

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR
Klebsiella oxytoca ATCC 8724

Tiago Romio

Caxias do Sul

2014

Tiago Romio

**PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR
Klebsiella oxytoca ATCC 8724**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de
Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-orientadora: Prof. Dra. Eloane Malvessi

Caxias do Sul

2014

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

R765p Romio, Tiago, 1987-
Produção de 2,3-Butanodiol a partir de glicerol por klebsiella oxytoca
ATCC 8724 / Tiago Romio. - 2014.
62 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira ; Coorientadora:
Profª. Dra. Eloane Malvessi

1. Biocombustíveis. 2. Bactérias – Klebsiella oxytoca. 3. Fermentação.
I. Título.

CDU 2.ed.: 620.91

Índice para o catálogo sistemático:

1. Biocombustíveis	620.91
2. Bactérias – Klebsiella oxytoca	561.23
3. Fermentação	663.14/.16

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Carolina Machado Quadros – CRB 10/2236.

TIAGO ROMIO

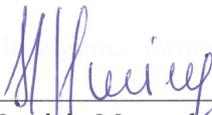
**PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLICEROL POR
Klebsiella oxytoca ATCC 8724**

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

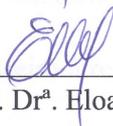
Orientador Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-orientadora Prof^a. Dr^a. Eloane Malvessi

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21 DE NOVEMBRO DE 2014.



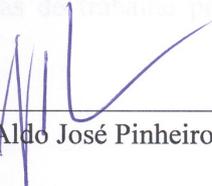
Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira



Prof^a. Dr^a. Eloane Malvessi



Prof^a. Dr^a. Marília Amorim Berbert de Molina



Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon



Dr^a. Fernanda Bettin

AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor Mauricio Moura da Silveira pela orientação do meu trabalho, grande dedicação sempre presente e pelos conhecimentos transmitidos.

À professora doutora Eloane Malvessi pela coorientação, revisão e sugestões de todos os trabalhos.

Aos professores doutor Aldo José Pinheiro Dillon e doutora Mirian Salvador, pela participação da banca de acompanhamento.

À acadêmica de Engenharia Química Caroline Hartmann pela imensa ajuda nos experimentos práticos, pelo apoio e dedicação.

Aos bolsistas Giovani Griggio, Franciele Viapiana e Letícia Oliboni que de alguma forma ajudaram nos experimentos.

À mestre Sabrina Carra por estar sempre disposta a resolver qualquer problema e pela ajuda na parte prática do trabalho.

À colega de mestrado Viviane Girardi pelo apoio, dicas e ajuda teórica e prática.

Aos colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Central Analítica do Instituto de Biotecnologia pelo apoio nas análises.

À PETROBRAS, pelo apoio financeiro à realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da taxa acadêmica.

À minha família, amigos e colegas de trabalho pelo apoio e amizade durante todo esse período.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
NOMENCLATURA.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Glicerol.....	3
2.2 2,3-butanodiol.....	5
2.3 Bactérias produtoras de 2,3-butanodiol	7
2.4 Bioquímica do metabolismo de glicerol por <i>Klebsiella oxytoca</i>	8
2.5 Condições operacionais de produção fermentativa de 2,3-butanodiol por <i>Klebsiella oxytoca</i>	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Microrganismo	15
3.2 Meios de cultura	15
3.3 Cultivos em frascos sob agitação.....	16
3.4 Cultivos em biorreator de bancada em regime descontínuo e em regime descontínuo alimentado.....	17
3.5 Métodos analíticos	19
3.5.1 Coleta e preparo das amostras	19
3.5.2 Concentração celular	20
3.5.3 Concentração de glicose	20
3.5.4 Concentração de glicerol	20
3.5.5 Concentração de produtos de fermentação	21
3.5.6 Oxigênio dissolvido	21
3.5.7 Frações molares de oxigênio e dióxido de carbono	21
3.6 Cálculos de parâmetros de avaliação	22
3.6.1 Velocidades médias e específicas	22
3.6.2 Fatores de conversão de substrato em células e em produtos.....	22
3.6.3 Produtividade volumétrica.....	23
3.6.4 Demanda de oxigênio e velocidade específica de respiração	24
3.6.5 Concentração de oxigênio na saturação	25
3.6.6 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	26
3.6.7 Velocidade característica de transferência de oxigênio	26
3.7 Ensaio realizados.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Avaliação do uso de glicerol como substrato para crescimento de <i>Klebsiella oxytoca</i> em comparação à glicose.....	28
4.2 Avaliação do controle do pH em agitador de bancada	30
4.3 Avaliação do efeito do suprimento de oxigênio sobre o processo	34
4.4 Avaliação do efeito da concentração inicial de glicerol sobre o processo em regime descontínuo	40
4.5 Avaliação do processo em regime descontínuo alimentado	50
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de resultados encontrados na literatura para a produção de 2,3-butanodiol por <i>Klebsiella oxytoca</i> sob diferentes fontes de carbono e estratégias de fermentação.....	14
Tabela 2. Condições iniciais dos cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> em regime descontínuo em agitador de bancada recíproco.....	27
Tabela 3. Condições iniciais dos cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> em meio contendo glicerol como fonte de carbono, em biorreator de bancada.....	27
Tabela 4. Resultados de cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> em meios contendo glicerol e glicose.....	28
Tabela 5. Resultados de cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> em meios contendo glicerol com e sem a adição de CaCO ₃	33
Tabela 6. Resultados de cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> em meios contendo glicerol.....	36
Tabela 7. Resultados de cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> em meios contendo diferentes concentrações de glicerol em agitador de bancada.....	42
Tabela 8. Resultados de cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> em meios contendo diferentes concentrações de glicerol em biorreator.....	45
Tabela 9. Fatores de conversão em 2,3-butanodiol e em etanol em cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> em meios contendo glicerol em regime descontínuo alimentado.....	52
Tabela 10. Resultados de cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> em meios contendo glicerol em regime descontínuo alimentado.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de produção do biodiesel utilizando NaOH como catalisador.....	4
Figura 2. Derivados de 2,3-butanodiol produzido por via fermentativa.....	6
Figura 3. Vias metabólicas para <i>Klebsiella oxytoca</i> a partir de glicerol.....	9
Figura 4. <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724. Coloração de Gram em microscopia óptica.	15
Figura 5. Agitador de bancada (Certomat U, B. Braun Biotech, Sartorius) utilizado nos ensaios em frascos agitados.....	17
Figura 6. Biorreator de bancada utilizado nos cultivos de regime descontínuo e regime descontínuo alimentado.....	18
Figura 7. Variação do pH e das concentrações de biomassa celular, glicerol e glicose em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> nos Ensaios 03 (A) e 04 (B).....	29
Figura 8. Variação do pH e das concentrações de biomassa celular e glicerol em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> nos Ensaios 05, com pH não controlado (A), e 06, com pH controlado com CaCO ₃ (B).....	32
Figura 9. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> nos Ensaios 07 (A), 08 (B) e 09 (C).....	35
Figura 10. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> nos Ensaios 15 (A), 16 (B), 17 (C), 18 (D), 19 (E), 20 (F) e 21 (G).....	44
Figura 11. Variação da velocidade específica de crescimento e velocidade específica de respiração em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> nos Ensaios 15, 16, 17, 18, 19 e 20.....	49
Figura 12. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol, oxigênio dissolvido e produtos em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> no Ensaio 22.....	51
Figura 13. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol, oxigênio dissolvido e produtos em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> no Ensaio 23.....	51

NOMENCLATURA

- K_{La} – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.
- m_o – coeficiente de manutenção para o oxigênio.
- M_{Xf} – massa final de células.
- M_{X0} – massa inicial de células.
- $M_{S1\ cons}$ – massa de substrato consumida.
- M_{Pf} – massa final de produto.
- M_{P0} – massa inicial de produto.
- OD – concentração de oxigênio dissolvido.
- OD^* – concentração de oxigênio na saturação.
- OUR – demanda de oxigênio pelo cultivo.
- OTR – velocidade característica de transferência de oxigênio.
- P_f – concentração final de produto.
- P_0 – concentração inicial de produto.
- $p_{v\ but}$ – produtividade volumétrica em 2,3-butanodiol.
- $p_{v\ et}$ – produtividade volumétrica em etanol.
- Q_{O2} – velocidade específica de respiração.
- S_a – concentração de substrato alimentado.
- S_f – concentração final de glicerol.
- S_0 – concentração inicial de glicerol.
- t – tempo.
- t_a – tempo da alimentação em ensaios em regime descontínuo alimentado.
- t_{OD} – tempo em que o oxigênio atingiu a concentração nula.
- V_a – volume de alimentação em ensaios em regime descontínuo alimentado.
- X_0 – concentração celular inicial.
- X_f – concentração celular final.
- Y_{GO} – fator real de conversão de oxigênio em células.
- $Y_{P/S\ but}$ – fator de conversão de substrato em 2,3-butanodiol / acetoina.

$Y_{P/S \text{ et}}$ – fator de conversão de substrato em etanol.

$Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células.

$\Delta X/\Delta t$ – velocidade média de formação de biomassa.

$\Delta S/\Delta t$ – velocidade média de consumo de glicerol.

μ_x – velocidade específica de crescimento.

μ_s – velocidade específica de consumo de glicerol.

$\mu_{x \text{ max}}$ – máxima velocidade específica de crescimento.

ρ_{but} – rendimento em 2,3-butanodiol / acetoína.

ρ_{et} – rendimento em etanol.

RESUMO

Glicerol é um álcool gerado na produção de biodiesel, que corresponde 10% em relação ao biocombustível. Devido à crescente produção de biodiesel, pode ser utilizado como substrato para a obtenção de outros compostos, como o 2,3-butanodiol, através de vias fermentativas. Esta substância, que tem potencial de aplicação industrial e como combustível, pode ser obtida pela fermentação de glicerol pela bactéria anaeróbia facultativa *Klebsiella oxytoca*. Neste trabalho foram avaliados parâmetros e condições operacionais para o cultivo de *K. oxytoca* ATCC 8724, visando à obtenção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol. Em razão do equilíbrio observado entre 2,3-butanodiol e acetoína, em proporção significativamente maior para o primeiro, no metabolismo fermentativo de *K. oxytoca*, a discussão dos resultados deste trabalho levam em conta a soma das concentrações destes compostos. Os resultados indicaram que este microrganismo metaboliza eficientemente o glicerol, visto que a velocidade média de crescimento celular neste substrato, em 8 horas de cultivo em frascos sob agitação, foi de 0,44 g/L/h, superior à obtida com glicose (0,38 g/L/h) nas mesmas condições. Observou-se que para substratos sacaríneos, que o metabolismo microbiano pode ser dividido em duas fases: na primeira fase, sem limitação de oxigênio, ocorre acentuado crescimento celular, em razão da prevalência da respiração, que resulta em substancial ganho energético para o microrganismo, enquanto na segunda fase, com limitação de oxigênio dissolvido, o fluxo de carbono é cada vez mais dirigido à formação de produtos de fermentação. Assim, em ensaios em regime descontínuo conduzidos em biorreator de bancada, o uso de uma velocidade característica de transferência de oxigênio (OTR) intermediária, da ordem de 17 mmol/L/h, proporcionou resultados superiores em termos de produção de 2,3-butanodiol, com conversão de 60 g/L de glicerol em 17,3 g/L do produto. Em regime descontínuo, a mais alta conversão de glicerol em produto foi alcançada com concentração inicial de substrato de 129 g/L, sendo produzidos, em 48 horas, 53,6 g/L de 2,3-butanodiol, o que significa um rendimento superior a 83% em relação ao máximo teórico. Com concentrações iniciais de glicerol de até 60 g/L, não foi constatado efeito inibitório sobre o crescimento celular. Por outro lado, o uso de 160 g/L de glicerol inicial levou a uma drástica redução do rendimento do processo (apenas 56,3%) e a uma concentração residual de substrato de 98 g/L, após 72 de cultivo. Com a condução do processo em regime descontínuo alimentado, como alternativa para contornar os efeitos de inibição pelo substrato, resultados expressivos foram alcançados com a massa de glicerol equivalente à que seria necessária para ter-se 202 g/L em regime descontínuo. Nestas condições, 92,1 g/L de 2,3-butanodiol e rendimento de 92,6%, foram alcançados, em 84 horas de fermentação. Os resultados revelam, o grande potencial de uso de glicerol como substrato para a produção de 2,3-butanodiol em escala industrial.

Palavras-chave: *Klebsiella oxytoca*, 2,3-butanodiol, glicerol, regime descontínuo, regime descontínuo alimentado.

ABSTRACT

Glycerol is a by-product of biodiesel production, which accounts for approximately 10% of the biofuel. Since a large volume of it is formed in industry, glycerol could be used as a substrate to obtain other compounds, such as 2,3-butanediol, through fermentative routes. This substance, which has potential for application in industry and as fuel, can be obtained by glycerol fermentation with the facultative anaerobe bacterium *Klebsiella oxytoca*. In this work, parameters and operational conditions for the cultivation of *K. oxytoca* ATCC 8724, envisaging 2,3-butanediol production from glycerol, were assessed. Due to the equilibrium between 2,3-butanediol and acetoin, in a significantly higher proportion for the first product, in the fermentative metabolism of *K. oxytoca*, the discussion of this work takes in account the sum of concentrations of these compounds. The results have shown that the microorganism is able to efficiently metabolize glycerol once cell growth rate on this substrate, after 8 hours of cultivation in shake flasks, was 0.44 g/L/h, higher than that obtained with glucose (0.38 g/L/h) under the same conditions. As previously described for saccharides, it was observed that the microbial metabolism can be divided into two phases: in the first phase, without limitation of oxygen, an intense cell growth occurs due to the prevalence of respiration, that results in a substantial gain of energy for the microorganism, whereas in the second phase, under oxygen limitation, most of carbon flux is driven to the formation of fermentation products. Thus, in batch runs carried out in a bench bioreactor, the use of an intermediate characteristic oxygen transfer rate (OTR) of about 17 mmol/L/h, led to superior results in terms of 2,3-butanediol production, with conversion of 60 g/L of glycerol to 17.3 g/L of product. In batch mode, the highest conversion of glycerol to product was achieved with 129 g/L of initial substrate concentration, with the production of 53.6 g/L 2,3-butanediol, in 48 hours, which means a yield of 83% in relation to the theoretical maximum. With initial glycerol concentrations up to 60 g/L, no inhibitory effect on cell growth was observed. On the other hand, the use of 160 g/L of glycerol led to a drastic decrease in the process yield to 56.3% and to a residual concentration of substrate of 98 g/L after 72 h of cultivation. By carrying out the process in fed-batch mode, as an alternative to overcome the substrate inhibitory effects, remarkable results have been attained with the mass of glycerol that would be needed to have an initial concentration of 202 g/L in batch mode. Under these conditions, a final concentration of 92.1 g/L of 2,3-butanediol, corresponding to a yield of 92.6%, was achieved after 84 hours of fermentation. The results show clearly the high potential of the use of glycerol as a substrate for 2,3-butanediol production in industrial scale.

Keywords: *Klebsiella oxytoca*, 2,3-butanediol, glycerol, batch mode, fed-batch mode.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e as atividades humanas demandam o uso de grande quantidade de energia. Para suprir as necessidades atuais da população, têm sido utilizados, principalmente, os combustíveis fósseis oriundos do petróleo; porém, como resultado da sua combustão, há a emissão de grandes quantidades de poluentes gasosos, o que torna os impactos ambientais crescentes.

Em vista desta preocupação ambiental e da alta demanda por combustíveis líquidos, a busca de alternativas para a produção de energia, envolvendo processos sustentáveis para reduzir a poluição ambiental e o aquecimento global, tem estimulado o mercado mundial dos biocombustíveis.

Nos últimos anos, houve, no Brasil, um substancial aumento na produção de biodiesel, como alternativa para reduzir a dependência do óleo diesel derivado do petróleo. Este biocombustível é produzido a partir de matérias-primas renováveis, como óleos vegetais e gordura animal, apresentando demanda crescente. A Agência Nacional do Petróleo estimou, no ano de 2013, uma produção de biodiesel da ordem de 2,9 milhões de litros, sendo o estado do Rio Grande do Sul responsável por cerca de 30% do volume total produzido. Atualmente, existem 92 usinas de biodiesel funcionando ou em construção no País, sendo onze delas no Rio Grande do Sul (Agência Nacional do Petróleo, 2014).

No processo industrial de síntese de biodiesel, há a geração de cerca de 10% de glicerol como subproduto, um composto que em geral é queimado para a geração de energia calorífica em unidades industriais, em razão do seu baixo grau de pureza. Assim, a disposição deste resíduo se torna um problema, necessitando que se busquem alternativas para o seu aproveitamento. Como matéria-prima abundante e de baixo custo, tem potencial de utilização no desenvolvimento de processos de obtenção de produtos com maior valor agregado, destacando-se, no caso, o seu uso como fonte de carbono em vários processos biotecnológicos.

O glicerol oriundo das indústrias de biodiesel pode servir como substrato energético em processos fermentativos de produção de 2,3-butanodiol, etanol, 1,3-propanodiol e hidrogênio, entre outros compostos, para as indústrias de combustíveis e química. Com isto, entende-se a importância de estudar vias de formação destes produtos, de forma que o glicerol passe a ser uma matéria-prima relevante na geração de

compostos de importância industrial. Pode-se destacar, ainda, que o estado do Rio Grande do Sul poderia ter no glicerol uma solução, ao menos parcial, para a sua carência de substratos açucarados e, com isto, aumentar a sua capacidade de gerar produtos de base biotecnológica em larga escala.

Na literatura, destaca-se o uso de microrganismos anaeróbios facultativos, como *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella oxytoca*, para a formação dos compostos químicos citados a partir de substratos como glicose, sacarose e xilose. Há, no entanto, relativamente poucos estudos sobre o uso do glicerol neste tipo de processo.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar parâmetros e condições operacionais para o cultivo de *K. oxytoca* ATCC 8724, visando à obtenção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol, estabelecendo-se os seguintes objetivos específicos:

- avaliar o uso do glicerol comercial como fonte de carbono para o crescimento de *K. oxytoca* em comparação à glicose;
- definir condições de suprimento de oxigênio que levem aos melhores resultados em termos de crescimento celular e formação de produtos de fermentação;
- estabelecer os efeitos da concentração de glicerol comercial sobre o crescimento e formação de produtos de fermentação;
- comparar a condução do processo em regimes descontínuo e descontínuo alimentado visando obter elevadas concentrações de 2,3-butanodiol a partir de glicerol comercial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Glicerol

Glicerol é um composto orgânico, também conhecido como glicerina, 1,2,3-propanotriol, 1,2,3-trihidroxipropano, glicil-álcool ou gliceril, presente em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão) e animais (Lages & Lucas, 1997; Mota *et al.*, 2009). Apresenta massa molar de 92,09 g/mol e densidade de 1,262 kg/m³, a 25°C, sendo caracterizado como um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico, solúvel em água e álcool e insolúvel em éter e clorofórmio (Wang *et al.*, 2001; Arruda *et al.*, 2007).

Este composto tem aplicações nas indústrias de cosméticos, de tintas, automotiva, de alimentos, farmacêutica, de papel, têxtil e de couro. A maior demanda se dá em produtos de higiene pessoal e alimentos, correspondendo a 64% da total (Wang *et al.*, 2001; Dharmadi *et al.*, 2006; Mota *et al.*, 2009).

O glicerol é, atualmente, um dos componentes mais utilizados na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e antissépticos. Por ser não-tóxico, não-irritante, sem cheiro e sem sabor, o glicerol tem sido aplicado como emoliente e umectante em pastas de dente, cremes de pele, loções pós-barba, desodorantes e produtos de maquiagem. Também tem sido empregado no processamento de tabaco, a fim de tornar as fibras do fumo mais resistentes e evitar quebras, sendo, ainda, empregado na composição dos filtros de cigarros e como veículo de aromas (Umpierre & Machado, 2013).

O glicerol pode ser usado como conservante de bebidas e alimentos, tais como refrigerantes, balas, bolos, pastas de queijo e carne, e ração animal seca. Na indústria de alimentos, é usado no preparo de molhos e sobremesas geladas e como umectante. Todas estas aplicações utilizam, hoje, principalmente sorbitol, sendo possível que o glicerol venha a tomar parte dos mercados deste composto (Apolinário *et al.*, 2012; Vasconcelos, 2012).

