942). Determination of glycerol by oxidation with periodic acid. **Oil & Soap.**

- Brady C., Cleenwerck I., Venter S., Coutinho T., De Vos P. (2013). Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA). **System Appl Microbiol.** 36: 309-319.
- Brasil. **Lei nº 13.263/2016** - Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional.
- Brasil. **Lei nº 11.097/2005** - Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências.
- Brasil. **RDC nº 166/2017** - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.
- Brisse S., Grimont F., Grimont P.A.D. (2006). The Genus *Klebsiella*. **Prokaryotes.** 6: 159–196.
- Burton R.M. (1957). The determination of glycerol and dihydroxyacetone. **Methods Enzymol.** 3: 246-249.
- Carra S. (2012). Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. **Dissertação de Mestrado.** Universidade de Caxias do Sul.
- Catignani G.L., Bieri J.G. (1983). Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. **Clin Chem.** 29: 708-712.
- Celinska E., Grajek W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol: current state and prospects. **Biotechnol Adv.** 27: 715-725.
- Cheng K.K., Liu H.J., Liu D.H. (2005). Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation. **Biotechnol Lett.** 27: 19-22.
- Cheng K.K., Wu J., Wang G.Y., Li W.Y., Feng J., Zhang J.A. (2013). Effects of pH e dissolved CO₂ level on simultaneous production of 2,3-butanediol and succinic acid using *Klebsiella pneumoniae*. **Bioresour Technol.** 135: 500-503.
- Chookaew T., O-Thong S., Prasertsan P. (2014). Statistical optimization of medium components affecting simultaneous fermentative hydrogen and ethanol production from crude glycerol by thermotolerant *Klebsiella* sp. TR17. **Int J Hydrogen Energy.** 39: 751-760.
- Ciriminna R, Pina CD, Rossi M, Pagliaro M. (2014). Understanding the glycerol market. **Eur J Lipid Sci Technol.** 116: 1432–1439.
- Clendenning K. A. (1946). Production and properties of 2,3-butanediol. XI. Evaluation of levo-2,3-butanediol as a non-volatile antifreeze compound. **Canad J Res.** 24: 249-271.
- Converti A., Perego P. (2003). Use of carbon and energy balance in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. **Appl Microbiol Biotechnol.** 59: 303-309.
- Costa N.R., Lourenço J., Pereira Z.L. (2011). Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions. **Chem Int Lab Systems.** 107: 234-244.
- Dobson R., Gray V., Rumbold K. (2012). Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 39:217–226.
- Drozdzyńska A., Pawlicka J., Kubiak P., Kosmider A., Pranke D., Olejnik-Schmidt A., Czaczyk, K. (2014). Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei* – newly isolated strains from the Enterobacteriaceae. **N Biotechnol.** 31: 402-10.

- Du J., Ji X.-J., Huang H., Nie Z.-K., Ren X., Hu N., Li S. (2009). Simultaneous determination of glucose, xylose and metabolites in 2,3-butanediol fermentation broth by ion-exclusion liquid chromatography. **Chinese J Analytical Chem.** 37(5): 681-684.
- Esener A.A., Bol G., Kossen N.W.F., Roels J.A. (1981). Effect of water activity on microbial growth. In: Scientific and Engineering Principles. Proceedings of the Sixth International Fermentation Symposium Held in London, Canada, July 20–25, 1980. pp. 339-344.
- Flickinger M. C. (1980). Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come? **Biotechnol. Bioeng.** 22: 27-48.
- Gaden E. L. (1959). Fermentation kinetics and productivity. **Chem. Ind.** 7: 154.
- Garcia A.D. (2006). Produção fermentativa de 2,3 Butanodiol a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. **Tese de Doutorado.** Lorena. Lorena, Brasil.
- Garcia-Ochoa F., Gomez E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnol. Adv.** 27: 153-176.
- Garg S.K., Jain A. (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. **Bioresour. Technol.** 51: 103-109.
