

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

**EMPREGO DO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO NA
PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE 2,3-BUTANODIOL POR**
Enterobacter aerogenes ATCC 13048

VIVIANE GIRARDI

CAXIAS DO SUL

2014

VIVIANE GIRARDI

**EMPREGO DO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO NA
PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE 2,3-BUTANODIOL POR
Enterobacter aerogenes ATCC 13048**

Dissertação apresentada 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 M. da Silveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi

CAXIAS DO SUL, 2014

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

G521e Girardi, Viviane, 1987-
Emprego do glicerol como fonte de carbono na produção fermentativa de 2,3-butanodiol por *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 / Viviane Girardi. – 2014.
vi, 85 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Maurício M. da Silveira ; Coorientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi.

1. Biocombustíveis. 2. Bactérias - *Enterobacter aerogenes* 3. Fermentação. 4. Dióxido de carbono. I. Título.

CDU 2.ed.: 620.91

Índice para o catálogo sistemático:

1. Biocombustíveis	620.91
2. Bactérias - <i>Enterobacter aerogenes</i>	561.23
3. Fermentação	663.14/.16
4. Dióxido de carbono	621.654.2

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Roberta da Silva Freitas – CRB 10/1730

VIVIANE GIRARDI

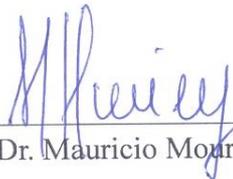
EMPREGO DO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO
FERMENTATIVA DE 2,3-BUTANODIOL POR *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

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

Orientador: Prof.Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24 DE NOVEMBRO DE 2014.



Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira



Co-orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi



Profa. Dra. Marília Amorim Berbert de Molina



Profa. Dra. Aline Dettmer



Profa. Dra. Marli Camassola

*A minha mãe Fátima e a minha irmã Mônica
que sempre estiveram ao meu lado apoiando
minhas escolhas e acreditando nos meus
sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as pessoas e instituições que foram importantes na realização deste trabalho:

- à Universidade de Caxias do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela estrutura física e recursos humanos imprescindíveis.

- à Petrobrás S.A., CNPq e FAPERGS que financiam o projeto e fornecem as bolsas de estudo e iniciação científica.

- aos membros da banca de avaliação, Profa. Dra. Marília Amorim Berbert de Molina, Profa. Dra. Marli Camassola e Profa. Dra. Aline Dettmer Marilia, pela disponibilidade de avaliação deste trabalho e pelas importantes contribuições.

- à Dra. Fernanda Bettin, por toda ajuda na revisão da dissertação, amizade e por todos os momentos de descontração.

- ao meu orientador Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira um profissional que admiro muito, exemplo de professor que sempre seguirei, por todos os ensinamentos, paciência e orientação indispensável, e principalmente por acreditar na minha capacidade.

-à minha co-orientadora Profa. Dra. Eloane Malvessi sempre disposta a ajudar e corrigir trabalhos, me ensinando desde a iniciação científica o quanto a pesquisa é importante, fazendo assim com que hoje eu me tornasse uma pessoa profissionalmente melhor.

-às bolsistas de iniciação científica Bruna Barsé, Christine Becker, Caroline Hartmann e Letícia Oliboni por todo o comprometimento e ajuda indispensável neste trabalho. Especialmente a Carol que acompanhou todo o trabalho, desde o início até os ensaios em regime descontínuo alimentado, cultivos que demandavam a presença nas mais diversas horas do dia e da noite e também nos finais de semana.

-a todos os colegas do Laboratório de Bioprocessos, especialmente à Sabrina Carra que auxiliou no início do trabalho, no desenvolvimento de métodos analíticos e também à Patrícia Poletto e a Lenara Meneghel amigas que conquistei, presentes comigo desde a iniciação científica, por estarem sempre dispostas a me ajudar, ouvir minhas lamentações, e sempre me falarem palavras de conforto me incentivando a nunca desistir.