Entre outras aplicações do glicerol, podem-se citar o seu uso no aumento da maciez e flexibilidade de fibras têxteis, como lubrificante de máquinas processadoras de alimentos e na fabricação de dinamite (Apolinário *et al.*, 2012, Vasconcelos, 2012).

Na produção do biodiesel, há a formação de glicerol durante o processo. O biodiesel é um combustível biodegradável de fontes renováveis, como óleos vegetais e gordura animal, que, em presença de um catalisador, reage quimicamente com álcoois etílico ou metílico. Na reação química, o óleo vegetal, triacilglicerol, ou seja, o tri éster derivado de glicerol, pela ação de um catalisador alcalino, ou mesmo ácido, e na presença de metanol ou etanol, sofre uma reação de transesterificação, formando as moléculas de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos (biodiesel) e glicerol, que compõe 10% do produto final (Meher *et al.*, 2006; Sakai & Yagishita, 2007; Amaral *et al.*, 2009). A reação global de transesterificação é mostrada na Figura 1.

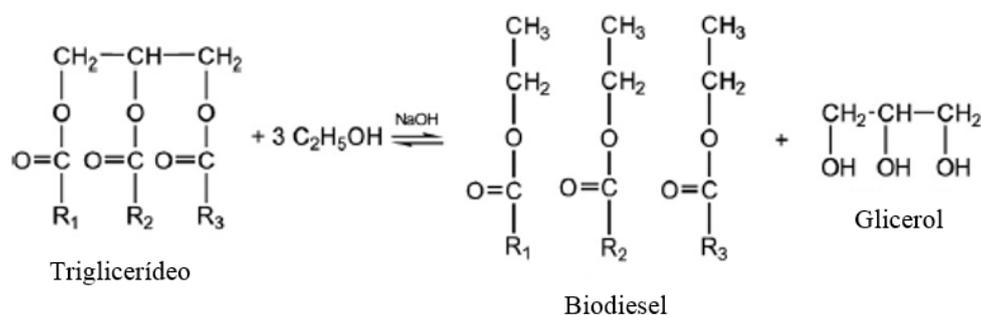


Figura 1. Reação de produção do biodiesel utilizando NaOH como catalisador (Adaptado de Amaral *et al.*, 2009).

No Brasil, assim como no resto do mundo, tem havido um grande aumento na produção de biodiesel. Isto se deve ao fato de o biodiesel ser produzido a partir matérias-primas renováveis e relativamente de baixo custo. Na escolha das oleaginosas usadas na produção do biodiesel, devem ser avaliados aspectos como a potencialidade técnica e seus efeitos secundários, o aproveitamento dos seus subprodutos e as características de regionalização, sazonalidade e escala periódica. Entre os óleos vegetais usados no processo, destaca-se o de soja, que foi aplicado em 71% da produção de biodiesel, em 2013, tendo sido utilizados, também, os óleos de dendê, babaçu, girassol, mamona e amendoim. No Rio Grande do Sul, a canola se mostra promissora, pois apresenta 38% de teor máximo de óleo, superior aos 18% normalmente obtidos com a soja (Biodiesel Brasil, 2014).

Vale destacar ainda que, em 2004, o Brasil criou o Plano Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, com o objetivo de regradar a adição do biocombustível ao óleo diesel

utilizado no País, e, com isso, consolidou-se como o segundo maior produtor de biodiesel (Biodiesel Brasil, 2014).

Aliado à grande quantidade formada no processo de produção de biodiesel, o glicerol gerado é caracterizado como impuro e de baixo valor econômico, apresentando, ainda, água, sais, ésteres, álcoois e óleo residual. Para a utilização na indústria, o glicerol residual necessita ser purificado por filtração, destilação a vácuo, descoloração ou troca iônica, o que torna o seu uso pouco rentável (Ooi *et al.*, 2004; Alves & Abreu, 2006; Neves, 2009; Rossi *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2012).

Como alternativa, o glicerol residual pode ser utilizado como fonte de carbono em processos fermentativos industriais. Por ser componente estrutural de muitos lipídios, os microrganismos podem utilizá-lo como fonte de carbono em substituição a carboidratos como sacarose, glicose e amido, para a formação de metabólitos por via biológica, como o hidrogênio, etanol e 2,3-butanodiol (Demirbas & Balat, 2006; Mota *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2012). Bactérias e leveduras, em condições aeróbias e anaeróbias, podem obter energia metabólica a partir do glicerol (Dillis *et al.*, 1980; Rossi *et al.*, 2012).

Para microrganismos como *Klebsiella oxytoca*, grande parte do glicerol é convertido em 2,3-butanodiol na sua via metabólica, apresentando grandes aplicações para a indústria, como é discutido a seguir (Almeida *et al.*, 2012).

2.2 2,3-Butanodiol

O interesse por 2,3-butanodiol começou na década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial. Nesta época, houve escassez da matéria-prima para a produção de borracha devido à crise do petróleo e, por isso, os Estados Unidos e o Canadá desenvolveram uma planta-piloto com o objetivo de transformar 2,3-butanodiol em 1,3-butadieno, intermediário na produção da borracha sintética. Com o fim da guerra e a consequente reabertura das vias comerciais, o processo foi perdendo gradativamente o interesse dos setores envolvidos no programa. A viabilidade econômica da produção fermentativa se perdeu por completo com o desenvolvimento de rotas químicas para a produção de 1,3-butadieno a partir de derivados do petróleo. Hoje, 2,3-butanodiol é utilizado em outros processos, sendo, ainda, estudado por apresentar potencial de se tornar uma eventual alternativa ao petróleo. Adicionalmente, prevalece um interesse em continuar avaliando a sua produção fermentativa, o que permite contribuir com as

questões ambientais, minimizando o uso de combustíveis não renováveis (Silveira, 1991; Berbert-Molina, 1995).

O 2,3-butanodiol é conhecido como 2,3-butileno-glicol, dimetiletileno-glicol ou butano-2,3-diol (nomenclatura IUPAC), com um peso molecular de 90,121 g/mol, e fórmula molecular $C_4H_{10}O_2$. É um composto que apresenta a característica de ser biodegradável, tornando-se favorável ao ambiente. Seu calor de combustão de 27200 kJ/kg se compara ao do etanol (29100 kJ/kg) e do metanol (22100 kJ/kg) (Garg & Jain, 1994; Celinska & Grajek, 2009). Além disto, apresenta um alto ponto de ebulição (180°C) e baixo ponto de congelamento (-60°C), podendo ser utilizado como anticongelante (Converti & Perego, 2002).

A produção de 2,3-butanodiol ocorre a partir de processos fermentativos, podendo, a partir dele, sintetizarem-se compostos químicos, como os exemplificados na Figura 2 (Garg & Jain, 1994).

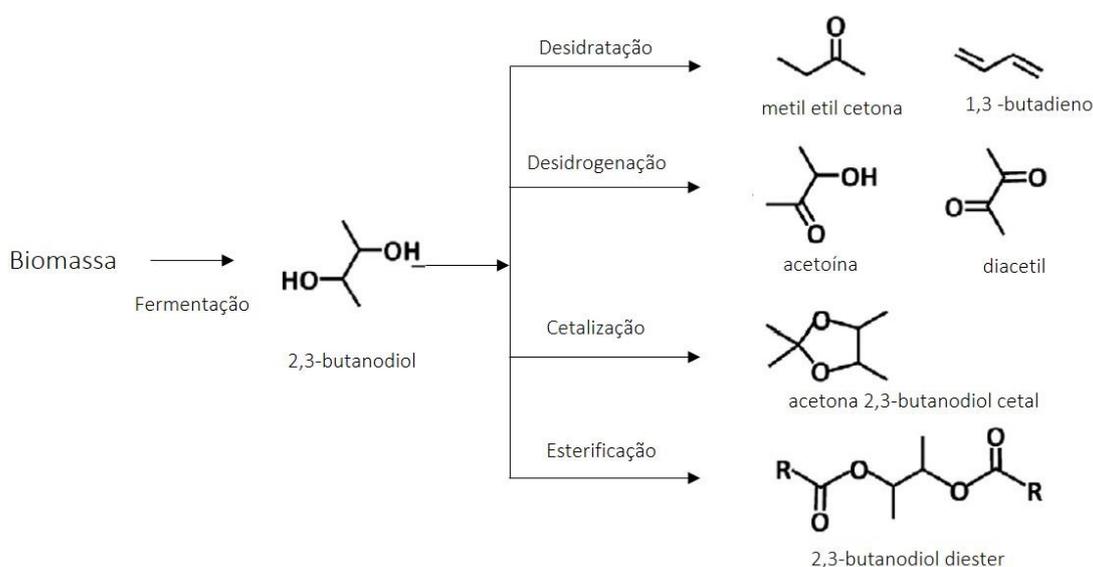


Figura 2. Derivados de 2,3-butanodiol produzido por via fermentativa (Adaptado de Garg & Jain, 1994).

O processo de desidratação do 2,3-butanodiol leva à geração de metil-etil-cetona, que apresenta importância como combustível para a aviação. Outro produto que pode ser formado é o 1,3-butadieno, obtido geralmente de petróleo, que é empregado na produção da borracha sintética. O 1,3-butadieno é utilizado na produção de eletrodomésticos, calçados, plásticos, modificadores de asfalto, aditivos para óleos lubrificantes, tubos, componentes de construção e látex. Este produto tem sofrido

escassez de oferta nas Américas, sendo importante que venha a ser produzido por outras fontes (Garg & Jain, 1994).

A acetoina, produzida por desidrogenação do 2,3-butanodiol, pode ser utilizada como aromatizante na indústria de alimentos. Da mesma forma, o diacetil é um importante produto para manter o aroma de queijos, manteigas e cremes fermentados na indústria alimentícia (Garg & Jain, 1994).

Por cetalização, o composto formado – acetona 2,3-butanodiol cetal, é misturado com a gasolina, sendo uma alternativa ao uso do petróleo, devido ao seu alto poder calorífico. A esterificação de 2,3-butanodiol atua na formação de precursores de poliuretanos para drogas, loções e cosméticos e apresenta propriedades antissépticas. 2,3-butanodiol diester pode também ser efetivo para polímeros termoplásticos, como nitrato de celulose, triacetato de celulose, éster polivinil, polimetilacrilatos, entre outros (Garg & Jain, 1994).

Apesar do grande potencial do 2,3-butanodiol para uso industrial, a dificuldade na separação deste produto do meio de cultivo, devido ao seu alto ponto de ebulição e à sua afinidade com a água, apresenta-se como um aspecto negativo. No caso, para a separação do 2,3-butanodiol do meio, podem ser empregadas diferentes técnicas como destilação e osmose reversa, entre outras. Assim, são necessárias elevadas concentrações finais de produto nos processos fermentativos para que o processo se torne viável, visto o elevado custo da etapa de recuperação (Ji *et al.*, 2011).

2.3 Bactérias produtoras de 2,3 butanodiol

Bactérias pertencentes a diferentes gêneros são referidas na literatura especializada como produtoras de 2,3-butanodiol, com destaque para *Klebsiella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Escherichia* (Kapdan *et al.*, 2006; Xiu *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2011). Entretanto, os trabalhos em que os melhores resultados para o processo são descritos foram realizados com a espécie *K. oxytoca* que recebeu denominações distintas ao longo do tempo.

A espécie bacteriana utilizada neste trabalho foi anteriormente referida como *Aerobacter aerogenes* (Sablayrolles & Goma, 1983), *K. oxytoca* (Jansen *et al.*, 1983) e, ainda, *Klebsiella pneumoniae* (Berbert-Molina, 1995), embora não apresentasse características de patogenicidade. Posteriormente, estudos de Biologia Molecular mostraram diferenças significativas entre *K. pneumoniae* e as linhagens agora

classificadas como *K. oxytoca*, passando esta última denominação a vigorar nos trabalhos mais recentes (Brisse *et al.*, 2006).

K. oxytoca é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, sem capacidade de esporulação, apresentando-se na forma de bastonete, com dimensões de 0,6 a 6,0 µm de comprimento e entre 0,3 e 1,5 µm de diâmetro.

Os primeiros estudos deste microrganismo datam de 1906, por apresentar grande capacidade de produzir por via bioquímica, 2,3-butanodiol (Garg & Jain, 1994). Durante o processo fermentativo, *K. oxytoca*, independentemente do substrato, excreta 2,3-butanodiol, etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido lático e ácido succínico, além de gás carbônico e hidrogênio (Brisse *et al.*, 2006).

Melhores rendimentos em 2,3-butanodiol, em escala industrial, são relatados em cultivos de *K. oxytoca* em regimes descontínuo e descontínuo alimentado, podendo alcançar entre 80 e 90% de rendimento final em produto. Como vantagens, *K. oxytoca* apresenta um crescimento rápido em meios de cultivo simples e apresenta grande potencial biotecnológico (Garg & Jain, 1994; Park *et al.*, 2013).

K. oxytoca produz metabólitos de interesse industrial a partir de diversos substratos, como lactose (Ramachandran *et al.*, 1990), glicose (Wong *et al.*, 2014), xilose (Ji *et al.*, 2009), sacarose (Silveira, 1991) e glicerol (Cheng *et al.*, 2013), entre outros.

2.4 Bioquímica do metabolismo de glicerol por *Klebsiella oxytoca*

O metabolismo de *K. oxytoca* é classificado em oito diferentes subsistemas bioquímicos, compreendendo: metabolismo energético, aminoácidos, carboidratos, co-fatores, vitaminas, nucleotídeos, lipídios e transportadores, sendo que o metabolismo de aminoácidos, co-fatores, vitaminas e carboidratos compreendem mais da metade das reações químicas presentes (Park *et al.*, 2013).

Considerando a oxidação da glicose por *K. oxytoca*, há a geração de duas moléculas de piruvato, formando uma molécula de 2,3-butanodiol em via anaeróbia. As vias metabólicas de oxidação de glicerol são semelhantes às de glicose quando utilizado como fonte de carbono, como relatado por Hawkes *et al.* (2007) e Wang & Wan (2009).

Na Figura 3 estão representadas as vias bioquímicas quando o glicerol é metabolizado por *K. oxytoca*. Primeiramente, o glicerol atravessa a membrana citoplasmática do microrganismo por transporte passivo. Este pode ser metabolizado

através das vias metabólicas de *K. oxytoca*, gerando equivalentes redutores ($\text{NADH}+\text{H}^+$). Entretanto, a oxidação do glicerol apresenta maior poder de redução que a glicose, em razão da proporção de oito átomos de hidrogênio para três de carbono, que na glicose é de doze para seis (Amaral *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Mendes, 2011).

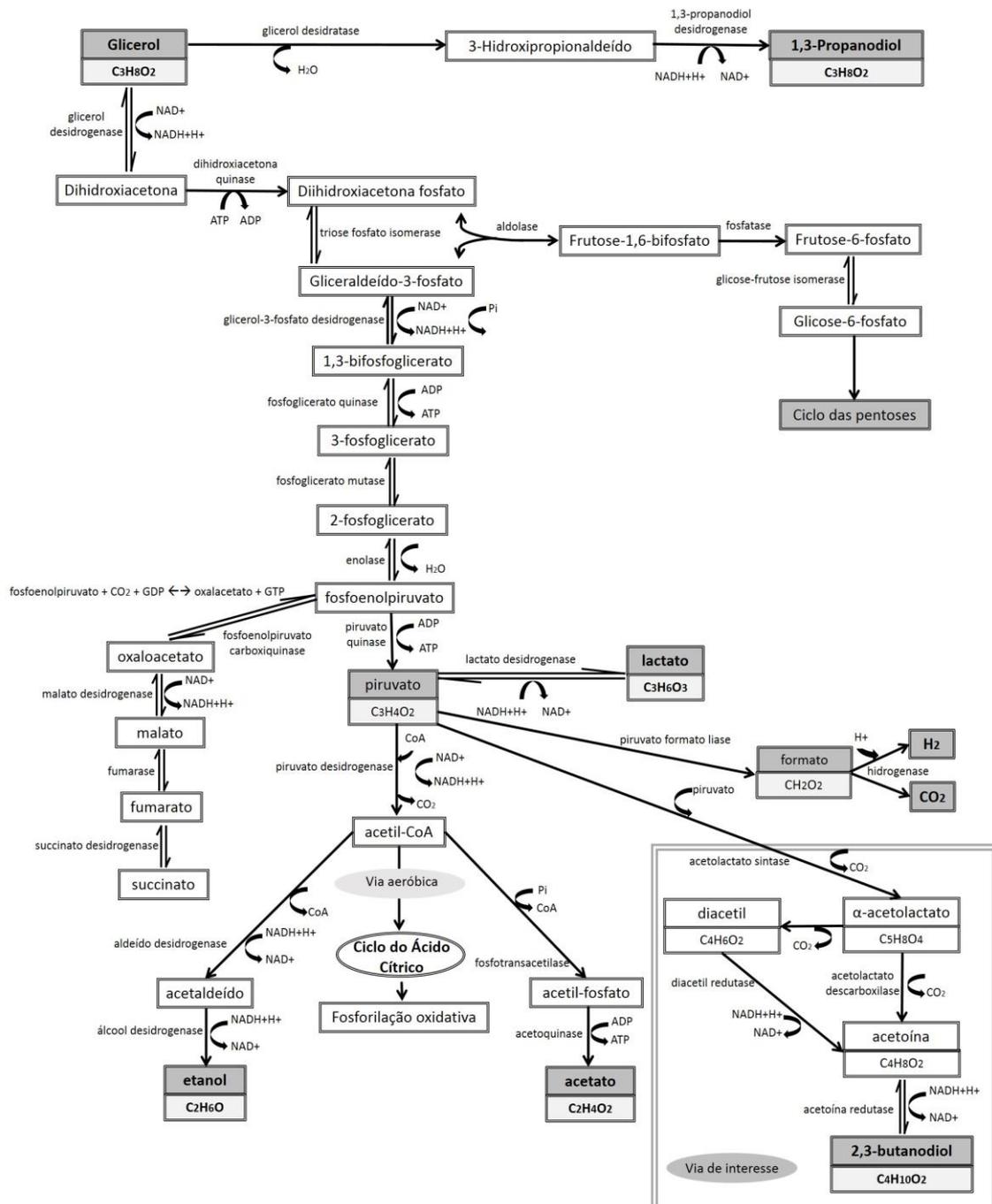


Figura 3. Vias metabólicas para *Klebsiella oxytoca* a partir de glicerol (Adaptado de Amaral *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Mendes, 2011).

Por ser um microrganismo anaeróbico facultativo, *K. oxytoca* apresenta duas grandes vias. Em aerobiose, o glicerol é oxidado a piruvato, que é transformado em acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico com a ocorrência de fosforilação oxidativa para a geração de ATP e produção de biomassa. Estas vias são altamente energéticas e ativadas quando há presença de oxigênio no meio, proporcionando intenso crescimento celular. Para a formação de ATP, o acetil-CoA também pode ser convertido em acetato (Zhang *et al.*, 2009).

Quando ocorre limitação da concentração de oxigênio, outras vias são ativadas para a geração de energia e manutenção celular, a partir de $\text{NADH}+\text{H}^+$ e NAD^+ . Estes são importantes reguladores de processos enzimáticos a partir de reações de oxirredução, alterando a formação dos produtos. Durante o crescimento celular, a concentração de $\text{NADH}+\text{H}^+$ aumenta, devido às vias de obtenção de ATP. Na fase de manutenção, os compostos que foram reduzidos são oxidados, gerando produtos a fim de obter energia (Zhang *et al.*, 2009).

Durante a anaerobiose ou sob limitação de oxigênio, as vias de produção de 1,3-propanodiol, lactato, formato, hidrogênio, etanol e 2,3-butanodiol são ativadas, podendo ser ativadas ou inativadas conforme a necessidade de regeneração de $\text{NADH}+\text{H}^+$, dependentes, ainda, do pH do meio.

A via de produção de 1,3-propanodiol depende da ação de duas enzimas em pH neutro, glicerol desidratase e 1,3-propanodiol desidrogenase, com limitação de ferro e presença da vitamina B12 (Girbal *et al.*, 1995; Girbal & Soucaille, 1998; Amaral *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Mendes, 2011). Entretanto, a via do lactato ocorre em pH neutro com pouca regeneração de $\text{NADH}+\text{H}^+$.