- Garlapati V. K., Shankar U., Budhiraja A. (2016). Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. **Biotechnol. Reports.** 9: 9–14.
- Girardi V. (2014). Emprego do glicerol como fonte de carbono na produção fermentativa de 2,3-butanodiol por *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. **Dissertação Mestrado.** Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Grant W.D. (2004). Life at low water activity. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 359: 1249-1267.
- Grimont F., Grimont P.A.D. (2006). The Genus *Enterobacter*. **Prokaryotes.** 6: 197–214.
- Guo Z.X., Cai Q., Yang Z. (2005). Determination of glyphosate and phosphate in water by ion chromatography—inductively coupled plasma mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A.** 1100: 160–167.
- Guzman D., Chang J. (2012). Green Chemicals: LanzaTech to start selling biobased 2,3-BDO by end of 2014. ICIS Chemical Business. Disponível em: <<http://www.icis.com>>. Acessado em: 07 abr. 2018.
- Haberer J.L., Brandes J.A. (2003). A high sensitivity, low volume HPLC method to determine soluble reactive phosphate in freshwater and saltwater. **Marine Chemistry.** 82: 185– 196.
- Hahn-Hagerdal B. (1986). Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes. **Enzyme Microb. Technol.** 8: 322-327.
- Harden A., Walpole G.S. (1906). Chemical action of *Bacillus lactis aerogenes* (*Escherich*) on glucose and mannitol: production of 2,3-butylene glycol and acetylmethylcabinol. **Proc R Soc B.** 77: 399-405.
- Haron R., Mata R., Amran T., Abdullah T., Rahman R.A. (2018). Overview on utilization of biodiesel by-product for biohydrogen production. **Journal of Cleaner Production.** 172. 10.1016/j.jclepro.2017.10.160.
- Harvey B.G., Merriman W.W., Quintana R.L. (2016). Renewable gasoline, solvents, and fuel additives from 2,3-butanediol. **Chem Sus Chem.** 9: 1-7.
- Hasan-Beikdashti M., Forootanfar H., Safarian M. S., Ameri A., Ghahremani M. H., Khoshayand M. R., Faramarzi M. A. (2012). Optimization of culture conditions for production of lipase

- by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. **J Taiwan Inst Chem Engineers**. 43: 670-677.
- He Q., McNutt J., Yang J. (2017). Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. **Renew Sustain Energy Rev**. 71: 63–76.
- Hu X., Shen X., Huang M., Liu C., Geng Y., Wang R., Xu R., Qiao H., Zhang L. (2016). Biodegradable unsaturated polyesters containing 2,3-butanediol for engineering applications: synthesis, characterization and performances. **Polymer**. 84: 343-354.
- Ito T., Nakashimada Y., Senba K., Matsui T., Nishio N. (2005). Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. **J Biosc Bioeng**. 100: 260–265.
- Jansen N.B., Flickinger M.C., Tsao G.T. (1984). Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnol Bioeng**. 26: 362-369.
- Ji X. J., Huang H., Du, J., Zhu J. G., Ren, L. J., Li, S. (2009a). Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. **Bioresour Technol**. 100: 3410-3414.
- Ji X. J., Huang H., Ouyang P. K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. **Biotechnol Adv**. 29: 351-364.
- Ji X.J., Huang H., Du J., Zhu J. G., Ren L.J., Li S., Nie Z.K. (2009b). Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through cofermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. **Bioresour Technol**. 100: 5214-5218.
- Jo J. H., Lee D. S., Park D., Choe W., Park J. M. (2008). Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. **Bioresour Technol**. 99: 2061-2066.
- Jurchescu I.M., Hamann J., Zhou X., Ortmann T., Kuenz A., Prübe A., Lang S. (2013). Enhanced 2,3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785. **Appl Microbiol Biotechnol**. 97: 6715–6723.
- Kaur G., Srivastava A. K., Chand S. (2012). Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. **Biochem Eng J**. 64: 106-118.