- à equipe da Central Analítica do Instituto de Biotecnologia, em especial ao Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva e a Dra. Fabiana Agostini pela disposição de equipamento para análise das amostras.

- à minha mãe Fátima Verlindo e à minha irmã Mônica Girardi, por sempre me ensinarem a nunca desistir de nada por mais difícil que seja, por todo o incentivo, por acreditarem nos meus sonhos e apoiarem minhas escolhas, minha mãe é exemplo de mulher batalhadora, determinada e hoje sou o que sou graças a ela.

- ao meu esposo Rafael Gelain por toda paciência, por sempre estar ao meu lado, pela compreensão das minhas ausências, por todo o apoio e por acreditar nos meus ideais.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Histórico, propriedades e aplicações de 2,3-butanodiol	3
2.2 Microrganismos relacionados à produção fermentativa de 2,3-butanodiol.....	4
2.3 Glicerol: características, obtenção e aplicações	5
2.4 Conversão microbiológica do glicerol.....	9
2.5 Parâmetros de processo que influenciam a produção de 2,3-butanodiol.....	13
2.5.1 pH.....	13
2.5.2 Temperatura	14
2.5.3 Concentração inicial de substrato	15
2.5.4 Suprimento de oxigênio	16
2.5.5 Formas de condução do processo fermentativo	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Microrganismo.....	21
3.2 Meios de cultura	21
3.3 Preparo dos inóculos.....	22
3.4 Descrição do fermentador.....	22
3.5 Métodos analíticos	24
3.5.1 Coleta e preparo das amostras	24
3.5.2 Concentração celular.....	25
3.5.3 Concentração de glicerol.....	26
3.5.4 Concentração de produtos da fermentação	26
3.6 Medição de outros parâmetros.....	26
3.6.1 Oxigênio dissolvido	26
3.6.2 Pressão	27

3.6.3 Temperatura do fluxo gasoso.....	27
3.6.4 Oxigênio e dióxido de carbono no fluxo gasoso.....	27
3.7 Cálculo de parâmetros de avaliação	28
3.7.1 Fatores de conversão, produtividade volumétrica e rendimento	28
3.7.2 Velocidade específica de crescimento celular	29
3.7.3 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.....	29
3.7.4 Demanda de oxigênio pelo cultivo	30
3.7.5 Concentração de oxigênio na saturação	30
3.7.6 Máxima velocidade de transferência de oxigênio.....	31
3.8 Ensaio realizados.....	31
3.8.1 Cultivos conduzidos em regime descontínuo	31
3.8.2 Cultivos conduzidos em regime descontínuo alimentado.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Efeito da concentração de glicerol em cultivos em regime descontínuo com baixa velocidade de transferência de oxigênio.....	34
4.2 Efeito da concentração de glicerol em cultivos em regime descontínuo com alta velocidade de transferência de oxigênio.....	50
4.3 Avaliação do processo conduzido em regime descontínuo alimentado sob condições variáveis de agitação e aeração.....	63
4.4 Avaliação do processo conduzido em regime descontínuo alimentado sob condições constantes de agitação e aeração	66
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO - Avaliação preliminar do cultivo de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 em meio contendo glicerol residual da indústria de biodiesel	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estereoisômeros de 2,3-butanodiol.....	3
Figura 2 - Derivados de 2,3-butanodiol.....	4
Figura 3 - Principais famílias, gêneros e espécies produtoras de 2,3-butanodiol.....	5
Figura 4 - Estrutura molecular do glicerol.....	6
Figura 5 - Reação de transesterificação de um triglicerídeo com etanol (alcoólise), utilizando NaOH como catalisador, com a formação de biodiesel e glicerol.....	6
Figura 6 - Produção mundial e preços do glicerol.....	7
Figura 7 - Produção e capacidade nominal autorizada pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis em agosto de 2014 (www.anp.gov.br).....	8
Figura 8 - Via metabólica de assimilação do glicerol por bactérias anaeróbias facultativas para formação de 1,3-propanodiol, em condições de anaerobiose.....	10
Figura 9 - Vias metabólicas de conversão do glicerol em piruvato por bactérias anaeróbias facultativas.....	11
Figura 10 - Vias metabólicas de conversão do piruvato em produtos por bactérias anaeróbias facultativas.....	12
Figura 11 - <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048, aspecto dos bacilos obtidos de meio fermentado em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Imagem obtida do Laboratório de Caracterização de Materiais, Universidade de Caxias do Sul.....	21
Figura 12 - Sistema de amostragem acoplado ao fermentador.....	23
Figura 13 - Sistema utilizado nos cultivos de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 em biorreator de agitação mecânica New Brunswick BioFlo/CelliGen 115 (EUA).....	24
Figura 14 - Exemplo de curva de calibração utilizada na determinação da concentração celular.....	25
Figura 15 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (12,9 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 1 ($S_0 = 20$ g/L).....	35
Figura 16 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (11,8 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 2 ($S_0 = 40$ g/L).....	36
Figura 17 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (11,0 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 3 ($S_0 = 60$ g/L).....	37