O hidrogênio é produzido pela oxidação do piruvato em formato e ação da enzima hidrogenase com liberação de gás carbônico e hidrogênio. Esta enzima age na presença de ferro, sendo extremamente sensível ao oxigênio, em pH 7,0 (Amaral *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Mendes, 2011). As reações de produção de hidrogênio não são favoráveis quando as vias de produção de 2,3-butanodiol e etanol são ativadas (Wu *et al.*, 2008).

A produção de etanol é uma via pouco rentável para a célula, visto que é resultado da produção de acetil-CoA a partir de piruvato, para depois ser convertido a etanol a partir de aldeído desidrogenase e álcool desidrogenase, sendo o pH neutro como faixa ideal (Wu *et al.*, 2008).

Em contra partida, a via mais comum e a de interesse é a que produz 2,3-butanodiol a partir de duas moléculas de piruvato. O microrganismo produz a acetolactato sintase (E.C.2.2.1.6), acetolactato descarboxilase (E.C.4.1.1.5) e acetoína redutase (E.C.1.1.1.4). É uma reação espontânea que converte duas moléculas de piruvato em α -acetolactato, em reação de descarboxilação, seguida da formação de diacetil ou de acetoína com eliminação de mais uma molécula de CO₂. Diacetil pode ser convertido em acetoína pela ação da diacetil redutase (E.C.1.1.1.303). A partir de acetoína, 2,3-butanodiol é formado pela oxidação de NADH+H⁺ pela enzima acetoína redutase. Independentemente do modelo cinético adotado, a conversão de acetoína em 2,3-butanodiol é uma reação reversível. O piruvato é a chave mais importante para esta via, que acontece com pH em torno de 5 e 6, e que pode ser regulada inibindo a enzima piruvato desidrogenase e ativando acetolactato sintase (Park *et al.*, 2013).

2.5 Condições operacionais de produção fermentativa de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca*

K. oxytoca apresenta grande potencial na conversão de glicerol em produtos de interesse industrial (Cheng *et al.*, 2013). Para a obtenção de altos rendimentos em 2,3-butanodiol é necessária a avaliação de alguns parâmetros operacionais que influenciam o processo fermentativo, tais como oxigênio dissolvido, pH, temperatura, concentrações de substrato e de produto e regime de operação utilizado (Kim *et al.*, 2013).

O pH é um parâmetro fundamental na regulação do metabolismo microbiano, afetando a produção de biomassa e as vias metabólicas. Pode-se considerar que as condições alcalinas são favoráveis para a formação de ácidos orgânicos e as condições ácidas estimulam a produção de 2,3-butanodiol. A faixa de pH ideal varia conforme o substrato utilizado, com valores variando entre 5 e 6. Nesta faixa, a enzima acetolactato descarboxilase, que descarboxiliza o α -acetolactato em acetoína, atua no seu pH ótimo e controla a fermentação (Kim *et al.*, 2013). Em vista disto, condições mais ácidas, com pH abaixo de 4, tornam a produção de 2,3-butanodiol desfavorável. Em condições extremas, com pH acima de 8 e abaixo de 4, a atividade de uma ou mais enzimas é reduzida e outras alternativas são utilizadas pelo microrganismo para a obtenção de energia. pH ácido inibe o crescimento, prejudicando, em decorrência, o processo fermentativo global. Perego *et al.* (2000) avaliaram faixas de pH de 4 a 8 em cultivos de *Enterobacter aerogenes*, bactéria com comportamento bioquímico semelhante ao de *K.*

oxytoca, destacando que o pH favorável para o crescimento microbiano foi observado entre 5,5 e 6,0. Variação do pH fora desta faixa modificou o sítio ativo da enzima. Deste modo, durante o cultivo, é indicado o monitoramento do pH, visto que a produção de 2,3-butanodiol ocorre, preferencialmente, em pH 5,5, e o crescimento celular, durante a fase exponencial, leva à acidificação do meio para valores inferiores ao que favoreceria a formação do produto.

O suprimento de oxigênio afeta diretamente a formação de 2,3-butanodiol, pois este produto é formado sob limitação de oxigênio, decrescendo com o aumento da aeração do meio. Durante a fase exponencial de crescimento celular, ocorre o maior consumo de oxigênio e, dependendo da intensidade do suprimento deste gás, a concentração de oxigênio dissolvido atinge valor nulo. A partir deste ponto, a relação entre a concentração de biomassa e o tempo se torna linear e, devido à limitação de oxigênio, que influencia na produção de energia pela fosforilação oxidativa, *K. oxytoca* inicia o processo fermentativo para a regeneração de ATP, intensificando a produção de 2,3-butanodiol. Deste modo, se o suprimento de oxigênio for excessivo, a fase aeróbia se prolongará e, com a limitação desta fase, formação de produtos será minimizada (Garg & Jain, 1994; Park *et al.*, 2013).

A temperatura afeta diretamente o crescimento celular, podendo prejudicar a formação de biomassa. De acordo com a literatura especializada, a faixa de 30 a 38°C é considerada como favorável para o crescimento e a produção de 2,3-butanodiol por *K. oxytoca* (Anvari & Motlagh, 2011). Segundo Perego *et al.* (2000), a temperatura tem relação com a atividade das enzimas nos processos bioquímicos, da mesma forma que o pH.

Concentrações de substrato elevadas apresentam efeito negativo sobre o crescimento celular de *K. oxytoca* (Anvari & Motlagh, 2011). Silveira *et al.* (1998) relataram que concentrações superiores a 95 g/L de sacarose provocaram efeito inibitório no crescimento celular de *K. pneumoniae* em cultivos em regime descontínuo. Os autores, o regime descontínuo alimentado consiste em uma alternativa para evitar a inibição por substrato e proporcionar a obtenção de concentrações elevadas de 2,3-butanodiol. Deste modo, concentrações não inibitórias de substrato podem ser utilizadas para o crescimento celular e, após a limitação de oxigênio, são adicionadas frações de substrato com o objetivo de aumentar a produção de metabólitos na fase fermentativa, em que é priorizada a conversão de substrato em produto (Wong *et al.*, 2014). Com relação ao glicerol, há poucos casos descritos na literatura sobre inibição pelo substrato.

Um modelo matemático determinado por Zeng *et al.* (2004) mostrou um efeito inibitório de glicerol na concentração de 187,6 g/L.

Assim como a inibição por substrato, em muitos cultivos microbianos é comum a ocorrência de inibição por concentrações elevadas de produto. Avaliando-se dados da literatura para a produção de 2,3-butanodiol, entretanto, são poucas as evidências relacionadas à ocorrência deste tipo de inibição. Segundo alguns trabalhos, a limitação do crescimento poderia ter maior relação com a limitação em termos de oxigenação do meio do que com a quantidade de produto formado (Garg & Jain, 1994; Silveira *et al.*, 1998). Sablayrolles & Goma (1983) concluíram, em estudos com *A. aerogenes* NRRL B199 (*K. oxytoca* ATCC 8724) em glicose, que concentrações altas do substrato e de 2,3-butanodiol nos processos fermentativos podem inibir o crescimento celular e a formação de produto, ressaltando, entretanto, que o oxigênio tem forte influência na inibição ou na ativação das diferentes vias metabólicas.

Na Tabela 1 é apresentada uma compilação de resultados relacionados à produção de 2,3-butanodiol, por *K. oxytoca*, em cultivos com diferentes substratos e regimes de condução. Concentrações finais do produto de até 150 g/L são reportadas, indicando a elevada resistência do microrganismo ao 2,3-butanodiol e o grande potencial desta fermentação para ser conduzida em escala industrial.

Adicionalmente, a utilização da engenharia genética se mostra promissora para melhorar os resultados deste processo. Kim *et al.* (2013) relataram a utilização de *K. oxytoca* GSC 12206, deficiente do gene *ldhA*, responsável pela formação de ácido láctico. No processo, a via de produção de 2,3-butanodiol foi estimulada, sendo atingido, em cultivo com glicose em regime descontínuo alimentado, 115 g/L de 2,3-butanodiol.

Tabela 1. Exemplos de resultados encontrados na literatura para a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca* sob diferentes fontes de carbono e estratégias de fermentação.

Substrato	Regime	2,3-butanodiol (g/L)	R (%)	Referência
glicerol	descontínuo alimentado	34	72	Han <i>et al.</i> (2013)
glicerol	descontínuo alimentado	70	78	Petrov & Petrova (2010)
glicerol	descontínuo alimentado	77	80	Cheng <i>et al.</i> (2013)
glicose	descontínuo	57	82	Wong <i>et al.</i> (2014)
glicose	descontínuo	88	90	Sablayrolles & Goma (1983)
glicose	descontínuo alimentado	92	98	Qin <i>et al.</i> (2006)
glicose	descontínuo alimentado	99	77	Olson & Johnson (1948)
glicose	descontínuo alimentado	110	93	Wong <i>et al.</i> (2014)
glicose	descontínuo alimentado	113	95	Yu & Saddler (1983)
glicose	descontínuo alimentado	130	96	Ji <i>et al.</i> (2010)
glicose	descontínuo alimentado	150	43	Ma <i>et al.</i> (2009)
sacarose	contínuo	67	95	Voloch <i>et al.</i> (1985)
sacarose	descontínuo alimentado	92	68	Silveira (1991)
ART				
(caldo de cana-de-açúcar)	descontínuo alimentado	71	80	Berbert-Molina (1990)
xilose	descontínuo	49	66	Jansen <i>et al.</i> (1983)
xilose	descontínuo alimentado	88	98	Yu & Saddler (1983)

R: Rendimento (%).

Entre os estudos listados na Tabela 1, poucos se referem ao uso de glicerol como substrato para a produção de 2,3-butanodiol por *K. oxytoca*. Os trabalhos encontrados mostram rendimentos inferiores aos relatados para glicose e sacarose. Entretanto, a possibilidade de utilização de glicerol da produção de biodiesel no processo fermentativo, com o objetivo de obter concentrações de produtos e rendimentos superiores aos mostrados na Tabela 1, torna o estudo do processo promissor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Em todos os ensaios deste trabalho foi utilizada a linhagem *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 (Figura 4), adquirida do banco de linhagens Bioscan (São Paulo, Brasil). Em outros trabalhos encontrados na literatura, esta mesma linhagem é identificada como *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8724 ou NRRL B199 (Ramachandran *et al.*, 1990; Silveira *et al.*, 1998). Amostras da linhagem foram mantidas em tubos de ensaio com meio agar nutriente e estocadas a 4°C até serem utilizadas.

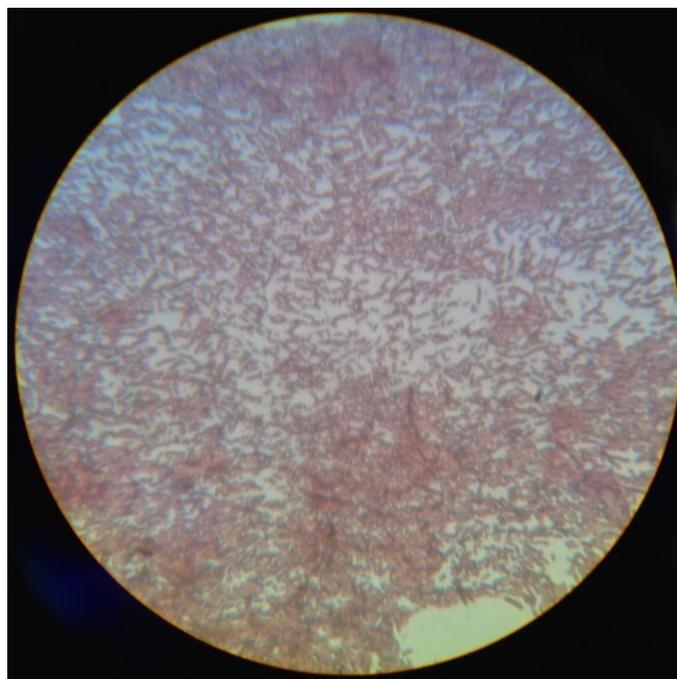


Figura 4. *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Coloração de Gram em microscopia óptica.

3.2 Meios de cultura

O meio para a manutenção das culturas foi o agar nutriente, que continha em g/L: extrato de carne, 3,0; peptona de carne, 5,0; agar-agar, 15,0.

Para a ativação das culturas, preparo de inóculo e ensaios fermentativos foi utilizado o meio descrito por Pirt & Callow (1958) (meio PC), contendo, em g/L: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7,2; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6,0; KOH, 0,45; EDTA, 0,51; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3;

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,09; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0225; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0075; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0038. Para ativação e preparo de inóculos, o meio foi suplementado com 20 g/L de glicerol comercial (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). O pH do meio foi ajustado para 6,5 com ácido clorídrico 2 mol/L. Nos cultivos em agitador e em biorreator de bancada, a concentração de glicerol foi variável, conforme é descrito no item 3.4. Em todos os casos, os meios foram autoclavados a 1 atm por 15 minutos. O mesmo meio foi utilizado para os testes com glicose, como referência.

3.3 Cultivos em frascos sob agitação

Para a ativação da cultura, a partir do estoque foram realizados repiques com uma alçada em tubos de ensaio de 20 mL, contendo 5 mL de meio. Estes tubos foram incubados a 37°C por 24 horas.

Os inóculos para o biorreator foram preparados em agitador de bancada (Certomat U, B. Braun Biotech, Sartorius), sob agitação recíproca de 300 rpm (Figura 5). Utilizaram-se frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 80 mL de meio de cultivo, suplementado com 20 g/L de glicerol, a 37° C, em triplicata. Os meios foram inoculados com 4 mL (5% v/v) de suspensão bacteriana previamente ativada e mantidos sob as condições descritas até o início do cultivo em biorreator.

Os mesmos procedimentos foram adotados para os ensaios em agitador de bancada, variando-se a concentração de glicerol no inóculo de 20, 40, 60, 80 e 100 g/L e o tempo de cultivo até 24 horas.

Quando foi avaliada a influência do pH sobre o crescimento celular em agitador de bancada, o pH foi controlado durante o cultivo com a adição de 1,4 g/L de CaCO_3 no tempo zero e 2,5 g/L de CaCO_3 em cerca de 15 horas de processo, quando o pH atingia valores próximos a 5, com o objetivo de que se mantivesse em valores próximos a 5,5 – 6,0.

Nos ensaios com glicose, o meio da ativação e do inóculo em agitador de bancada foram suplementados somente com 20 g/L de glicose ao invés de 20 g/L de glicerol.

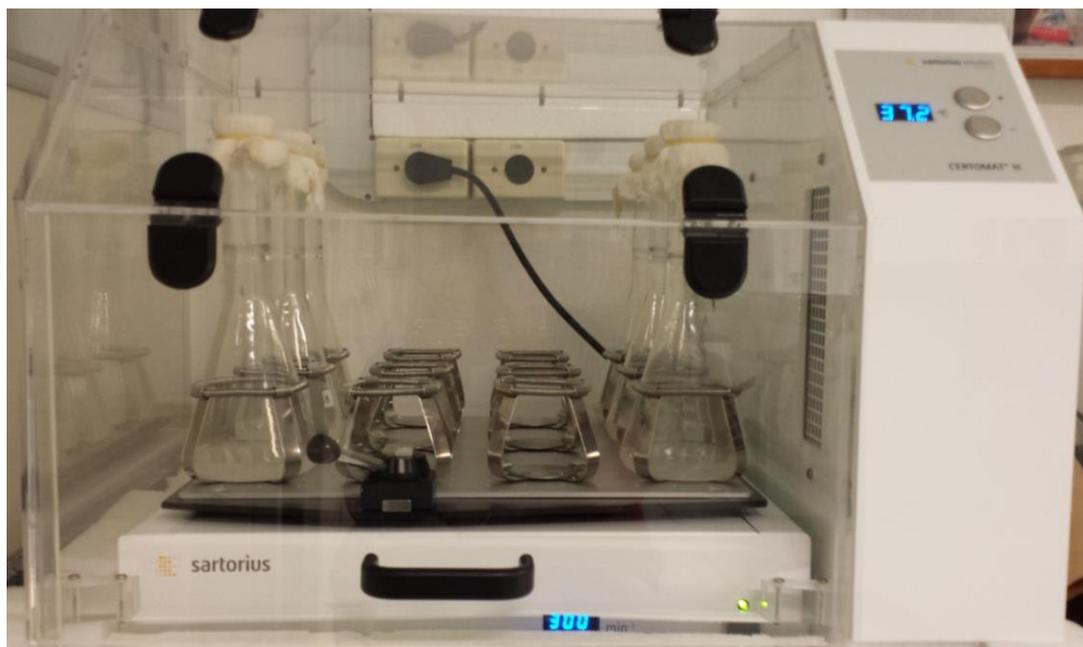


Figura 5. Agitador de bancada (Certomat U, B. Braun Biotech, Sartorius) utilizado nos ensaios em frascos agitados.

3.4 Cultivos em biorreator de bancada em regime descontínuo e em regime descontínuo alimentado

Os cultivos em regime descontínuo e descontínuo alimentado foram realizados em biorreator de bancada New Brunswick, modelo BioFlo/Celligen115 (Figura 6), com 4 L de meio em cuba de fermentação com volume total de 7 L. Independentemente do volume, o sistema continha três turbinas, com quatro pás planas, e quatro chicanas. A primeira turbina ficava instalada imediatamente acima do disco dispersor de ar.

Em regime descontínuo, foram realizados dois grupos de ensaios. No primeiro, que visava avaliar diferentes condições de transferência de oxigênio, foi empregado meio PC com 60 g/L de glicerol e três frequências de agitação (450, 600 e 750 rpm). No segundo grupo, foi avaliado o efeito da concentração de glicerol. Para isto, o meio PC foi suplementado com glicerol em concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 160 g/L e a frequência de agitação de 600 rpm.