- Kim K.J., Jeong I.J. (2009). An interactive desirability function method to multiresponse optimization. **Eur J Oper Res**. 195: 412–426
- Knothe G., Gerpen J. V., Krahl J., Ramos L. P. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.
- Kong P.S., Aroua, M.K., Daud, W.M. (2016). Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: a feasibility evaluation. **Renew Sustain Energy Rev**. 63: 533–555.
- Kopke M., Mihalcea C., Liew F., Tizard J.H., Ali M.S., Conolly J.J., Al-Sinawi B., Simpson S.D. (2011). 2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. **Appl Environ Microbiol**. 77: 5467–5475.
- Koshiishi I., Imanari T. (1985). High performance liquid chromatography of phosphomolybdate and silicomolybdate: simultaneous determination of phosphate and silicate. **Analytical Sciences**. 1: 253-256.
- Koutinas A., Yopez B., Kopsahelis N., Freire D. M.G., Castro A. M., Papanikolaou S., Kookos I. K. (2016). Techno-economic evaluation of a complete bioprocess for 2,3-butanediol production from renewable resources. **Bioresour Technol**. 204: 55-64.
- Lambert M., Neish A.C. (1950). Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. **Can J Res**. 3: 83-89.

- Li L., Li K., Wang K., Chen C., Gao C., Ma C., Xu P. (2014). Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain. **Bioresour Technol.** 170: 256-261.
- Li L., Zhang L., Li K., Wang Y., Gao C., Han B., Ma C., Xu P. (2013). A newly isolated *Bacillus licheniformis* strain thermophilically produces 2,3-butanediol, a platform and fuel biochemical. **Biotechnol Biofuels.** 6: 123.
- Lou C., Guo D., Wang N., Wu S., Zhang P., Zhu Y. (2017). Detection of trace fluoride in serum and urine by online membrane-based distillation coupled with ion chromatography. **J Chromatogr A.** 1500: 145-152.
- Lu K., Hanrahan G. (2006). Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. **Crit Reviews in Anal Chem.** 36: 141-151.
- Luo X., Ge X., Cui S., Li S. (2016). Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. **Bioresour Technol.** 215: 144–154.
- Ma C., Wang A., Qin J., Li L., Ai X., Jiang T., Tang H., Xu P. (2009). Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. **Appl Microbiol Biotechnol.** 82: 49- 57.
- Madigan M. T., Martinko J.M., Bender K.S. (2016). **Microbiologia de Brock.** 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.
- Magee R. L., Kosaric, N. (1987). The microbial production of 2,3-butanediol. **Adv Appl Microbiol.** 32: 89-161.
- Mangayil R., Aho T., Karp M., Santala V. (2015). Improved bioconversion of crude glycerol to hydrogen by statistical optimization of media components. **Renew Energy.** 75: 583-589.
- Marques E.P., Silva V.D., Almeida J.M.S., Costa H.D., Cavalcante G., Marques A.L.B. (2011). Metodologia analítica para glicerol em biodiesel: cenário atual. **Cad. Pesq.,** São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011
- Marshall B.J., Ohye D.F., Christian J.H.B. (1971). Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium. **Appl Microbiol.** 21: 363-364.
- McConathy J., Owens M.J. (2003). Stereochemistry in drug action. **Prim Care Companion J Clin Psychiatry.** 2: 70-73.
- Metsoviti M., Paraskevaïdi K., Koutinas A., Zeng A., Papanikolaou S. (2012). Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. **Process Biochem.** 47: 1872–1882.
- Mota C.J.A., Silva C.X.A., Gonçalves V.L.C. (2009). Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Quim. Nova.** 32: 639-648.
- Nash T. (1953). The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction. **Biochem J.** 55: 416–421.
- Nelson D.L., Cox M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- Okonkwo C.C., Ujor V., Ezeji T.C. (2017). Investigation of relationship between 2,3-butanediol toxicity and production during growth of *Paenibacillus polymyxa*. **N Biotechnol.** 34: 23–31.