- Figura 18** - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (10,5 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 4 ($S_0 = 80$ g/L).....38
- Figura 19** - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (10,3 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 5 ($S_0 = 100$ g/L).....39
- Figura 20** - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (9,6 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 6 ($S_0 = 140$ g/L).....40
- Figura 21** - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (9,7 mmol/L/h), 500rpm, 0,50vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 7 ($S_0 = 180$ g/L). Adição ao meio de cultivo dos sais nutrientes fosfato e sulfato de amônio (8 e 6 g, respectivamente, dissolvidos em 10 mL de água destilada) em 48 h de ensaio e 56 h de ensaio.....41
- Figura 22** - Variação nos valores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) com o tempo em cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (12,9 a 9,7 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5.....49
- Figura 23** - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (22,8 - 34,4 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 8 ($S_0 = 40$ g/L).....51
- Figura 24** - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (22,5 - 32,0 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 9 ($S_0 = 60$ g/L).....52
- Figura 25** - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (20,8 - 30,4 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 10 ($S_0 = 100$ g/L).....53
- Figura 26** - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (19,4 - 28,5 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 11 ($S_0 = 140$ g/L). Adição ao meio de cultivo dos sais nutrientes fosfato e sulfato de amônio (8 e 6 g, respectivamente, dissolvidos em 10 mL de água destilada) em 30 h de ensaio.....54

Figura 27 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (15,8 - 24,0 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 12 ($S_0 = 180$ g/L). Adição ao meio de cultivo dos sais nutrientes fosfato e sulfato de amônio (8 e 6 g, respectivamente, dissolvidos em 10 mL de água destilada) em 55 h de ensaio.....55

Figura 28 - Variação nos valores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (22,8 a 24,0 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5.....62

Figura 29 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 sob condições variáveis de agitação e aeração,(650-750rpm, 0,50-0,87vvm), a 37°C, pH 5,5 (Ensaio 13).....64

Figura 30 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e da demanda de oxigênio no cultivo com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 sob condições constantes de agitação e aeração (750rpm- 0,50 vvm), a 37°C, pH 5,5 (Ensaio 14).....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Processos fermentativos para obtenção de 2,3-butanodiol com a utilização de diferentes substratos e formas de cultivo por *Klebsiella pneumoniae*.....19

Tabela 2 - Condições operacionais utilizadas nos ensaios conduzidos em regime descontínuo.....32

Tabela 3 - Resultados gerais dos cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, a 37°C, pH 5,5, 500 rpm, 0,50 vvm, com concentrações crescentes de glicerol e baixa velocidade de transferência de oxigênio (12,9 a 9,7 mmol/L/h).....45

Tabela 4 - Resultados gerais dos cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em termos de transferência de oxigênio, a 37°C, pH 5,5, com concentrações crescentes de glicerol.....58