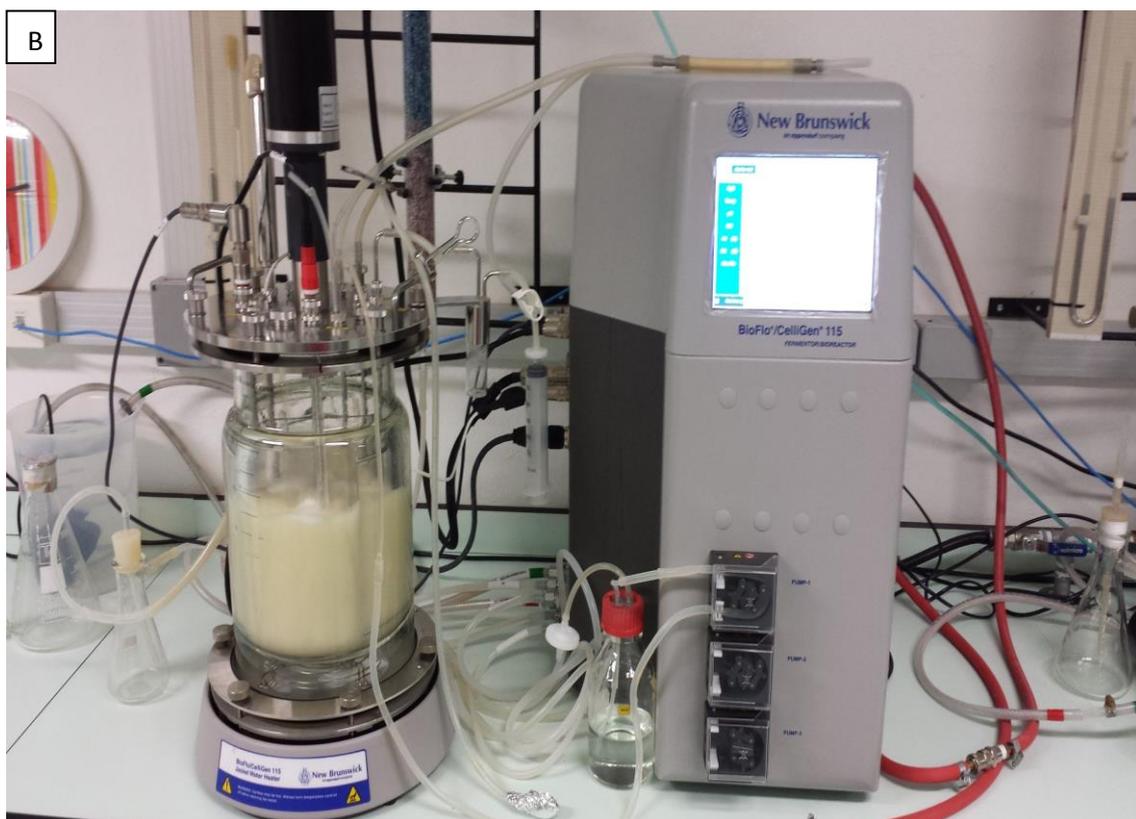
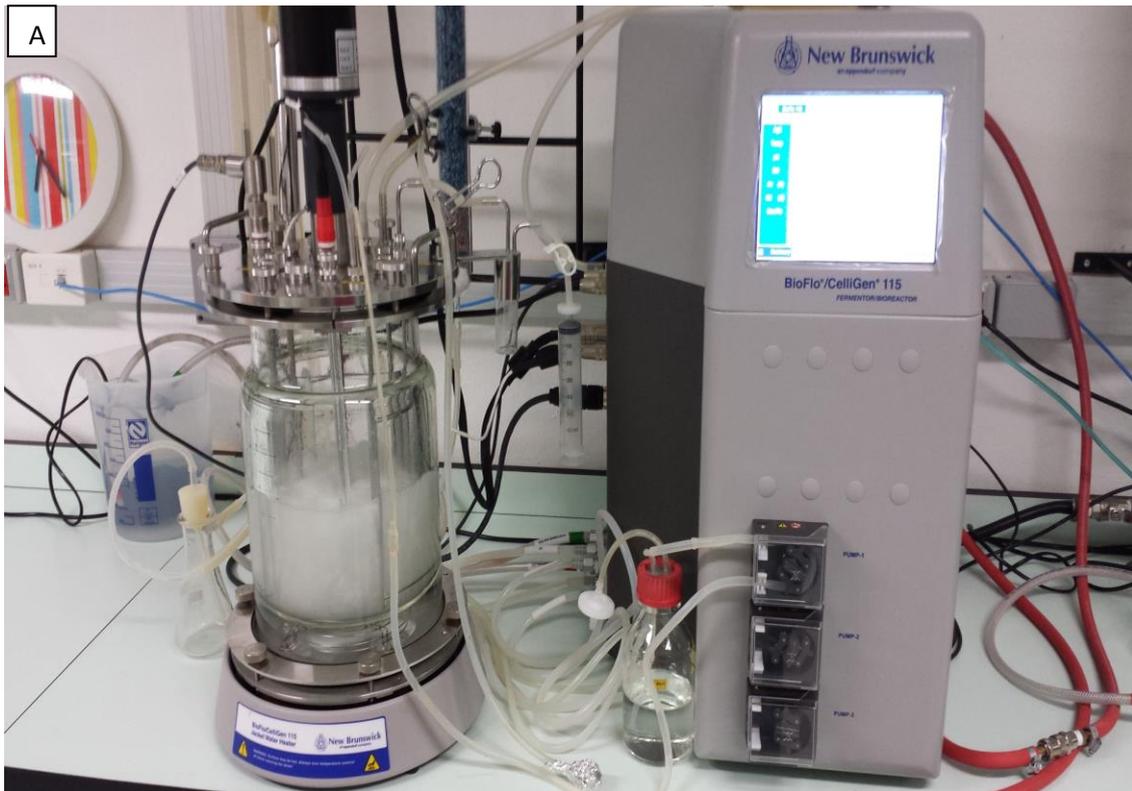


Figura 6. Biorreator de bancada utilizado nos cultivos de regime descontínuo e regime descontínuo alimentado (A. Antes do inóculo; B. 10 horas de cultivo de *Klebsiella oxytoca*).

Nos cultivos em regime descontínuo alimentado, os volumes inicial e final foram de 3 L e 4 L, respectivamente, empregando-se a concentração inicial de glicerol de 60 g/L. Em um primeiro ensaio, a concentração de substrato foi equivalente a 176 g/L, considerando-se o volume total de 4 L, e no segundo, 202 g/L.

As alimentações do cultivo foram feitas manualmente, através da porta de entrada de inóculo, totalizando um volume total de 1 L da solução de alimentação. No momento em que a concentração de glicerol no biorreator era analisada e estava próxima a 30 g/L, era adicionado um volume de solução de glicerol que resultava em acréscimo de concentração de 30 g/L no biorreator, de modo a manter a concentração de substrato em teor máximo de 60 g/L. Estas soluções foram feitas com meio PC nas mesmas concentrações do meio inicial, com o objetivo de repor os sais inorgânicos que supostamente foram consumidos durante o crescimento celular e impedir a limitação do crescimento pela carência de nutrientes.

No primeiro ensaio, foram realizadas cinco alimentações de glicerol diluído em meio PC e no segundo, sete alimentações. Os tempos de alimentação no primeiro cultivo foram em 7,5; 9; 14; 19 e 21 horas, com duração do ensaio de 40 horas. No segundo cultivo, as alimentações foram feitas em 9; 10; 11; 14; 23; 33 e 39 horas, com duração total do processo de 84 horas.

O controle de pH, em todos os ensaios, foi realizado de modo automático para manter-se este parâmetro em 5,5 com a adição de NaOH 7 mol/L. O fluxo de ar utilizado foi de 1,5 L/min e a temperatura de 37° C. As amostras foram coletadas periodicamente para quantificação da biomassa, consumo de substrato e de formação de produtos.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Coleta e preparo das amostras

As amostras dos ensaios foram coletadas assepticamente, em volumes entre 2 e 3 mL. Após a coleta, 0,5 mL era utilizado para a análise da concentração celular. O volume restante era centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm em centrífuga Braun Biotech International, modelo Sigma 1-13. Foi retirado o sobrenadante para análise da concentração de glicerol ou glicose e de produtos. O glicerol era analisado no mesmo instante, e as amostras eram congeladas para posterior análise dos produtos.

3.5.2 Concentração celular

A concentração celular foi quantificada a partir da absorbância determinada a 520 nm em espectrofotômetro T80+ UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltda). Os valores obtidos foram convertidos em concentração massa/volume (gramas/litro), a partir de uma curva de calibração.

3.5.3 Concentração de glicose

A determinação da concentração de glicose foi realizada utilizando o kit Glicose R1 (Biotécnica). Neste método, glicose, na presença de oxigênio e água, é oxidada a ácido glicônico pela enzima glicose oxidase, em pH 8,0, sendo produzido peróxido de hidrogênio como subproduto da reação. O peróxido de hidrogênio reage, então, com 4-aminofenazona e com 2,4-diclorofenol, em reação catalisada por peroxidase, formando antipirileloroquinonimina. Este último composto apresenta coloração rosada, cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose presente na solução em análise. A quantificação foi realizada usando 0,25 mL de amostra e 0,5 mL do reagente enzimático glicose-oxidase, a 37°C por 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 500 nm em espectrofotômetro T80+ UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltda), sendo o resultado convertido em concentração (g/L), a partir de uma curva de calibração.

3.5.4 Concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada a partir de uma adaptação do método descrito por Carra (2012) para análise de sorbitol. Para determinar a concentração de glicerol, foram utilizados 0,2 mL de amostra previamente centrifugados, juntamente com 1 mL de tampão formato 0,7 mol/L, pH 3,0, no período de reação de um minuto. Após, foram acrescentados 2 mL de periodato de potássio 3,5 mM. Depois de um minuto, foram adicionados 1,5 mL do reagente I, levado a banho de água em ebulição a 100°C, por 2 minutos, sendo a leitura espectrofotométrica realizada a 450 nm em espectrofotômetro T80+ UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltda). Os resultados foram calculados a partir de uma curva de calibração e convertidos em gramas por litro.

O reagente I foi obtido a partir de duas soluções previamente preparadas, compostas de 7 g de acetato de amônio dissolvido em 20 mL de água destilada e de 0,160 g de tiosulfato de sódio dissolvido em 10 mL de água. Ambas as soluções foram transferidas, em sequência, para um balão volumétrico de 50 mL. Finalmente, foi

adicionado 0,5 mL de acetilacetona e completado o volume final da solução com água destilada.

3.5.5 Concentração de produtos de fermentação

Os principais produtos da fermentação, 2,3-butanodiol, acetil-metil-carbinol (acetoína) e etanol, foram determinados por cromatografia em fase líquida, em cromatógrafo Agilent Technology, modelo 9100, coluna Aminex HPX-87H (300mm x 7,8mm, 9 μ m), volume de injeção de 50 μ L, a 60°C, vazão de 0,6 mL/min e H₂SO₄ 0,0005 mol/L como fase móvel. Os resultados foram calculados em gramas por litro a partir de uma curva de calibração. A concentração de acetoína foi somada à de 2,3-butanodiol, tendo em vista o equilíbrio entre estes produtos durante o processo. Desta forma, os resultados apresentados em termos de concentração de 2,3-butanodiol incluem o produto minoritário acetoína.

Nos cultivos em agitador de bancada e em regime descontínuo, foram analisadas as amostras do final do cultivo, enquanto que, para os cultivos em regime descontínuo alimentado, os produtos foram avaliados durante o processo.

3.5.6 Oxigênio dissolvido

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.

3.5.7 Frações molares de oxigênio e dióxido de carbono

Os gases efluentes do fermentador passavam por um condensador e por uma coluna contendo cristais de sílica a fim de retirar substâncias volatilizadas e umidade arrastada.

As medidas da fração molar de O₂ e de CO₂ dos cultivos em biorreatores foram verificadas no aparelho analisador de gases oxigênio/gás carbônico, marca New Brunswick, modelo EX-2000, durante o processo fermentativo.

3.6 Cálculos de parâmetros de avaliação

3.6.1 Velocidades médias e específicas

As velocidades médias de formação de biomassa ($\Delta X/\Delta t$) foram calculadas a partir da seguinte fórmula:

$$\Delta X/\Delta t = (X_f - X_0) / t$$

Onde:

$\Delta X/\Delta t$ – velocidade média de formação de biomassa (g/L/h);

X_f – concentração de células no tempo considerado (g/L);

X_0 – concentração inicial de células (g/L);

t – tempo (h).

As velocidades médias de consumo de substrato ($\Delta S/\Delta t$) foram estimadas pela seguinte expressão:

$$\Delta S/\Delta t = (S_f - S_0) / t$$

Onde:

$\Delta S/\Delta t$ – velocidade média de consumo de glicerol (g/L/h);

S_f – concentração final de glicerol (g/L);

S_0 – concentração inicial de glicerol (g/L);

t – tempo (h).

As velocidades específicas de crescimento (μ_x) foram obtidas pela derivação de curvas relacionando o logaritmo natural da concentração celular ($\ln X$) em função do tempo (t). Para o caso especial do cálculo da máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{x\max}$), realizou-se a regressão linear dos valores pertencentes à fase exponencial no gráfico, sendo o coeficiente angular desta reta o próprio $\mu_{x\max}$.

3.6.2 Fatores de conversão de substrato em células e em produtos

O fator de conversão de substrato em células, foi determinado por:

$$Y_{X/S} = (M_{Xf} - M_{X0}) / M_{S1\text{ cons}}$$

Onde:

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

M_{Xf} – massa final de células (g);

M_{X0} – massa inicial de células (g);

$M_{S1\text{ cons}}$ – massa de substrato consumida (g).

O fator de conversão de substrato em produtos foi calculado por:

$$Y_{P/S} = (M_{Pf} - M_{P0}) / M_{S1\text{ cons}}$$

Onde:

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

M_{Pf} – massa final de produto (g);

M_{P0} – massa inicial de produto (g);

$M_{S1\text{ cons}}$ – massa de substrato consumida (g).

Para este cálculo, em ensaios em regime descontínuo em biorreatores, considerou-se o valor de 2,3-butanodiol no tempo zero (P_0) de 0,8 g/L, sendo este o valor médio inicial da concentração de produto.

O fator estequiométrico de conversão de glicerol em 2,3-butanodiol / acetoína é de 0,489 g/g (2 mols de glicerol para 1 mol de 2,3-butanodiol) e 0,5 g/g para etanol (1 mol de glicerol para 1 mol de etanol). Deste modo, para os cálculos de rendimentos, tem-se:

$$\rho = (Y_{P/S} / f) \cdot 100$$

Onde:

ρ – rendimento do produto (%);

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

f – fator estequiométrico de conversão (g/g).

3.6.3 Produtividade volumétrica

As produtividades volumétricas para os compostos formados durante o processo, em ensaios sem variação de volume, foram calculadas por:

$$p_v = (P_f - P_0) / t$$

Onde:

p_v – produtividade volumétrica de produto (g/L/h);

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

P_0 – concentração inicial de produto (g/L);

t – tempo (h).

Para os cálculos de p_v em regime descontínuo alimentado, a concentração inicial de produto foi corrigida, levando-se em conta os volumes inicial (3 L) e final (4 L) de meio de cultivo. Neste caso, a concentração de P_0 foi considerada como 0,6 g/L.

3.6.4 Demanda de oxigênio e velocidade específica de respiração

A demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR, *oxygen uptake rate*) é dada pelo produto da velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) e pela concentração celular (X).

Este parâmetro foi calculado pelo balanço de O_2 e CO_2 nos fluxos gasosos de entrada e saída dos biorreatores, de acordo com a equação a seguir (Wang, 1985):

$$OUR = (F_N \cdot y_{N_2} / V) \cdot \{ [y_{O_2,entra} / (1 - y_{O_2,entra})] - [y_{O_2,sai} / (1 - y_{O_2,sai} - y_{CO_2,sai})] \}$$

Onde:

OUR – demanda de oxigênio pelo cultivo (mmol/L/h);

F_N – vazão molar de ar na entrada do biorreator (mmol/h);

y_{N_2} – fração molar média de nitrogênio no ar (0,791);

V – volume de meio de cultivo no momento da medida (L)

$y_{O_2,entra}$ – fração molar média de oxigênio no ar (0,209);

$y_{O_2,sai}$ – fração molar de oxigênio no gás de saída do biorreator;

$y_{CO_2,sai}$ – fração molar de dióxido de carbono no gás de saída do biorreator.

A vazão molar de ar na entrada do biorreator foi determinada pela expressão abaixo, admitindo-se um comportamento ideal para a fase gasosa do sistema:

$$F_N = F_V \cdot P \cdot 1000 / (R \cdot T)$$

Onde:

F_N – vazão molar de ar na entrada do biorreator (mmol/h);

F_V – vazão volumétrica de ar na entrada do biorreator (L/h);

P – pressão total no biorreator (atm);

R – constante dos gases (atm . L / (mol . K));

T – temperatura da fase gasosa (K).

A pressão total do sistema foi determinada pela soma da pressão ambiente média em Caxias do Sul, 0,92 atm, com a pressão manométrica medida em manômetro de mercúrio acoplado à tampa do biorreator.

A velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) foi, então, calculada pela divisão da demanda de oxigênio pelo cultivo pela concentração celular no mesmo tempo de processo.

3.6.5 Concentração de oxigênio na saturação

A determinação de oxigênio na saturação (OD^*), para as condições iniciais do meios de cultivo utilizados, foi feita de acordo com o modelo descrito por Schumpe & Quicker (1982). Neste modelo, a solubilidade do oxigênio no meio de cultivo é estimada levando-se em conta a redução da solubilidade do gás em água destilada, nas mesmas temperatura e pressão, em decorrência da presença de substâncias eletrolíticas e não-eletrolíticas dissolvidas, através da seguinte expressão:

$$\log (OD_0^* / OD^*) = \sum H_i \cdot I_i + \sum K_j \cdot C_j$$

Onde:

OD_0^* – concentração de oxigênio na saturação em água (mmol/L);

OD^* – concentração de oxigênio na saturação no meio (mmol/L);

H_i – efeito de um íon sobre a solubilidade do oxigênio ("salting-out") (L/mol);

I_i – força iônica (mol/L);

K_j – efeito de substância não-eletrolítica sobre a solubilidade do oxigênio (L/g);

C_j – concentração de substância não-eletrolítica (g/L).

Silveira (1991) determinou o valor de 0,0261 para o termo $\sum H_i \cdot I_i$ do meio de Pirt & Callow. No presente trabalho, a substância não eletrolítica considerada no cálculo foi o glicerol, cujo valor do parâmetro K_j é $4,07 \cdot 10^{-4}$ L/g (Schumpe & Quicker, 1982).

Deste modo, considerando que todos os ensaios em biorreator descritos nesta dissertação foram conduzidos à pressão ambiente e a 37° C, e que, nestas condições, a solubilidade do oxigênio em água destilada, em Caxias do Sul, é aproximadamente igual a 0,196 mmol/L, os valores de OD^* foram calculados por:

$$OD^* = 0,196 / 10^{(0,0261 + 0,000407 \cdot S_0)}$$

Onde:

OD^* – concentração de oxigênio na saturação no meio (mmol/l);

S_0 – concentração inicial de glicerol (g/L).

3.6.6 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) foi determinado em meio de cultivo não inoculado, nas condições iniciais de cada ensaio em biorreator (concentração de glicerol, temperatura, fluxo de ar e frequência dos agitadores), de acordo com o método descrito por Moo-Young & Blanch (1989).

Esta determinação foi feita com base na variação com o tempo da concentração de oxigênio dissolvido (OD), expressa como percentual da saturação, registrada na unidade de controle do biorreator, a partir de leituras feitas com o uso de um eletrodo polarográfico.

Inicialmente, o meio de cultura presente no reator era submetido a um fluxo de nitrogênio gasoso até que a concentração de oxigênio fosse nula. Em seguida, o fluxo de ar era reintroduzido no meio e os valores de OD em função do tempo eram registrados.

Nestas condições, a variação de OD com o tempo é dada pela equação abaixo:

$$dOD / dt = K_{La} (OD^* - OD)$$

Onde:

dOD / dt – velocidade de transferência de oxigênio (% saturação/h);

K_{La} – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1});

OD^* – concentração de oxigênio na saturação (100%);

OD – concentração de oxigênio dissolvido (% saturação).

A partir da integração da equação anterior, entre os limites $OD_{inicial}$ e OD_{final} , é possível calcular-se o K_{La} pela seguinte equação:

$$K_{La} = - \{ \ln [(1 - OD_{final}) / (1 - OD_{inicial})] \} / t$$

Onde:

$OD_{inicial}$ – concentração de oxigênio dissolvido inicial (10 a 20% saturação);

OD_{final} – concentração de oxigênio dissolvido final (70 a 90% saturação);

K_{La} – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1});

t – tempo de medida (h).

3.6.7 Velocidade característica de transferência de oxigênio

A velocidade característica de transferência de oxigênio (OTR, *oxygen transfer rate*) foi determinada, conforme Pirt (1975), pela seguinte equação:

$$OTR = K_{La} \cdot OD^*$$

Onde:

OTR – velocidade característica de transferência de oxigênio (mmol/L/h);

K_{La} – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1});

OD* – concentração de oxigênio na saturação (mmol/L).

3.7 Ensaios realizados

Um resumo das condições utilizadas dos ensaios realizados é mostrado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Condições iniciais dos cultivos de *Klebsiella oxytoca* em regime descontínuo em agitador de bancada recíproco (frequência, 300 min^{-1} ; temperatura, 37°C).

Ensaio	Objetivo do cultivo	S_0 (g/L)	Substrato
01	Avaliar o uso de glicerol como substrato em comparação á glicose	20	glicose
02		20	glicerol
03		20	glicerol
04		20 + 20	glicerol e glicose
05	Avaliar o efeito do pH	20	glicerol
06		20	glicerol
10	Estabelecer os efeitos da concentração de glicerol	20	glicerol
11		40	glicerol
12		60	glicerol
13		80	glicerol
14		100	glicerol

S_0 : Concentração inicial de glicerol e glicose.

Tabela 3. Condições iniciais dos cultivos de *Klebsiella oxytoca*, em meio contendo glicerol como fonte de carbono, em biorreator de bancada.