- Parate R., Mane R., Dharne M., Rode, C. (2018). Mixed bacterial culture mediated direct conversion of bio-glycerol to diols. **Bioresour Technol.** Accepted manuscript.
- Parpinello G.P., Versari A. (2000). A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Glucose, Glycerol, and Methanol in a Bioprocess. **J Chromatogr Sci.** 38: 250-261.

- Perego P., Converti A., Borghi A.D., Canepa P. (2000). 2,3-butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues. **Bioprocess Eng.** 23: 613-620.
- Perego P., Converti A., Del Borghi M. (2003). Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresour Technol.** 89: 125-131.
- Petrov K., Petrova P. (2009). High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. **Comptes Rendus de L'Académie Bulgare des Sciences.** 62: 233-242.
- Petrov K., Petrova P. (2010). Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. **Appl Microbiol Biotechnol.** 87: 943-949.
- Pirt S.J., Callow D.S. (1958). Exocellular product formation by microorganisms in continuous culture. I – Production of 2,3-butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a single stage process. **J Appl Bacteriol.** 21: 188-205.
- Placek V., Vacek K., Kas J., Demnerová K., Zidková J., Sajdok J. (2005). Application of ionising radiation for the stabilisation of *Trichoderma viride* cellulases. **Czech Journal of Food Sciences.** 23(3): 111-115.
- Plackett R.L., Burman J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika.**
- Pleskacova A., Brejchal S., Pacal L., Kankova K., Tomandil J. (2017). Simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human plasma and serum by HPLC–UV:uric acid metabolism tracking. **Chromatographia.** 80: 529–536.
- Pradima J., Kulkarni M. R. (2017). Review on enzymatic synthesis of value added products of glycerol, a by-product derived from biodiesel production. **Resource-Efficient Technologies.** Article in press.
- Priya A., Dureja P., Talukdar P., Rathi R., Lal B., Sarma P., 2016. Microbial production of 2,3-butanediol through a two-stage pH and agitation strategy in 150 l bioreactor. **Biochem Eng J.** 105, 159-167.
- Ramachandran K.B., Hashim M.A., Fernandez A.A. (1990). Kinetic study of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. **J Ferment Bioeng.** 70: 235-240.
- Rivaldi J. D., Sarroub B. F., Fiorilo R., Silva S. S. (2008). Glicerol de biodiesel. **Biociência & Desenvolvimento.** 37: 44-51.
- Rodriguez A., Wojtusik M., Ripoll V., Santos V. E., Garcia-Ochoa F. (2016) 1,3-propanediol production *Shimwellia blattae* ATCC 33430: operational conditions and kinetics in batch cultivations. **Bioresour Technol.** 200: 830-837.
- Romio T. (2014). Produção de 2,3-Butanodiol a partir de glicerol por klebsiellaoxytoca ATCC 8724. **Dissertação Mestrado.** Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Sablayrolles J.M., Goma G. (1983). Butanediol production by *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: Effects of initial substrate concentration and aeration agitation. **Biotechnol Bioeng.** 26: 148-155.
- Sabra W., Groeger C., Zeng A-P. (2015). Microbial cell factories for diol production. **Adv Biochem Eng Biotechnol.** 155: 165-197.
- Sanchez J. (1998). Colorimetric Assay of Alditols in Complex Biological Samples. **J Agric Food Chem.** 46: 157-160.
- Sarma S. J., Brar S. K., Bihan Y. L., Buelma G., Rabe L., Soccol C. R., Naceur M., Rachid B. (2013). Evaluation of different supplementary nutrients for enhanced biohydrogen

- production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B 407 using waste derived crude glycerol. **Int J Hydrogen Energy**. 38: 2191-2198.
- Sarma S. J., Dhillon G. S., Brar S. K., Bihan Y. L., Buelma G., Verma M. (2013) Investigation of the effect of different crude glycerol components on hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407. **Renew Energy**. 60: 566-571.