Ensaio	Regime de operação	Objetivo do cultivo	S_0 (g/L)	RPM (min^{-1})	OTR (mmol/L/h)
07	descontínuo	Definir condições de suprimento de oxigênio	60	450	8,3
08	descontínuo		60	600	17,0
09	descontínuo		60	750	20,9
15	descontínuo	Estabelecer os efeitos da concentração de glicerol	20	600	17,0
16	descontínuo		40	600	17,0
17	descontínuo		60	600	17,0
18	descontínuo		80	600	17,0
19	descontínuo		100	600	17,0
20	descontínuo		120	600	17,0
21	descontínuo		160	600	17,0
22	descontínuo alimentado	Avaliar o processo	176 *	600	17,0
23	descontínuo alimentado	descontínuo alimentado	202 *	600	17,0

S_0 : Concentração inicial de glicerol; OTR: velocidade característica de transferência de oxigênio; * Concentração equivalente (massa total de glicerol por volume final de meio).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do uso de glicerol como substrato para crescimento de *Klebsiella oxytoca* em comparação à glicose

A capacidade de *Klebsiella oxytoca* em consumir glicerol como substrato, em comparação à glicose, foi avaliada em ensaios preliminares realizados em frascos sob agitação. Para isto, foram realizados os Ensaios 01 (com emprego de 20 g/L de glicose) e 02 (com 20 g/L de glicerol). A comparação foi feita com base no crescimento celular até 8 horas de processo.

A Tabela 4 mostra os resultados do cultivo. Foi considerado o intervalo de tempo de 8 horas visando, apenas, avaliar o crescimento celular. Como pode ser observado, a velocidade média de formação de biomassa e a máxima velocidade específica de crescimento foram muito semelhantes com os diferentes substratos, 0,38 g/L/h e 0,63 h⁻¹ para glicose e 0,44 g/L/h e 0,69 h⁻¹ para glicerol, respectivamente.

Tabela 4. Resultados de cultivos de *Klebsiella oxytoca* em meios contendo glicerol e glicose. Temperatura, 37°C; frequência do agitador de bancada recíproco, 300 rpm.

Ensaio	S ₀ glicose (g/L)	S ₀ glicerol (g/L)	$\Delta X/\Delta t$ (g/L/h)	$\mu_{x \max}$ (h ⁻¹)
01	20	-	0,38	0,63
02	-	20	0,44	0,69

S₀ - concentração inicial de substrato;

$\Delta X/\Delta t$ - velocidade média de formação de biomassa até 8 h de processo;

$\mu_{x \max}$ - máxima velocidade específica de crescimento.

A partir destes dados verificou-se que o glicerol é um substrato que possibilita uma adaptação microbiana para a sua metabolização e formação de biomassa de forma semelhante a sacarídeos de fácil absorção, como a glicose.

Em vista disto, foram realizados dois ensaios para avaliar-se o perfil de consumo de glicerol por *K. oxytoca*. O Ensaio 03 consistia em utilizar somente 20 g/L de glicerol como substrato. No Ensaio 04, utilizou-se 20 g/L de glicose em combinação com 20 g/L

de glicerol. Na Figura 7, são ilustrados os comportamentos cinéticos nestes experimentos até 24 horas, tempo em que houve consumo total dos substratos.

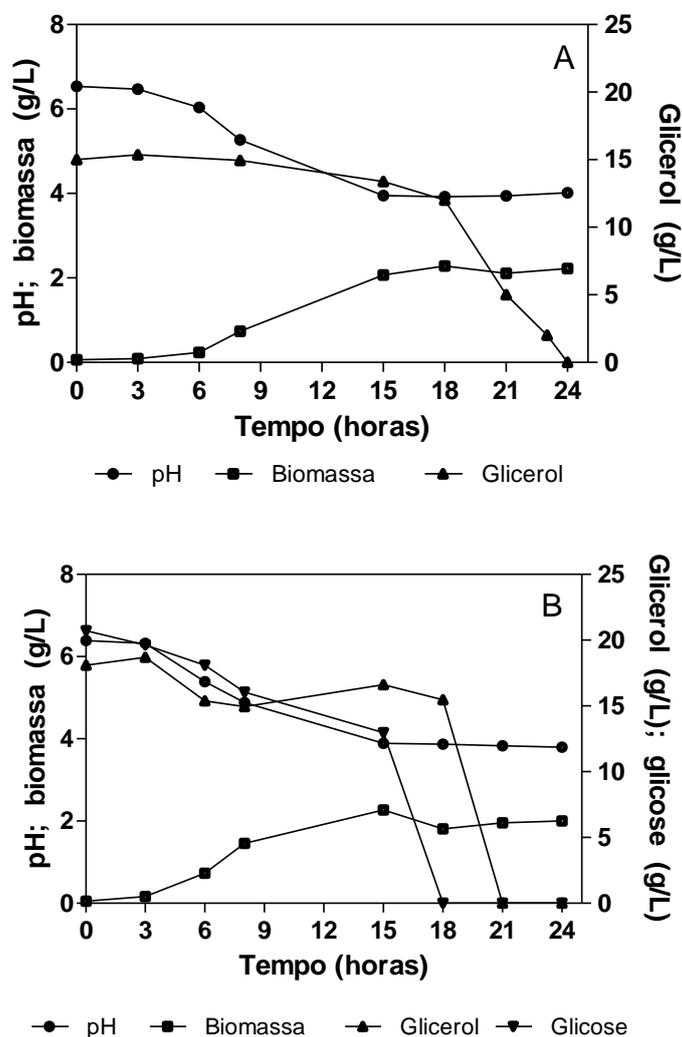


Figura 7. Variação do pH e das concentrações de biomassa celular, glicerol e glicose em cultivo de *Klebsiella oxytoca* nos Ensaio 03 (A) e 04 (B). Temperatura, 37°C; frequência do agitador de bancada recíproco, 300 rpm.

O perfil do pH e do crescimento celular foram semelhantes nos dois ensaios. O cultivo iniciou-se com pH 6,5 e terminou com valores próximos a 4,0. Este comportamento é explicado possivelmente pela formação dos metabólitos ácidos durante o crescimento celular. Em relação à biomassa, ambos os ensaios atingiram cerca de 2 g/L, com velocidade específica máxima de crescimento de $0,5 \text{ h}^{-1}$, em 24 horas.

Quando avaliou-se o consumo de substrato, notaram-se comportamentos diferentes para glicerol e glicose. No Ensaio 03, a velocidade média de consumo de substrato calculada até 18 horas foi de $0,17 \text{ g/L/h}$. Entretanto, no Ensaio 04, quando

utilizados os dois substratos, houve uma maior velocidade média de consumo de glicose, 0,4 g/L/h, com o consumo total em 18 horas, enquanto que com o glicerol esta velocidade foi de 0,11 g/L/h, com consumo total em 21 horas.

Os resultados sugerem que quando os dois substratos estão disponíveis para o microrganismo, glicose é preferencialmente consumida, pelo fato de este composto ser um carboidrato simples e de fácil oxidação para a maior parte dos seres vivos, que apresentam complexos enzimáticos intracelulares para a sua degradação. Quando somente o glicerol está presente no meio, o microrganismo possivelmente se adapta e oxida o substrato com velocidades de consumo superiores.

Desta forma, o glicerol, isoladamente, mostrou-se um substrato interessante para ser estudado, podendo, até mesmo, apresentar vantagens em relação à glicose. Sua composição química de três carbonos permite a oxidação na via bioquímica e formação de um mol de piruvato por mol de glicerol, ao contrário da glicose, para a qual um mol de glicose forma dois moles de piruvato. Assim, a partir de dois moles de glicerol, forma-se um mol de 2,3-butanodiol, com fator máximo de conversão de 0,489 g do produto / g de glicerol, enquanto para a glicose, esta relação é de 0,500 g/g. Com esta diferença química, o glicerol se mostra mais redutor que a glicose, gerando maior quantidade de $\text{NADH}+\text{H}^+$ na sua oxidação (Silva *et al.*, 2009, Mendes, 2011). Isto é importante devido ao fato de que para regenerar estes compostos redutores, vias bioquímicas de produção de 2,3-butanodiol são ativadas (Cheng *et al.*, 2013).

Os resultados preliminares apresentados indicam, portanto, que glicerol pode ser utilizado de forma eficiente como substrato por *K. oxytoca* ATCC 8724 em substituição a glicose, permitindo a geração de compostos de interesse.

4.2 Avaliação do controle do pH em agitador de bancada

O pH é um fator importante a ser considerado durante um cultivo microbiano. Como visto no item 4.1, durante o crescimento celular ocorreu uma significativa redução do pH, valores próximos a 4, em razão da formação de compostos ácidos. Esta acidificação do meio pode provocar a limitação do crescimento celular e, conseqüentemente, a formação de produtos de fermentação. Em biorreatores, o pH é facilmente controlado com bombas peristálticas que adicionam ácidos ou bases, quando necessário, para manter uma faixa de pH estável. Em agitadores de bancada, por outro lado, este controle é dificultado, ressaltando-se que com o uso de concentrações de

substrato mais altas, este problema tende a se agravar. Porém, visto que o uso de frascos sob agitação permite a realização de vários ensaios simultaneamente, a definição de uma forma de controle do pH nesta condição é imprescindível.

Levando-se em conta o exposto, estudou-se o crescimento celular e o consumo de glicerol, na concentração de 20 g/L, por *K. oxytoca*, com e sem a presença de carbonato de cálcio como agente tamponante de pH (Ensaio 05 e 06, respectivamente). Em ambos os ensaios, os meios foram preparados com pH inicial de 6,5. No Ensaio 06, com controle de pH, foi adicionado, juntamente com o inóculo, 1,4 g/L de CaCO₃ e em 15 horas de processo, mais 2,5 g/L de CaCO₃, com a finalidade de manter o pH em valores na faixa de 5 a 6. Esta forma de adição do CaCO₃ foi adotada com o fim de evitar valores de pH excessivamente altos no início do processo, conforme observado em testes preliminares que inibiram totalmente o desenvolvimento microbiano. Esta estratégia de adição de carbonato de cálcio foi definida em testes preliminares, em que se mostrou adequada para o controle do pH. Os resultados obtidos nos Ensaio 05 e 06 são mostrados na Tabela 5 e na Figura 8.

Observou-se, no Ensaio 05, uma queda significativa do pH a partir de 3 horas de processo, atingindo valores próximos de 4 em 15 horas. À medida que os valores de pH tornaram-se muito ácidos, o crescimento celular passou a ser limitado. Ao contrário disto, no Ensaio 06, o pH mostrou um comportamento diferente, sendo que, nas primeiras 3 horas, alcançou 7,2, devido à neutralização de compostos ácidos presentes no meio pelo carbonato de cálcio e, depois, foi mantido entre 5 e 6. Note-se, ainda, que não houve limitação da formação de biomassa pela acidificação do meio.

Com relação ao crescimento celular, determinou-se uma concentração de biomassa 2,5 vezes maior no Ensaio 06, com máxima velocidade específica de crescimento de 0,79 h⁻¹, mais alta que a do Ensaio 05 (0,49 h⁻¹). Quando se comparam as velocidades médias de crescimento nas primeiras 8 horas de cultivo destes ensaios, nota-se, no Ensaio 06, uma velocidade 5,5 vezes maior devido ao pH estar em faixa mais apropriada para o microrganismo.

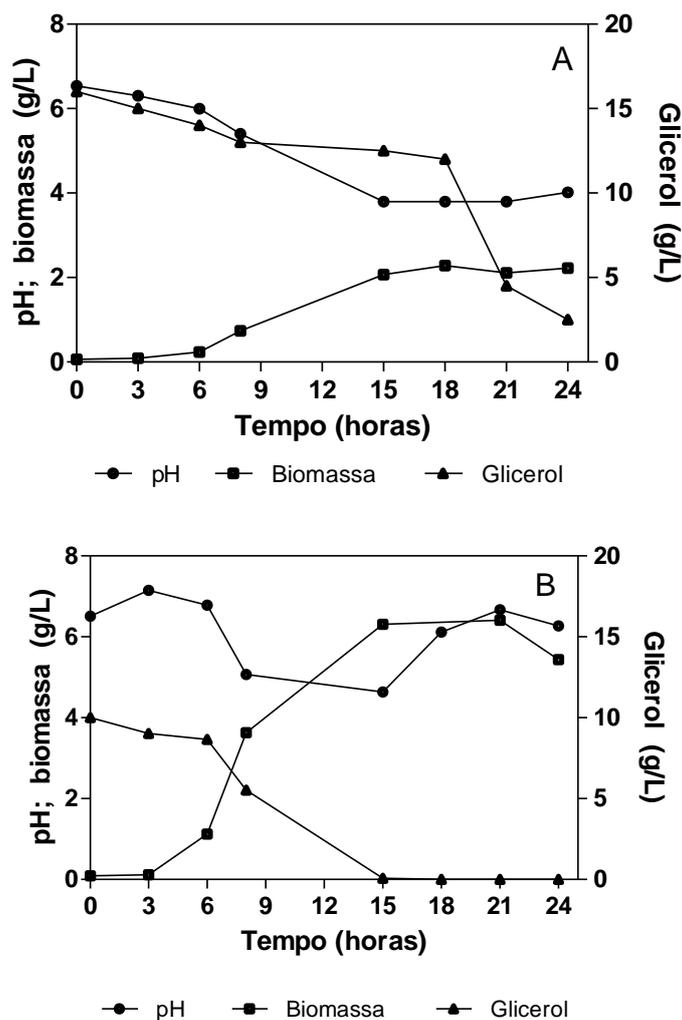


Figura 8. Variação do pH e das concentrações de biomassa celular e glicerol em cultivo de *Klebsiella oxytoca* nos Ensaio 05, com pH não controlado (A), e 06, com pH controlado com CaCO₃ (B). Temperatura, 37°C; frequência do agitador de bancada recíproco, 300 rpm.

O pH influenciou, da mesma forma, a velocidade de consumo de glicerol. No Ensaio 05, devido à acidificação do meio, o consumo de substrato foi mais lento, constatando-se uma concentração residual de glicerol de 2,6 g/L, após 24 horas de processo, enquanto que, no Ensaio 06, o substrato foi totalmente consumido em 15 horas.

Uma faixa de pH inadequada para o crescimento microbiano pode modificar o potencial redox da célula, inativar as enzimas de oxidação e alterar as vias metabólicas de formação de produtos. Ocorrendo limitação do crescimento, há pouca formação de

compostos oxidados que serão utilizados para a formação de produtos de interesse (Silva *et al.*, 2009, Mendes, 2011).

Tabela 5. Resultados de cultivos de *Klebsiella oxytoca* em meios contendo glicerol com e sem a adição de CaCO₃. Temperatura, 37° C; frequência do agitador de bancada recíproco, 300 rpm.

Ensaio	S ₀ (g/L)	CaCO ₃ (g/L)	$\mu_{x \max}$ (h ⁻¹)	X _f (g/L)	$\Delta X/\Delta t$ (g/L/h)		$\Delta S/\Delta t$ (g/L/h)	
					8 h	15 h	8 h	15 h
					05	20	0*	0,49
06	20	1,4*+2,5**	0,79	5,4	0,444	0,411	1,331	1,201

*CaCO₃ adicionado no tempo zero;

**CaCO₃ adicionado 15 horas após a inoculação.

S₀ - concentração inicial de glicerol;

$\mu_{x \max}$ - máxima velocidade específica de crescimento;

X_f - concentração celular final;

$\Delta X/\Delta t$ - velocidade média de formação de biomassa;

$\Delta S/\Delta t$ - velocidade média de consumo de glicerol.

Wong *et al.* (2014) estudaram o efeito do pH sobre *K. pneumoniae* ZMD30 utilizando glicose, na faixa de 4,5 a 9,0. O valor ótimo de pH para a produção de 2,3-butanodiol foi 6,0, sendo obtidos 52 g/L de produto, com rendimento de 74% e produtividade de 2,1 g/L/h.

Jansen *et al.* (1983) avaliaram, em cultivos de *K. oxytoca* ATCC 8724, a mesma linhagem usada neste trabalho, em meio contendo xilose, que em valores de pH abaixo de 4,2 não ocorre crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, não há formação de 2,3-butanodiol, sendo que o pH de produção ideal está na faixa 5,2 – 5,6.

Desta forma, nos demais ensaios em agitador de bancada descritos neste trabalho, a adição o carbonato de cálcio em doses fracionadas, após a inoculação e durante o cultivo, foi adotada.

4.3 Avaliação do efeito do suprimento de oxigênio sobre o processo

O efeito do suprimento de oxigênio sobre processos fermentativos com microrganismos anaeróbios facultativos precisa ser cuidadosamente avaliado, pois influencia diretamente o crescimento celular e a formação de produtos do catabolismo. Como discutido anteriormente, o cultivo de *K. oxytoca* divide-se bioquimicamente em duas fases: aeróbia e anaeróbia. Pode-se dizer, de uma forma geral, que o processo se caracteriza por uma sequência de fases – *lag*, exponencial, linear e estacionária –, dependendo da quantidade de oxigênio disponível no meio para o microrganismo.

Neste grupo de ensaios, o efeito do suprimento de oxigênio sobre o cultivo de *K. oxytoca* em glicerol foi avaliado em cultivos em regime descontínuo conduzidos em biorreator de bancada. A concentração inicial de glicerol foi de cerca de 60 g/L, tendo sido avaliadas as frequências de agitadores de 450 (Ensaio 07), 600 (Ensaio 08) e 750 rpm (Ensaio 09), com um fluxo de ar constante de 1,5 L/min ou 0,375 vvm (volumes de ar por volume de meio por minuto). Determinações do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) feitas para estas condições de aeração e agitação, em meio não inoculado, resultaram em valores de 48, 98 e 120 h^{-1} . Com estes dados e considerando-se uma concentração de oxigênio na saturação (OD^*) de 0,174 mmol/L para 60 g/L de glicerol, determinada de acordo com Silveira (1991), os valores de OTR (velocidade característica de transferência de oxigênio) para as condições iniciais foram estimados em 8,3, 17,0 e 20,9 mmol/L/h, respectivamente. Os resultados obtidos são resumidos na Tabela 6 e os perfis cinéticos são ilustrados na Figura 9.

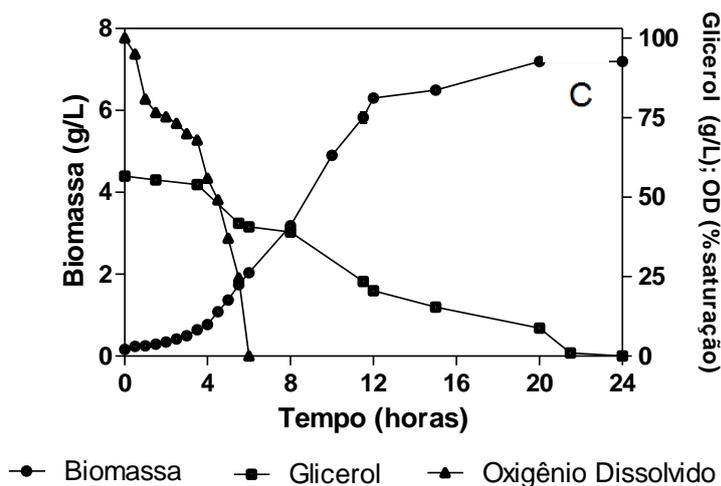
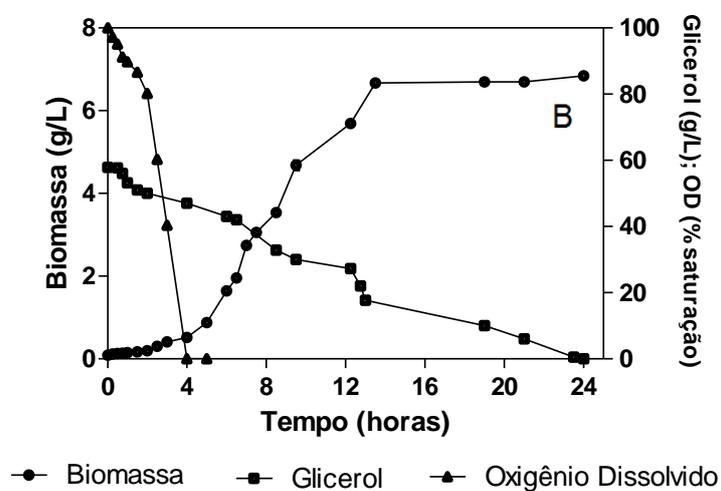
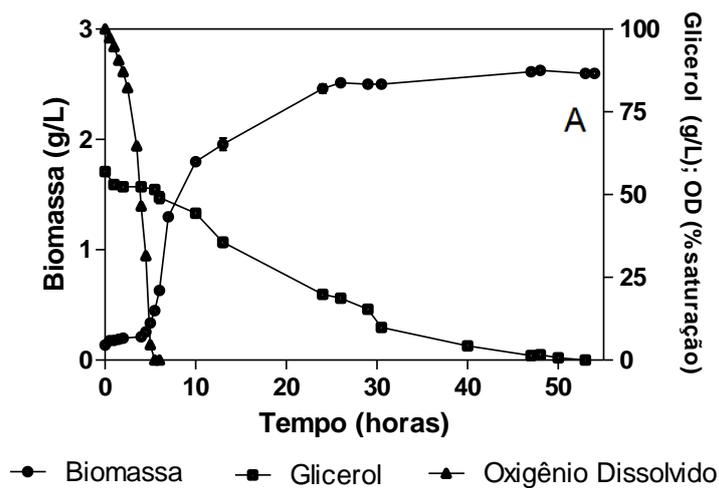


Figura 9. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido em cultivo de *Klebsiella oxytoca* nos Ensaio 07 (A), 08 (B) e 09 (C). Temperatura, 37°C; pH 5,5; fluxo específico de ar, 0,375 vvm; frequência dos agitadores, 450, 600 e 750 rpm.

Tabela 6. Resultados de cultivos de *Klebsiella oxytoca* em meios contendo glicerol. Temperatura, 37°C; pH, 5,5; fluxo específico de ar, 0,375 vvm; frequência dos agitadores, 450, 600 e 750 rpm.

Ensaio		07	08	09
OTR	(mmol/L/h)	8,3	17,0	20,9
RPM	(min ⁻¹)	450	600	750
K _L a	(h ⁻¹)	47,7	97,5	120
t _{OD}	(h)	5,5	4,0	6,0
S ₀	(g/L)	60	60	60
S _f	(g/L)	0	0	0
t	(h)	54	24	24
X _f	(g/L)	2,6	6,8	7,2
μ _{xmax}	(h ⁻¹)	0,80	0,80	0,80
Y _{x/s}	(g/g)	0,040	0,12	0,12
But	(g/L)	26,6	17,3	15,7
Y _{P/S but}	(g/g)	0,43	0,27	0,25
ρ _{but}	(%)	88,0	56,2	50,6
p _{v but}	(g/L/h)	0,48	0,69	0,62
Et	(g/L)	4,0	5,0	2,6
Y _{P/S et}	(g/g)	0,066	0,083	0,043
ρ _{et}	(%)	14,0	18,0	8,0
p _{v et}	(g/L/h)	0,074	0,206	0,107

OTR - velocidade característica de transferência de oxigênio;

RPM - rotações por minuto;

K_La - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio;

t_{OD} - tempo em que o oxigênio atingiu a concentração nula;

S₀ - concentração inicial de glicerol;

S_f - concentração final de glicerol;

t - tempo;

X_f - concentração celular final;

μ_{xmax} - máxima velocidade específica de crescimento;

Y_{x/s} - fator de conversão em células;

But - concentração em 2,3-butanodiol;

Y_{P/S but} - fator de conversão em 2,3-butanodiol;

ρ_{but} - rendimento em 2,3-butanodiol;

p_{v but} - produtividade volumétrica em 2,3-butanodiol;

Et - concentração em etanol;

Y_{P/S et} - fator de conversão em etanol;

ρ_{et} - rendimento em etanol;

p_{v et} - produtividade volumétrica em etanol.

De um modo geral, os perfis cinéticos destes ensaios seguiram o descrito por Silveira (1991) para a fermentação de sacarose pela mesma bactéria. No início do processo, logo após a fase *lag*, ocorreu a fase não-limitada em oxigênio, com o crescimento celular apresentando comportamento exponencial e observando-se a máxima atividade respiratória. Após isto, a concentração de oxigênio em solução tornou-se nula e a velocidade de crescimento passou a ter um valor constante. Esta é a fase limitada em oxigênio, na qual, segundo o autor, inicia-se a formação de produtos. Esta situação foi mantida até que o suprimento de oxigênio passou a ser, de tal modo insuficiente, que não restasse mais que o mínimo necessário para as atividades fundamentais das células para a manutenção, caracterizando-se a fase hiperlimitada em oxigênio. Neste ponto a reprodução celular foi, também, suprimida, mantendo-se, entretanto, a geração de produtos.

No Ensaio 07, observou-se que a concentração de oxigênio se tornou nula em 5,5 horas de processo. Após isto, sob limitação de oxigênio, ocorreu a limitação do crescimento celular, sendo que, a partir de 24 horas de processo, μ_x foi praticamente nula. Neste cultivo, houve a menor conversão de substrato em células, 0,040 g/g, 2,6 g/L de biomassa.

O menor suprimento de oxigênio no Ensaio 07 limitou a atividade respiratória do microrganismo, e, conseqüentemente, o crescimento celular, possibilitando um maior consumo de glicerol na direção da formação de produtos de fermentação. Deste modo, os melhores resultados em termos de 2,3-butanodiol foram obtidos nesta condição, com 26,6 g/L e rendimento de 88%. Por outro lado, a produtividade foi mais baixa, de 0,48 g/L/h, devido o tempo de processo ser muito mais longo (54 horas) que nos outros ensaios. Estes resultados corroboram a literatura especializada, em que é descrito que um menor suprimento de oxigênio no meio leva à limitação do crescimento e ao favorecimento da formação de produto (Silveira *et al.*, 1993). Resultados semelhantes com altos rendimentos de 2,3-butanodiol e baixa produtividade foram observados por Berbert-Molina (1995), quando utilizou um suprimento de oxigênio relativamente baixo em cultivo de *K. pneumoniae* ATCC 8724, a mesma linhagem utilizada neste trabalho, com caldo de cana tratado e suplementado com fosfato de amônio.

Como ocorreu no Ensaio 07, aerações baixas provocam limitação no crescimento celular, visto que ocorre alta demanda de oxigênio pelo microrganismo para a bioconversão de substrato, prejudicando, posteriormente, o processo fermentativo (Yu & Saddler, 1983).

Apesar das diferenças operacionais entre estes cultivos, as máximas velocidades específicas de crescimento nos Ensaio 07, 08 e 09 foram semelhantes, $0,80 \text{ h}^{-1}$. O maior crescimento do microrganismo aconteceu quando a concentração de oxigênio disponível no meio esteve acima da concentração crítica, ou seja, nas primeiras horas do cultivo. Em todos os ensaios, não houve limitação de oxigênio nas primeiras horas, possibilitando a ocorrência de um mesmo valor de $\mu_{x\text{max}}$ e a não formação de produto. Quando o oxigênio torna-se limitante, uma fase linear ocorre até o momento que o oxigênio disponível no meio é suficiente somente para a manutenção do microrganismo (Silveira *et al.*, 1993; Berbert-Molina *et al.*, 2001).

Nos Ensaio 08 e 09, os resultados foram semelhantes, com biomassa de 6,8 e 7,2 g/L, respectivamente, em 24 horas de processo. No Ensaio 09, com uma aeração mais intensa, houve um tempo maior (6 horas) para o oxigênio chegar a níveis limitantes e alcançar valor nulo, enquanto que, no Ensaio 08, a fase limitada iniciou-se após 4 horas de cultivo.

Nos dois ensaios com maior OTR, este tempo maior com OD acima da concentração crítica, permitiu que o microrganismo mantivesse seu crescimento celular ilimitado por um período mais longo, reduzindo a formação de 2,3-butanodiol. Em síntese, o que define os resultados do processo com relação à limitação do oxigênio é a quantidade de substrato que ficará disponível no meio para a conversão em produto quando OD for igual a zero, independentemente da concentração de substrato. Quanto maior for o tempo de permanência de OD em valores maiores que os de OD crítico, menor será a quantidade de substrato para a conversão em produto favorecendo, por outro lado, o crescimento.

Nos Ensaio 08 e 09, foram determinadas produtividades volumétricas superiores à do Ensaio 07, mesmo tendo resultados inferiores em termos de conversão em produto. No caso, o fator determinante foi o tempo de processo. No Ensaio 07, mesmo com concentração de produto mais alta, a duração do cultivo foi mais longa, em decorrência do menor crescimento celular, prejudicando a produtividade. Em regime descontínuo, portanto, concentrações de produto intermediárias, em um tempo menor, tornam-se interessantes devido ao aumento das produtividades (Saha & Bothast, 1999).

Quanto ao etanol, os melhores resultados foram observados no Ensaio 08. Os valores de $Y_{P/S}$, ρ_{et} e p_V foram, entretanto, muito baixos em relação ao 2,3-butanodiol, visto que, como comentado anteriormente, a via bioquímica do etanol é pouco favorável

para o microrganismo, que opta pela via do 2,3-butanodiol para regeneração de compostos oxidados quando em limitação de OD.

Estudos de Ramachandran *et al.* (1990) mostraram resultados semelhantes aos descritos neste trabalho. Utilizando a mesma linhagem de *K. oxytoca* ATCC 8724, estes autores avaliaram a produção de 2,3-butanodiol a partir de lactose com K_{La} de 47 a 120 h^{-1} . Um K_{La} mais elevado resultou em um tempo maior sem limitação de oxigênio, permitindo maior conversão de substrato em células. Entretanto, K_{La} igual a 47 h^{-1} resultou em tempo de processo mais longo com menor crescimento. Segundo os autores, um K_{La} intermediário aumenta a produtividade do processo, visto que a transferência de oxigênio afeta diretamente o rendimento. Os melhores resultados foram obtidos utilizando K_{La} de $93,4\text{ h}^{-1}$, semelhante ao determinado no Ensaio 08 deste trabalho, com uma produtividade maior ($0,86\text{ g/L/h}$ de 2,3-butanodiol).

Silveira *et al.* (1993) utilizando a mesma linhagem, em meio contendo sacarose concluíram que uma aeração intermediária permite crescimento médio em relação a alta ou baixa aeração. Enquanto houve oxigênio dissolvido no meio, não houve formação de produtos. Quando valores de K_{La} altos foram utilizados, obteve-se X_f igual a $10,9\text{ g/L}$ e p_v $0,81\text{ g/L/h}$, ao contrário de condições intermediárias, X_f igual a $6,2\text{ g/L}$, p_v $1,49\text{ g/L/h}$.

Experimentos de Beronio & Tsao (1993) com *K. oxytoca* mostraram melhor produtividade em 2,3-butanodiol em cultivos com uma velocidade de transferência de oxigênio média, que permita limitação de oxigênio. A produtividade foi 18% maior que em cultivos onde não se teve o controle na oxigenação. Estudos de De Mas *et al.* (1988) mostraram que OTR acima de 15 mmol/L/h já diminuem a produção de 2,3-butanodiol, de forma semelhante à observada nos Ensaios 08 e 09 do presente trabalho.

Resultados de Jansen *et al.* (1983) mostraram comportamento semelhante para *K. oxytoca* em xilose. Quando baixas concentrações de oxigênio se encontravam no meio de cultivo, menor foi a respiração e o crescimento celular, possibilitando uma maior produção de 2,3-butanodiol. O mesmo ocorreu em experimentos descritos por Sablayrolles & Goma (1983), utilizando glicose, com a mesma linhagem. Com K_{La} de 300 h^{-1} , obtiveram-se $12,1\text{ g/L}$ de células e $7,6\text{ g/L}$ em 2,3-butanodiol, enquanto concentrações máximas de $3,3\text{ g/L}$ de células e $22,7\text{ g/L}$ de produto foram atingidas com um K_{La} de 30 h^{-1} .

O K_{La} e a velocidade específica de respiração são parâmetros importantes e difíceis de controlar em cultivos fermentativos (Zeng *et al.*, 1994). Toda a atividade

metabólica do microrganismo inclui a formação de produtos e é influenciada pelo oxigênio presente dentro da célula e não no meio externo, o que torna o meio interno independente do K_{La} . Um K_{La} mais alto, entretanto, permite que mais oxigênio atravesse a membrana celular, ativando vias aeróbias e diminuindo a formação do produto em aerobiose (Silveira *et al.*, 1993).

Deste modo, avaliou-se a demanda de oxigênio do cultivo (OUR) e a velocidade específica de respiração do microrganismo (Q_{O_2}) nos cultivos realizados. Durante as primeiras horas de cultivo, na fase não limitada de oxigênio, foram determinadas as mais altas OUR e Q_{O_2} . No final do cultivo, com a ausência de crescimento (μ_x), o Q_{O_2} atingiu seus valores mínimos, correspondendo ao próprio coeficiente de manutenção (m_o), com valores de m_o de 3,2, 1,6 e 4,2 mmol/g/h para os Ensaios 07, 08 e 09, respectivamente. Na fase limitada em oxigênio, os valores de Q_{O_2} diminuem, e ocorre a limitação do crescimento celular. Na fase hiperlimitada, com $Q_{O_2} = m_o$, a velocidade de formação de produtos diminui na ausência de crescimento celular.

Estudos de Zeng *et al.* (1994) mostram que ótimas produções de 2,3-butanodiol foram alcançadas com 32 horas de cultivo e um Q_{O_2} controlado em valores baixos, 4 mmol/g/h, obtendo 102 g/L em produto. Silveira *et al.* (1998), por sua vez, mostraram que, embora na fase hiperlimitada em oxigênio o fluxo de substrato é quase totalmente dirigido para a formação de 2,3-butanodiol, a máxima velocidade de formação deste produto ocorre com velocidade de crescimento baixa (cerca de $0,15 \text{ h}^{-1}$), mas não nula.

A partir das discussões apresentadas, optou-se pela OTR intermediária testada, 17,0 mmol/L/h, para a sequência dos experimentos realizados.

4.4 Avaliação do efeito da concentração inicial de glicerol sobre o processo em regime descontínuo

Para a obtenção de rendimentos elevados em 2,3-butanodiol em regime descontínuo, é necessário que se utilizem concentrações iniciais de substrato também elevadas baseado nos cálculos de conversão. Por outro lado, concentrações acima de 50 g/L podem ser inibitórias ao crescimento de *K. oxytoca* com glicose e xilose (Yu & Saddler, 1983), podendo assim ser também para glicerol, diminuindo a produção de 2,3-butanodiol.

Inicialmente, foram realizados experimentos em regime descontínuo em agitador de bancada, empregando-se concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 g/L de glicerol

(Ensaio 10 a 14), em pH controlado com CaCO_3 , com o objetivo de obterem-se informações rápidas sobre o eventual efeito inibidor do glicerol sobre o crescimento celular. Todos os ensaios foram conduzidos até 24 horas, independentemente da quantidade de substrato consumido, visto que o foco principal era avaliar a velocidade de crescimento microbiano durante a fase exponencial, que acontece nas primeiras horas de processo. Os resultados destes ensaios são resumidos na Tabela 7.

Com relação à concentração celular atingida nestes ensaios, os valores finais foram relativamente baixos, entre 3,1 e 4,0 g/L, e se justificam pela já explicada dependência entre o crescimento e o suprimento de oxigênio. Em concentrações de 20, 40 e 60 g/L de substrato, valores de μ_{xmax} foram praticamente iguais, 0,72-0,73 h^{-1} . Entretanto, concentrações de 80 e 100 g/L já evidenciaram a ocorrência de inibição no desenvolvimento da biomassa na fase exponencial, com redução de μ_{xmax} (0,52 – 0,56 h^{-1}). Nota-se, ainda, que, quanto maior a concentração de glicerol, menor foi $Y_{\text{X/S}}$ e maior $Y_{\text{P/S}}$.

A formação de 2,3-butanodiol e etanol não foram detectadas em concentrações de até 40 g/L de glicerol. Os melhores resultados em termos de formação de produtos foram obtidos no Ensaio 14 (17,7 g/L de 2,3-butanodiol e 2,5 g/L de etanol), com rendimentos em relação ao máximo teórico de 57,2 e 7,6%, respectivamente.

Resultados em agitador de bancada têm como característica o fato de alguns parâmetros de processo, como pH e a oxigenação do meio, serem difíceis de controlar.

Tabela 7. Resultados de cultivos de *Klebsiella oxytoca* em meios contendo diferentes concentrações de glicerol em agitador de bancada. Temperatura, 37°C; frequência do agitador de bancada recíproco, 300 rpm.

Ensaio		10	11	12	13	14
S ₀	(g/L)	20	40	60	80	100
S _f	(g/L)	0	6	15	19	36
t	(h)	24	24	24	24	24
X _f	(g/L)	3,1	3,3	3,8	4,0	3,4
μ _{xmax}	(h ⁻¹)	0,72	0,72	0,73	0,56	0,52
Y _{x/s}	(g/g)	0,15	0,10	0,080	0,061	0,052
But	(g/L)	-	-	6,9	14,7	17,7
Y _{P/S but}	(g/g)	-	-	0,16	0,24	0,28
ρ _{but}	(%)	-	-	32,7	49,0	57,2
p _{v but}	(g/L/h)	-	-	0,29	0,61	0,74
Et	(g/L)	-	-	1,6	1,7	2,5
Y _{P/S et}	(g/g)	-	-	0,036	0,027	0,038
ρ _{et}	(%)	-	-	7,2	5,4	7,6
p _{v et}	(g/L/h)	-	-	0,066	0,071	0,104

S₀ - concentração inicial de glicerol;

S_f - concentração final de glicerol;

t - tempo;

X_f - concentração celular final;

μ_{xmax} - máxima velocidade específica de crescimento;

Y_{x/s} - fator de conversão em células;

But - concentração em 2,3-butanodiol;

Y_{P/S but} - fator de conversão em 2,3-butanodiol;

ρ_{but} - rendimento em 2,3-butanodiol;

p_{v but} - produtividade volumétrica em 2,3-butanodiol;

Et - concentração em etanol;

Y_{P/S et} - fator de conversão em etanol;

ρ_{et} - rendimento em etanol;

p_{v et} - produtividade volumétrica em etanol.

Em vista disto, optou-se por testar a condução do processo em biorreator de bancada. Foram realizados, então, cultivos com concentrações iniciais de glicerol entre 20 a 160 g/L (Ensaio 15 a 21), cujos resultados são mostrados na Tabela 8, enquanto os perfis cinéticos são apresentados na Figura 10.

Avaliando-se o crescimento de *K. oxytoca* nas diferentes concentrações, observa-se que os Ensaio 15, 16 e 17 apresentaram valores de $\mu_{x_{max}}$ próximos a $0,80 \text{ h}^{-1}$, indicando não ter ocorrido inibição pelo glicerol com S_0 até 60 g/L. O maior $Y_{X/S}$ ocorreu quando a menor concentração de substrato foi utilizada de 0,28 g/g, isto porque grande parte do substrato foi utilizado para o crescimento celular durante a fase não limitada em oxigênio. Quando se tem baixa concentração inicial de glicerol, a maior parte ou mesmo a totalidade do substrato, dependendo da OTR, é disponibilizada para a geração de ATP, biomassa e CO_2 , havendo pouca formação de 2,3-butanodiol. Com isso, os Ensaio 15, 16 e 17 apresentaram baixos rendimentos para 2,3-butanodiol de 35,9 a 56,2%, e também para etanol, 18,0 a 22,0%. Quanto às produtividades, valores reduzidos também são mostrados na Tabela 7, o que é explicado pelo fato de este parâmetro ser dependente do tempo de processo e da concentração final de produto.

Com as concentrações iniciais de substrato superiores (Ensaio 18 a 20), os valores de $\mu_{x_{max}}$ foram reduzidos significativamente – 0,63, 0,42 e $0,50 \text{ h}^{-1}$, respectivamente –, indicando a ocorrência de inibição por substrato. Da mesma forma, os valores de $Y_{X/S}$ foram reduzidos em média 2,5 vezes em relação aos outros ensaios, o que se deve ao fato de a quantidade de substrato disponível para o processo fermentativo, após a limitação de oxigênio, ter sido utilizada, de forma crescente, para a formação de produtos através de metabolismo anaeróbio.