- Schmidell W., Lima A. U., Aquarone E., Borzani W. (2001). Agitação e aeração em biorreatores. **Biotecnologia Industrial**. Vol. 2 – Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blucher Ltda. pp. 277-308.
- Silva G.P., Lima C. J. B., Contiero J. (2015). Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. **Catalysis Today**. 257: 259-266.
- Silva G.P., Mack M., Contiero J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnol Adv**. 27: 30-39.
- Silveira M. M., Schmidell W., Berbert M. A. (1993). Effect of the air supply on the production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. **J Bacteriol**. 31: 93-102
- Silveira M., Berbert-Molina M.A., Prata A.M.R., Schmidell W. (1998). Production of 2,3-butanediol from sucrose by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199 in batch and fed-batch reactors. **Braz Arch Biol Technol**. 41: 329-334.
- Silveira M.M. (1991). Estudo cinético da fermentação butílica glicólica de sacarose por *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. **Tese de doutorado**. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Speckman R.A., Collins E.B. (1982). Colorimetric Determination of 2,3-Butanediol. **Anal Chem**. 54:1450-1452.
- Tan H.W., AbdulAziz A.R., Aroua M.K. (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: a review. **Renew Sustain Energy Rev**. 27: 118–127.
- Thompson J. C., He B. B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Appl Eng Agricul.** 22(2): 261-265.
- Tortora G. J., Funke B. R., Case, C. L. (2012). **Microbiologia**, 10 ed. Porto Alegre: Artmed. pp. 132-134.
- Umpierre A.P., Machado, F. (2012). Gliceroquímica e valorização do glicerol. **Rev Virtual Quím**. 5(1): 106-116.
- United States. National Institutes of Health – NIH. (2016). **National Guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules**. Disponível em: <<https://osp.od.nih.gov/biotechnology/nih-guidelines/>>. Acessado em: 26 fev 2018.
- Utile J-P., Boutron P. (1999). Separation of racemic from meso-2,3-butanediol. **Cryobiology**. 38:398–402.
- Valdez H.C., Amado R.S., Souza F.C., D’Elia E. (2012). Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica. **Quim Nova**. 35: 601-607.
- Valls-Cantenys C., Iglesias M., Todolí J.L., Salvadó V. (2012). Speciation of phosphorus oxoacids in natural and waste water samples. **J Chromatogr A**. 1231: 16– 21.
- Voloch M., Jansen N.B., Ladisch M.R., Tsao G. T., Narayan R., Rodwell V.W. (1985). 2,3-butanediol. **C Biotechnol**. Pergamon Press, 3: 933-947.
- Wang Y., Tao F., Xu P. (2014) Glycerol dehydrogenase plays a dual role in glycerol metabolism and 2,3-butanediol formation in *Klebsiella pneumoniae*. **J Biol Chem**. 289: 6080–6090.

- Wojtusik M., Rodríguez A., Ripoll V., Santos V. E., García J. L., García-Ochoa F. (2015). 1,3-Propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions. **Biotechnol Rep.** 6: 100-107.
- Wong C. L., Yen H. W., Lin C. L., Chang J. S. (2014). Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. **Bioresour Technol.** 152: 169-176.
- Worsfold P., McKelvie I., Monbet P. (2016). Determination of phosphorus in natural waters: a historical review. **Analytica Chimica Acta.** 918: 8-20.
- Yang T., Rao Z. M., Zhang X., Xu J., Xu Z. (2013). Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of co-substrates on 2,3-butanediol production. **Appl Microbiol Biotechnol.** 97: 7651–7658.
- Yen H.W., Li F.T., Chang J.S. (2014). The effects of dissolved oxygen level on the distribution of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol produced from glycerol by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. **Bioresour Technol.** 153: 374–378.
- Zeng A. P., Biebl H., Deckwer, W.D. (1990). Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. **Appl Microbiol Biotechnol.** 33: 485-489.
- Zeng A.P., Sabra W. (2011). Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. **Cur Opin Biotechnol.** 22: 749–757.