Deste modo, concentrações superiores de glicerol e um baixo crescimento celular, até certo ponto, podem ser importantes para a geração de produtos. A inibição pela concentração inicial de substrato faz com que o crescimento celular e o consumo de glicerol sejam mais lentos. Em consequência, a partir da fase de limitação de oxigênio, mais substrato estará disponível para a conversão em produto, como pode ser observado pelos valores finais de 2,3-butanodiol nos Ensaio 18, 19 e 20: 32,9, 37,8 e 53,6 g/L, respectivamente.

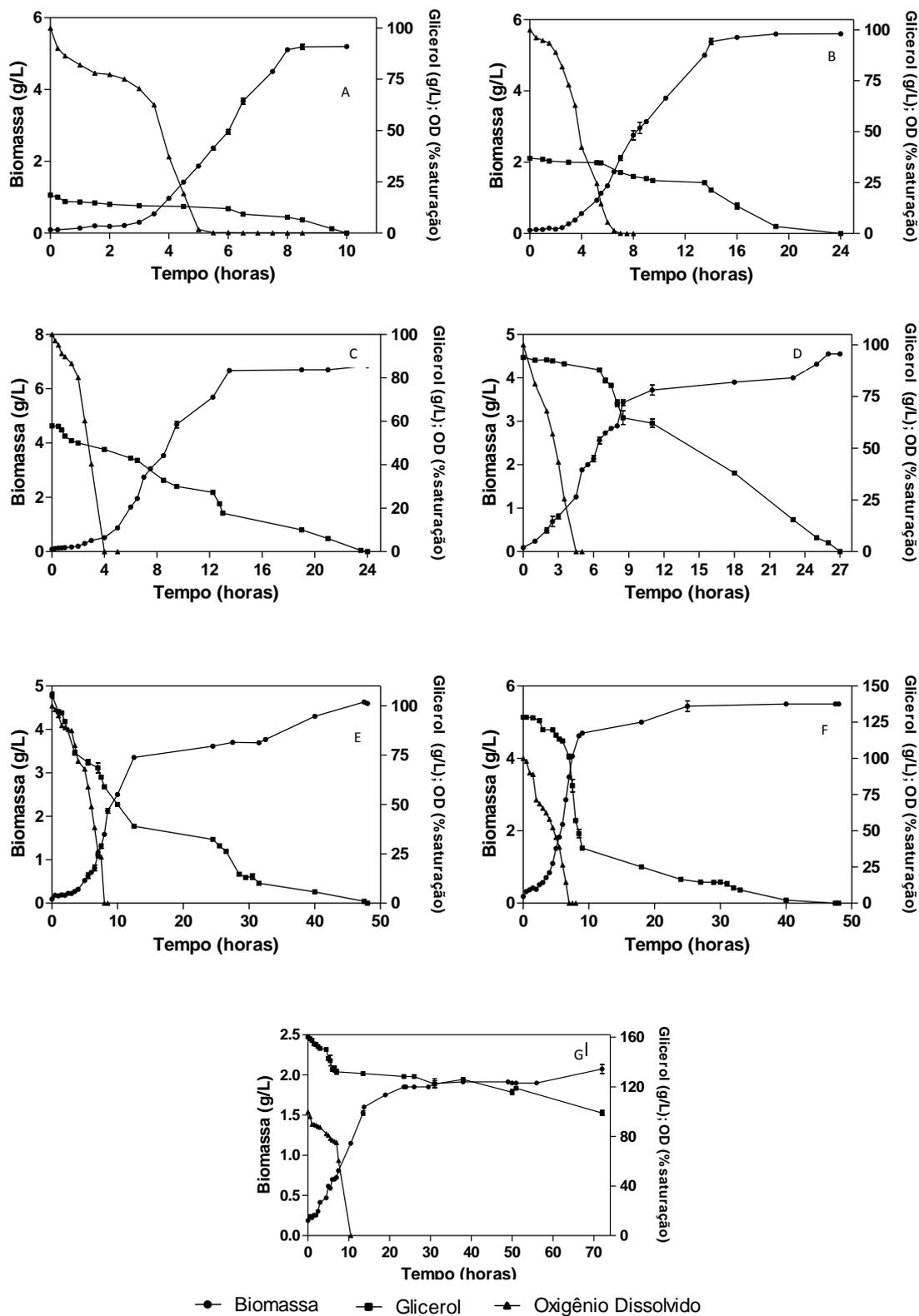


Figura 10. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido em cultivo de *Klebsiella oxytoca* nos Ensaio 15 (A), 16 (B), 17 (C), 18 (D), 19 (E), 20 (F) e 21 (G). Temperatura, 37°C; pH, 5,5; fluxo específico de ar, 0,375 vvm; frequência dos agitadores, 600 rpm.

Tabela 8. Resultados de cultivos de *Klebsiella oxytoca* em meios contendo diferentes concentrações de glicerol em biorreator. Temperatura, 37°C; pH, 5,5; fluxo específico de ar, 0,375 vvm; frequência dos agitadores, 600 rpm.

Ensaio	15	16	17	18	19	20	21
S ₀ (g/L)	18	37	60	94	105	129	160
S _f (g/L)	0	0	0	0	0	0	98
t (h)	10	24	24	27	48	48	72
X _f (g/L)	5,2	5,6	6,8	4,5	4,6	5,5	2,1
μ _{xmax} (h ⁻¹)	0,80	0,84	0,81	0,63	0,42	0,50	0,21
Y _{X/S} (g/g)	0,28	0,15	0,12	0,045	0,042	0,041	0,031
But (g/L)	4,0	9,2	17,3	32,9	37,8	53,6	17,9
Y _{P/S but} (g/g)	0,18	0,23	0,28	0,34	0,35	0,41	0,28
ρ _{but} (%)	35,9	46,4	56,2	69,9	72,0	83,7	56,3
p _{v but} (g/L/h)	0,32	0,35	0,69	1,19	0,77	1,10	0,24
Et (g/L)	2,2	2,9	5,0	6,5	3,5	6,2	0,4
Y _{P/S et} (g/g)	0,122	0,078	0,083	0,069	0,033	0,048	0,006
ρ _{et} (%)	22,0	16,0	18,0	14,0	6,0	10,0	2,0
p _{v et} (g/L/h)	0,22	0,12	0,21	0,24	0,073	0,13	0,005

S₀ - concentração inicial de glicerol;

S_f - concentração final de glicerol;

t - tempo;

X_f - concentração celular final;

μ_{xmax} - máxima velocidade específica de crescimento;

Y_{x/s} - fator de conversão em células;

But - concentração em 2,3-butanodiol;

Y_{P/S but} - fator de conversão em 2,3-butanodiol;

ρ_{but} - rendimento em 2,3-butanodiol;

p_{v but} - produtividade volumétrica em 2,3-butanodiol;

Et - concentração em etanol;

Y_{P/S et} - fator de conversão em etanol;

ρ_{et} - rendimento em etanol;

p_{v et} - produtividade volumétrica em etanol.

Em comparação com o Ensaio 17 (60 g/L), com a concentração inicial mais alta em que não se observou inibição por substrato (60 g/L), os Ensaios 18, 19 e 20 apresentaram 1,9, 2,2 e 3,1 vezes mais formação de 2,3-butanodiol, respectivamente, alcançando rendimentos de até 83,7% e produtividade de 1,1 g/L/h. Com relação ao etanol, as produções foram baixas, apresentando os melhores resultados no Ensaio 18, com produtividade de 0,24 g/L/h.

No Ensaio 21, em que foi avaliada uma concentração ainda mais elevada de glicerol (160 g/L), observou-se que o microrganismo não consumiu todo o substrato, determinando-se 98 g/L de glicerol residual, após 72 horas de processo. No final do processo ocorreu a liberação de metabólitos alcalinos, indicada pelo aumento do pH no cultivo e a hiperlimitação de oxigênio.

Nestas condições, observou-se forte redução na produção de biomassa, sendo aproximadamente um terço ao obtido no ensaio com 60 g/L de glicerol, com menor conversão de substrato em células. A geração de 2,3-butanodiol foi, também, severamente prejudicada, e a formação de etanol foi insignificante. Cabe ressaltar que os resultados de biomassa obtidos no Ensaio 21 são inferiores aos encontrados em concentrações baixas de glicerol (20 g/L), como no Ensaio 15.

Deste modo, constatou-se que concentrações iniciais de glicerol, da ordem de 160 g/L, afetam negativamente o processo, sob todos os aspectos, não se tratando, apenas, de uma queda na velocidade global do cultivo, devida à inibição pelo substrato, mas sim sua total inviabilização.

Na sequência, são discutidos alguns resultados encontrados na literatura em que é focado o efeito da concentração de diferentes substratos, e do produto formado, sobre o cultivo de *K. oxytoca*.

Sablaylorolles & Goma (1983) avaliaram o efeito da concentração de glicose no processo conduzido com *A. aerogenes* NRRL B199 (*K. oxytoca* ATCC 8724). Os autores não observaram inibição do crescimento celular pela glicose com concentrações de até 45 g/L. Já na concentração inicial de substrato mais alta que foi avaliada, 195 g/L, ocorreu uma forte redução da velocidade específica de crescimento, mas, por outro lado, os rendimentos em 2,3-butanodiol foram elevados, alcançando 90%, com 88 g/L de produto. Em contrapartida, as concentrações de biomassa celular e de etanol diminuíram, verificando-se que o metabolismo de formação de etanol é mais sensível ao excesso de substrato quando comparado ao de 2,3-butanodiol.

Em estudos com xilose, Jansen *et al.* (1983) relataram que concentrações de até 20 g/L não provocam inibição do crescimento celular, sendo que acima de 160 g/L de substrato, a concentração de xilose se tornou crítica para o crescimento celular e a formação de 2,3-butanodiol. Os autores observaram, ainda, que concentrações de 5 g/L de xilose resultam em total consumo do substrato no sentido do crescimento celular.

Silveira *et al.* (1998), utilizando o meio PC contendo sacarose, não constataram inibição até 95 g/L, tendo ainda observado o consumo completo deste substrato em ensaio com 213 g/L de concentração inicial e OTR de 16 mmol/L/h, após 40,5 h de processo. Berbert-Molina (1995), por sua vez, em cultivo em meio constituído por caldo de cana-de-açúcar suplementado com fosfato de amônio, obteve 71 g/L de 2,3-butanodiol com 181 g/L de açúcares redutores totais.

Para o uso de glicerol, Cheng *et al.* (2005) estudaram o efeito de concentrações crescentes deste substrato sobre o cultivo de *K. pneumoniae* em condições aeróbias e anaeróbias. Na ausência de oxigênio, os autores determinaram um $\mu_{x_{max}}$ de 0,19 h⁻¹ em meio com 110 g/L de glicerol, enquanto que com 133 g/L de glicerol, na presença de oxigênio, a $\mu_{x_{max}}$ foi de 0,17 h⁻¹. Com relação aos produtos, concentrações de 15, 19 e 26 g/L de acetato, lactato e etanol, respectivamente, tornam-se inibitórias para o microrganismo em cultivos anaeróbios. Em aerobiose, *K. pneumoniae* é mais resistente ao acetato e ao lactato, suportando concentrações de 24 e 26 g/L, respectivamente, enquanto que o etanol se torna tóxico em uma concentração de 17 g/L.

Através de modelagem matemática, Zeng *et al.* (2004) avaliaram o efeito inibitório do glicerol e de alguns produtos de fermentação formados por *K. pneumoniae*. Para uma faixa de pH entre 5,3 e 8,5, os resultados mostraram as seguintes concentrações críticas de substâncias que se mostraram tóxicas para a célula: 0,35 g/L de acetato, 16,6 g/L de etanol, 71,4 g/L de 1,3-propanodiol e 187,6 g/L de glicerol. Os dados deste trabalho mostram que a partir de 160 g/L, houve uma inviabilização no crescimento celular, valores mais baixos ao modelo matemático.

Como visto, a literatura mostra que elevadas concentrações de carboidratos, usados como substrato, da ordem de 200 g/L, embora inibidoras para o crescimento de *K. oxytoca*, podem ser em alguns casos completamente consumidas pelo microrganismo. Para o glicerol, no entanto, os dados deste trabalho indicam um efeito inibidor muito mais intenso, como foi o caso do Ensaio 21 ($S_0 = 160$ g/L). O glicerol é utilizado há mais de 100 anos, como agente antibacteriano e, segundo Saegeman *et al.* (2008), concentrações de 25% (m/v) desta substância são suficientes para interromper o

metabolismo celular de bactérias. Este estudo, o efeito do glicerol sobre bactérias patogênicas Gram-positivas e negativas foi avaliado, constatando-se maior sensibilidade das bactérias Gram-negativas, como é o caso de *K. oxytoca*.

A análise dos resultados mostra que, com o uso do regime descontínuo, a obtenção de uma concentração de produto elevada o suficiente para permitir que o processo seja considerado para uma escala industrial é inviável. Desta forma, a condução do processo em regime descontínuo alimentado representa como uma opção a ser avaliada para a conversão de glicerol em 2,3-butanodiol.

Nos ensaios em biorreator descritos neste item, realizou-se o balanço de oxigênio na fase gasosa do sistema, permitindo o cálculo da demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) e da velocidade específica de respiração (Q_{O_2}). Com estes dados, construiu-se a Figura 11, que relaciona Q_{O_2} com a velocidade específica de crescimento (μ_x).

Uma maior Q_{O_2} possibilita uma maior μ_x , devido à ativação das vias aeróbias, incrementado a formação de ATP e, em consequência, de biomassa microbiana, devido à maior disponibilidade de oxigênio.

Os maiores valores de Q_{O_2} são obtidos com concentrações de oxigênio acima de zero, quando também se encontra μ_{xmax} . Como discutido no item 4.3, quando o crescimento celular é nulo ($\mu_x = 0$), o microrganismo utiliza o oxigênio somente para a manutenção celular. Nesta condição, Q_{O_2} corresponde ao coeficiente de manutenção para o oxigênio (m_o).

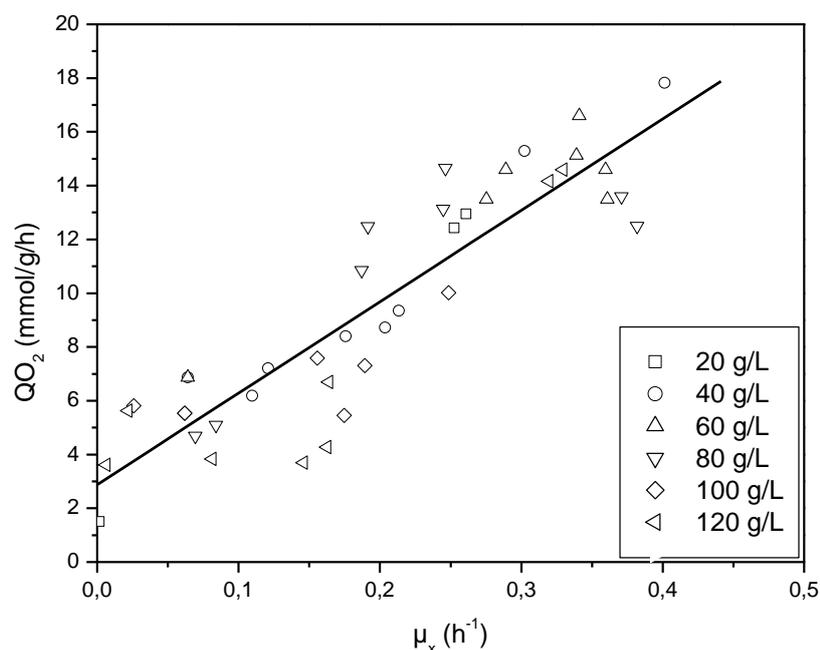


Figura 11. Variação da velocidade específica de crescimento e velocidade específica de respiração em cultivo de *Klebsiella oxytoca* nos Ensaios 15, 16, 17, 18, 19 e 20 ($R^2 = 0,90241$).

O valor obtido para m_0 de *K. oxytoca* ATCC 8724 em glicerol foi 2,9 mmol/g/h, com o fator de conversão real de oxigênio em células (Y_{GO}), determinado pelo inverso do coeficiente angular da reta mostrada na Figura 11, sendo igual a 0,029 g/mmol. Silveira *et al.* (1993), em cultivos do mesmo microrganismo em sacarose, relataram valor de m_0 inferior, 0,72 mmol/g/h, e Y_{GO} superior, 0,049 g/mmol. Apesar da pouca precisão da comparação, os dados sugerem que, para o glicerol, há menor formação de biomassa celular por oxigênio consumido, sendo menos favorável para o crescimento celular. Considerando a estrutura química dos compostos, o glicerol apresenta maior quantidade de hidrogênio, e possivelmente necessita de mais oxigênio para a sua metabolização, formando assim grande quantidade de $NADH+H^+$.

4.5 Avaliação do processo em regime descontínuo alimentado

Para viabilizar a produção de 2,3-butanodiol em escala industrial, é necessário que sejam atingidas elevadas concentrações de produto no processo fermentativo. Como visto no item 4.4, a obtenção de uma quantidade significativa de produto tem relação com a massa de substrato utilizada. Em regime descontínuo, observou-se que os melhores resultados em termos de formação de 2,3-butanodiol foram verificados com glicerol inicial de 129 g/L, obtendo-se 53,6 g/L do produto, concentração considerada insatisfatória.

Deste modo, como já discutido, a alternativa aparentemente mais viável para o processo é a sua condução em regime descontínuo alimentado, evitando, assim, a inibição provocada pelo substrato, tanto sobre crescimento celular quanto sobre a própria formação de produto.

Os Ensaios 22 e 23, em regime descontínuo alimentado, foram iniciados com concentração de glicerol não inibitória para a formação de biomassa, 60 g/L, e OTR de 17 mmol/L/h. Na sequência, sempre que a concentração do substrato decresceu a valores em torno de 40 g/L, o reator foi alimentado com lotes de meio PC contendo massas de glicerol que resultassem na presença de concentrações não inibitórias do substrato ao longo de todo o processo. No Ensaio 22, utilizou-se uma massa total de glicerol equivalente a 176 g/L em relação volume final no reator, enquanto no Ensaio 23 esta concentração equivalente foi de 202 g/L.

Como pode ser observado nas Figuras 12 e 13, ambos os ensaios mostraram perfis de crescimento e formação de produto semelhantes, mas com o Ensaio 22 (40 horas) tendo durado menos da metade do tempo do Ensaio 23 (84 horas).

Nos dois ensaios, a formação de produtos iniciou-se a partir de cerca de 5,5 horas, quando OD atingiu valor nulo. Assim, como visto em regime descontínuo, na fase limitada em oxigênio, o glicerol passou a ser convertido em produto, enquanto o crescimento celular foi progressivamente se tornando limitado. Os valores de $Y_{P/S}$ medidos ao longo do processo aumentaram com o passar do tempo, com a máxima conversão em 40 horas, 0,42 g/g (Ensaio 22) e 84 horas, 0,46 g/g (Ensaio 23). Os dados para a formação dos produtos de fermentação são resumidos na Tabela 9.

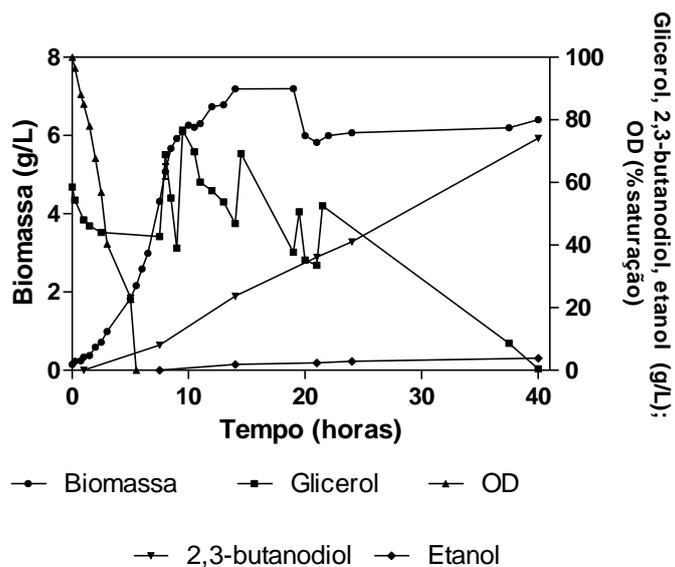


Figura 12. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol, oxigênio dissolvido e produtos em cultivo de *Klebsiella oxytoca* no Ensaio 22. Temperatura, 37°C; pH, 5,5; fluxo específico de ar, 0,375 vvm; frequência dos agitadores, 600 rpm.

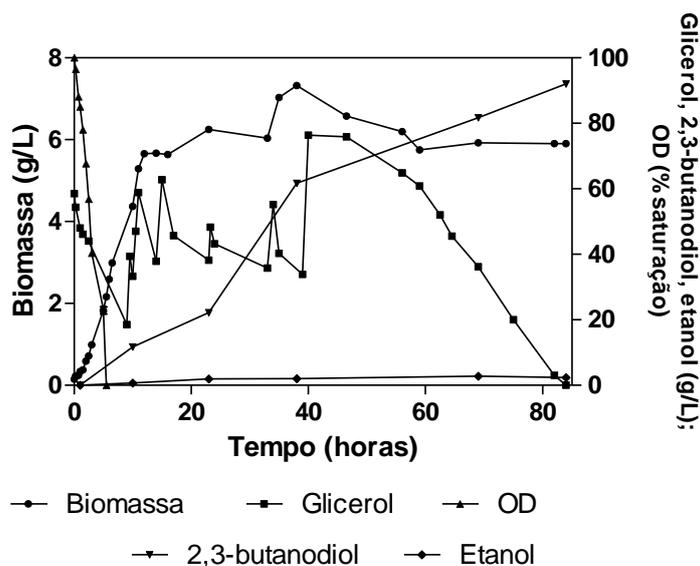


Figura 13. Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol, oxigênio dissolvido e produtos em cultivo de *Klebsiella oxytoca* no Ensaio 23. Temperatura, 37°C; pH, 5,5; fluxo específico de ar, 0,375 vvm; frequência dos agitadores, 600 rpm.

Tabela 9. Fatores de conversão em 2,3-butanodiol e em etanol em cultivos de *Klebsiella oxytoca* em meios contendo glicerol em regime descontínuo alimentado. Temperatura, 37°C; pH, 5,5; fluxo específico de ar, 0,375 vvm; frequência dos agitadores, 600 rpm.

Ensaio 22					Ensaio 23				
t	But	Y _{P/S but}	Et	Y _{P/S et}	t	But	Y _{P/S but}	Et	Y _{P/S et}
(h)	(g/L)	(g/g)	(g/L)	(g/g)	(h)	(g/L)	(g/g)	(g/L)	(g/g)
7,5	8,0	0,19	0	0	10	11,7	0,15	0,7	0,008
14	23,7	0,19	1,9	0,016	23	22,2	0,17	1,9	0,015
21	36,2	0,23	2,4	0,015	38	61,7	0,39	2,1	0,013
40	74,1	0,42	3,9	0,022	69	81,7	0,49	2,8	0,017
					84	92,1	0,45	2,4	0,012

t - tempo (h);

Y_{P/S but} - fator de conversão em 2,3-butanodiol (g/g);

But - 2,3-butanodiol (g/L);

Et - concentração em etanol (g/L);

Y_{P/S et} - fator de conversão em etanol (g/g).

Os resultados gerais dos Ensaio 22 e 23 são apresentados na Tabela 10.

Avaliando-se o tempo de cultivo, observa-se que, no Ensaio 22, todo o substrato foi consumido em 40 horas, enquanto no Ensaio 23 este tempo foi de 84 horas. A concentração final de biomassa, 7,2-7,3 g/L, foi praticamente igual nos dois ensaios, proporcionada pelo OTR e pela manutenção do substrato em níveis não inibitórios. As máximas velocidades específicas de crescimento, 0,8 h⁻¹, foram medidas nas horas iniciais de processo, durante a fase não limitada em oxigênio. Os fatores de conversão de substrato em células e em 2,3-butanodiol seguiram os comportamentos previstos nos ensaios em batelada; ou seja, no Ensaio 23, com maior massa de glicerol sendo adicionada ao meio, Y_{X/S} foi menor que o do Ensaio 22, com comportamento inverso para Y_{P/S}.

Tabela 10. Resultados de cultivos de *Klebsiella oxytoca* em meios contendo glicerol em regime descontínuo alimentado. Temperatura, 37°C; pH, 5,5; fluxo específico de ar, 0,375 vvm; frequência dos agitadores, 600 rpm.

Ensaio		22	23
S ₀	(g/L)	176	202
S _f	(g/L)	0	0
t	(h)	40	84
X _f	(g/L)	7,2	7,3
μ _{xmax}	(h ⁻¹)	0,80	0,80
Y _{X/S}	(g/g)	0,039	0,035
But	(g/L)	74,1	92,1
Y _{P/S but}	(g/g)	0,42	0,45
ρ _{but}	(%)	85,9	92,6
p _{v but}	(g/L/h)	1,83	1,09
Et	(g/L)	3,9	2,8
Y _{P/S et}	(g/g)	0,02	0,01
ρ _{et}	(%)	4,0	2,0
p _{v et}	(g/L/h)	0,09	0,03

S₀ - concentração inicial de glicerol;

S_f - concentração final de glicerol;

t - tempo;

X_f - concentração celular final;

μ_{xmax} - máxima velocidade específica de crescimento;

Y_{X/S} - fator de conversão em células;

But - concentração em 2,3-butanodiol;

Y_{P/S but} - fator de conversão em 2,3-butanodiol;

ρ_{but} - rendimento em 2,3-butanodiol;

p_{v but} - produtividade volumétrica em 2,3-butanodiol;

Et - concentração em etanol;

Y_{P/S et} - fator de conversão em etanol;

ρ_{et} - rendimento em etanol;

p_{v et} - produtividade volumétrica em etanol.

Em comparação com o Ensaio 17, em regime descontínuo e com concentração inicial de glicerol de 60 g/L, não houve muita variação dos valores de biomassa, mesmo com concentrações mais elevadas de glicerol em regime descontínuo alimentado. Com relação ao 2,3-butanodiol, embora o rendimento no Ensaio 20 tenha sido semelhante ao do Ensaio 22, a concentração final de produto neste último foi cerca de 40% maior. Em comparação ao melhor resultado em regime descontínuo (Ensaio 20), o Ensaio 23 gerou uma produtividade de 1,09 g/L/h, rendimento de 92,6% e formação de 92,1 g/L de produto, ou seja, 70% maior formação de produto que a do cultivo descontínuo. Quanto ao etanol, os rendimentos de produto foram menores nos ensaios em regime descontínuo alimentado, com baixas produtividades.

Em comparação com resultados para o processo em regime descontínuo alimentado encontrados na literatura, Silveira *et al.* (1998) realizaram um cultivo com a mesma linhagem, utilizando concentração equivalente a 219 g/L de sacarose. Com μ_{xmax} de 0,8 h⁻¹, obtiveram 80 g/L de 2,3-butanodiol, com rendimento de 90,2%, em 30,4 horas de processo. Os valores de etanol alcançaram 1,7 g/L, também com baixos rendimentos. Sugere-se que a sacarose é um carboidrato de mais fácil absorção que o glicerol e, provavelmente, por isso houve um consumo mais rápido durante a fase fermentativa; porém, em comparação ao glicerol, houve menor concentração de produto final.

Wong *et al.* (2014) avaliaram o processo em regime descontínuo em *Klebsiella* sp., mostrando um crescimento acelerado nas primeiras 24 horas e formação do produto a partir das 12 horas, sendo que a máxima velocidade de formação de produto ocorreu após 36 horas. Com 146 g/L de glicose, 57 g/L de 2,3-butanodiol foram produzidos, com um rendimento de 82%. Já em regime descontínuo alimentado, a produção de 2,3-butanodiol aumentou para 110 g/L, com rendimento de 94%, utilizando a mesma concentração equivalente de glicose em meio suplementado com 2,3 g/L de ureia como fonte de nitrogênio. Embora a produção usando a glicose como fonte de carbono tenha sido maior que a obtida nos experimentos mostrados neste item para glicerol, observou-se que o rendimento em 2,3-butanodiol foi semelhante. Estudos de Petrov & Petrova, (2010) e Cheng *et al.* (2013), em regime descontínuo alimentado com glicerol, mostraram concentração de 70 e 77 g/L, respectivamente em 2,3-butanodiol, com rendimentos inferiores aos descritos nestes resultados.

Os resultados deste trabalho demonstram claramente que o glicerol é uma adequada fonte de carbono para *K. oxytoca* ATCC 8724, permitindo que sejam atingidas, em regime descontínuo alimentado, expressivos rendimento e concentração final de produto. Pode-se, deste modo, afirmar que a produção fermentativa de 2,3-butanodiol a partir de glicerol, substância formada em consideráveis volumes na produção de biodiesel, apresenta grande potencial de ser levada à escala industrial, justificando-se, portanto, a continuação destes estudos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho demonstram que *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 é capaz de metabolizar glicerol como substrato em processos fermentativos, com rendimentos e produtividades em 2,3-butanodiol/acetoina comparáveis aos encontrados na literatura com carboidratos de fácil assimilação, como glicose e sacarose.

Experimentos com baixa velocidade característica de transferência de oxigênio (OTR) resultam em baixo crescimento celular e maior formação de produto em um tempo maior. Ao contrário, valores altos de OTR permitem um maior crescimento e baixo rendimento de produto em tempo mais curto. A alternativa mais viável para obter-se uma alta produtividade é, portanto, utilizar-se um OTR intermediário.

Em regime descontínuo, concentrações de glicerol de até 60 g/L, não são inibitórias para o crescimento celular. Porém, concentrações elevadas, da ordem de 160 g/L, reduzem significativamente o crescimento celular e o rendimento em 2,3-butanodiol/acetoina, não ocorrendo consumo completo do substrato.

Em qualquer condição, dentre as testadas, a formação de etanol se mostrou pouco relevante, provavelmente em razão de esta não ser uma via metabólica favorável para oxidação de coenzimas reduzidas por *K. oxytoca*.

K. oxytoca apresenta, em meios com glicerol um coeficiente de manutenção para o oxigênio maior que o descrito na literatura para a sacarose e um fator de conversão real de oxigênio em células menor.

Em cultivos em regime descontínuo alimentado, com 60 g/L de substrato inicial e alimentação com massa de glicerol equivalente a 202 g/L de substrato em relação ao volume final, é possível alcançar concentração de 2,3-butanodiol/acetoina de 92,1 g/L, com rendimento de 92,6% e produtividade de 1,09 g/L/h.

Como perspectivas para a continuidade desta pesquisa, sugere-se a avaliação do uso do glicerol residual da produção de biodiesel como substrato e a otimização do meio de produção, como formas de reduzir os custos dos insumos utilizados no processo, e, ainda, a definição da estratégia ideal de alimentação de substrato em regime descontínuo alimentado, visando ao aumento da produtividade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional do Petróleo. **Agência Nacional do Petróleo, gás natural e biocombustível**, disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acessado em: 12/10/2014.
- 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.
- Alves, M.M.; Abreu, A.A. (2006) Produção de hidrogênio a partir de resíduos. **Revista Eletrônica da Universidade do Minho**, disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/5858>>. Acessado em: 27/02/2012.
- 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.
- Anvari, M.; Motlagh, M.R.S. (2011). Enhancement of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* PTCC 1402. **J. Biomed. Biotechnol.** 2011: 1-7.
- Apolinario, F.D.B.; Pereira, G.F.; Ferreira, J.P. (2012). Biodiesel e alternativas para a utilização da glicerina resultante do processo de produção de biodiesel. **Rev. Proj. Univ. Petrobras e IF Fluminense**. 2: 141-146.
- Arruda, P.V.; Rodrigues, R.C.L.B.; Felipe, M.G.A. (2007). Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Rev. Anal.** 26: 56-62.
- Beckers, L.; Hiligsmann, S.; Hamilton, C.; Masset, J.; Thonart, P. (2010). Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. **Biotechnol. Soc. Environ.** 14: 541-548.
- 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.
- 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. **Z. Naturforsch.** 56c: 787-791.
- Beronio, J.P.B.; Tsao, G.T. (1993). Optimization of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* through oxygen transfer rate control. **Biotechnol. Bioeng.** 42: 1263-1269.
- Biodiesel Brasil. **Portal do Biodiesel do Brasil**, disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>. Acessado em: 12/10/2014.

- Brisse, S.; Grimont, F.; Grimont, P.A.D. (2006). The genus *Klebsiella*. **Prokaryotes**. 6: 159-196.
- Carra, S. (2012). Estudo cinético de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. **Dissertação de mestrado**. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.
- 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.
- Converti, A.; Perego, P. (2002). 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.
- De Mas, C.; Jansen, N.B.; Tsao, G.T. (1988). Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. **Biotechnol. Bioeng.** 31: 366-377.
- Demirbas, M.F.; Balat, M. (2006). Recent advances on the production and utilization trends of biofuels: a global perspective. **Energy Convers. Manage.** 47: 2371-2381.
- Dharmadi, Y.; Murarka, A.; Gonzalez, R. (2006). Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnol. Bioeng.** 94: 821-829.
- Dillis, S.S.; Apperson, A.; Schmidt M.R.; Saier M.H. (1980). Carbohydrate transport in bacteria. **Microbiol. Rev.** 44: 385-418.
- Garg, S.K.; Jain, A. (1994). Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. **Bioresour. Technol.** 51: 103-109.
- Girbal, L.; Croux, C.; Vasconcelos, I.; Soucaille, P. (1995). Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **FEMS Microbiol. Rev.** 17: 287-297.
- Gilbal, L.; Soucaille, P. (1998). Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. **Tibtech.** 16: 11-16.
- Han, S.H.; Lee, L.E.; Park, K.; Park, Y.C. (2013). Production of 2,3-butanediol by a low-acid producing *Klebsiella oxytoca* NBRF4. **New Biotechnol.** 30(2): 166- 172.

- Hawkes, F.R.; Hussy, I.; Kyazze, G., Dinsdale, R.; Hawkes, D.L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. **Int. J. Hydrogen Energy**. 32: 172-184.
- Jansen, N.B.; Flickinger, M.C.; Tsao, G.T. (1983). 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.; Nie, Z.K. (2009). Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. **Bioresour. Technol.** 100: 5214-5218.
- Ji, X.J.; Huand, H.; Zhu, J.G.; Ren, L.J.; Nie, Z.K.; Du, J. (2010). Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,0-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 85: 1751- 1758.
- Ji, X.J.; Huang, H.; Ouyang, P.K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: a state of the art – a review. **Biotechnol. Adv.** 29: 351-364.
- Kapdan, I.K; Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme Microb. Technol.** 38: 569-582.
- Kim, D.K.; Rathnasing C.; Song, H.; Lee, H.J.; Seung, D.; Chang, Y.K. (2013). Metabolic engineering of a novel *Klebsiella oxytoca* strain for enhanced 2,3-butanediol production. **J. Biosci. Bioeng.** 116 (2): 186-192.
- Lages, F.; Lucas, C. (1997). Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.** 1322: 8-18.
- 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.
- Meher, L.C., Sagar, D.V.; Naik, S.N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Ren. Sust. En. Rev.** 10: 248-268.
- Mendes, F. (2011). Production of glycerol and 1,3-propanediol from renewable resources: study of new biocatalysts and process strategies. **Dissertação de Pós-doutorado**. Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa. Lisboa, Portugal.
- Moo-Young, M.; Blanch, H.W. (1989). Transport phenomena and bioreactor design. **Basic Biotechnol.** Academic Press, v. 3, p. 135-151.

- 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.
- Neves, L.M.V. (2009). Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis. **Dissertação de Mestrado.** Departamento de Química, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Olson, B. H.; Johnson, M. J. (1948). The production of 2,3-butylene-glycol by *Aerobacter aerogenes* 199. **J. Bacteriol.** 55: 209-222.
- Ooi, T.L.; Yong, K.C.; Hazimah, A.H; Dzulkefly, K.; Wan-yunus, M.Z. (2004). Glycerol residue – a rich source of glycerol and médium chain fatty acids. **J. Oleo Sci.** 53: 29-33.
- Park, J.M.; Song, H., Lee, H.J.; Seung, D. (2013). Genome-scale reconstruction and *in silico* analysis of *Klebsiella oxytoca* for 2,3-butanediol production. **Microbial. Cell Fact.** 12(20): 1-20.
- Perego, P.; Converti, A., Borghi, A.D.; Canepa, P. (2000). 2,3-butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal condicions and application to food industry residues. **Bioprocess Eng.** 23: 613-620.
- 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. (1975). **Principles of microbe and cell cultivation.** Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 90-93.
- 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.
- Qin, J.; Xiao, Z.; Ma, C.; Xie, N.; Liu, P.; Xu, P. (2006). Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. **Chin. J. Chem. Eng.** 14: 132- 136.
- 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.
- Rossi, D.M.; Costa, J.B.; Souza, E.A.; Peralba, M.C.R.; Samios, D.; Ayub, M.A.A.Z. (2011). Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **Inter. J. Hydrogen Energy.** 36: 4814-4819.
- Rossi, D.M.; Costa, J.B.; Souza, E.A.; Peralba, M.C.R.; Ayub, M.A.Z. (2012). Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and

- ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. **Renew. Energy.** 39: 223-227.
- 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.
- Saegeman, V.S.M.; Ectors, N.L.; Lismont, D.; Verduyck, B.; Verhaegen, J. (2008). Short and long-term bacterial inhibiting effect of high concentrations of glycerol used in preservation of skin allografts. **Burns.** 34: 205-211.
- Saha, B.C.; Bothast, R.J. (1999). Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52: 321- 326.
- Sakai, S.; Yagishita, T. (2007). Microbial production of hydrogen and ethanol from glycerol-containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with thionine. **Biotechnol. Bioeng.** 8: 340-348.
- Schumpe, A.; Quicker, G. (1982). Gas Solubilities in microbial culture media. **Adv. Biochem. Eng.** 24: 1-38.
- 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. (1991). Estudo cinético da fermentação butílico glicólica de sacarose por *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. **Tese de doutorado.** Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 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. Biotechnol.** 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(3): 329-334.
- Umpierre, A.P.; Machado, F. (2013). Gliceroquímica e valorização do glicerol. **Rev. Virtual Quím.** 5(1): 106-116.
- Vasconcelos, Y. (2012). Resíduos bem-vindos. **Pesquisa Fapesp.** 196: 58-63.
- 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, H.Y. (1985). Analysis of fermentation gases. In: Moo-Young, M. **Comprehensive biotechnology: the principles, application and regulation of biotechnology in industry, agriculture and medicine.** Pergamon Press, p. 423-431.

- Wang, Z-X.; Zhuge, J.; Fang, H.Y.; Prior, B.A. (2001) Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnol. Adv.** 19: 201-223.
- Wang, J.; Wan, W. (2008). Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **Int. J. Hydrogen Energy.** 33: 5392-5397.
- Wang, J.; Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. **Int. J. Hydrogen Energy.** 34: 799-811.
- Wong, C.L.; Ywn, H.W.; Lin, C.L.; Chan, J. S. (2014). Effect of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolate *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. **Bioresour. Technol.** 152: 169- 176.
- Wu, Z.L.; Saratale, G.D.; Lo, Y.C.; Chen, W.M.; Tseng, Z.J.; Chang, M.C.; Tsai, B.C.; Su, A.; Chang, J.S. (2008). Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. **Bioresour. Technol.** 99: 7966-7970.
- Xiu, Z.L.; Chen, X.; Sun, Y.Q; Zhang, D.J. (2007). Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose cofermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. **Biochem. Eng. J.** 33:42-52.
- Yu, E.K.C.; Saddler, J.N. (1983). Fed-Batch approach to production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate concentration. **Appl. Environ. Microbiol.** 46(3): 630- 635.
- Zeng, A.P.; Posten, T.G.; Deckwer, W.D. (1994). Use of respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. **Biotechnol. Bioeng.** 44: 1107-1114.
- Zeng, A.P.; Ross, A.; Biebl, H.; Tag, C.; Gunzel, B.; Deckwer, W.D. (2004). Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 44(8): 902-911.
- Zhang, Y.; Huang, Z.; Du, C.; Li, Y.; Cao, Z. (2009). Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. **Metab. Eng.** 11: 101-106.