Tabela 5 - Resultados gerais dos cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, a 37°C, pH 5,5, 650 - 750 rpm, 0,50 - 0,87 vvm, com concentrações crescentes de glicerol e alta velocidade de transferência de oxigênio (22,8 a 24,0 mmol/L/h).....59

Tabela 6 - Resultados gerais do cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, a 37°C, pH 5,5, sob condições variáveis de agitação e aeração, 650 - 750 rpm, 0,50 - 0,87 vvm, conduzido em regime descontínuo alimentado.....65

Tabela 7 - Resultados gerais do cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, a 37°C, pH 5,5, sob condições constantes de agitação e aeração, 750 rpm - 0,50 vvm, conduzido em regime descontínuo alimentado.....69

RESUMO

Neste trabalho, estudou-se o uso de glicerol como fonte de carbono para o crescimento celular e a produção de 2,3-butanodiol/acetoína em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. A influência da concentração inicial do substrato (S_0) e da velocidade de transferência de oxigênio (OTR) foi avaliada em ensaios em regime descontínuo. Inicialmente, foram realizados cultivos com S_0 na faixa aproximada de 20 a 180 g/L, frequência dos agitadores de 500 rpm e fluxo específico de ar de 0,50 vvm, correspondendo a uma OTR característica entre 10 e 13 mmol/L/h, aproximadamente. Na sequência, foram conduzidos ensaios com S_0 na faixa de 40 a 180 g/L, com variações da frequência dos agitadores (650 a 750 rpm) e do fluxo específico de ar (0,50 a 0,87 vvm), a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido próxima a 30% da saturação pelo mais longo período possível durante o processo. Os valores de OTR característica para as condições de maiores frequência de agitadores (750 rpm) e fluxo específico de ar (0,87 vvm), com a mais alta e a mais baixa concentrações de glicerol, foram de cerca de 34 e 24 mmol/L/h, respectivamente. Em regime descontínuo, S_0 de até 60 g/L não provocou inibição do crescimento de *E. aerogenes*, independentemente da OTR utilizada, sendo obtidos valores de máxima velocidade específica de crescimento (μ_{Xm}) de 0,70 e 0,73 h⁻¹, respectivamente para baixa e alta OTR. Por outro lado, S_0 da ordem de 180 g/L provocou forte inibição no crescimento celular, especialmente sob baixa OTR, não havendo consumo completo do glicerol. No grupo dos ensaios com baixa OTR, maior concentração final de 2,3-butanodiol/acetoína (63,6 g/L) foi obtida com S_0 quantificada de 146,4 g/L, mas o mais alto rendimento (91,8 %) foi alcançado com $S_0 = 92,7$ g/L. Nos cultivos com alta OTR, a máxima concentração de produtos de 46,8 g/L foi atingida com S_0 de 183,9 g/L, enquanto o rendimento máximo de 70% foi alcançado com $S_0 = 102,5$ g/L. O incremento de OTR favoreceu a produtividade e o rendimento em células, mas prejudicou a conversão de glicerol em produtos. Em seguida, foram realizados dois cultivos em regime descontínuo alimentado, a fim de evitar-se a inibição provocada por altas concentrações de glicerol e permitir que elevadas concentrações de 2,3-butanodiol/acetoína fossem atingidas. O primeiro ensaio foi realizado sob as condições de alta OTR definidas e o ensaio seguinte sob frequência de agitadores de 750 rpm e fluxo específico de ar de 0,50 vvm. A massa de glicerol empregada correspondeu à que seria necessária para ter-se um S_0 de 240 g/L em batelada. No cultivo com alta OTR, foi atingida concentração de produtos de 90,4 g/L após 56 h, correspondendo a um rendimento de 83,2% e a uma produtividade de 1,61 g/L/h. No ensaio com 750 rpm e 0,50 vvm, foram obtidos 102,6 g/L de produtos em 74 de processo, com rendimento de 94,7% e produtividade de 1,37 g/L/h. Nos tempos finais dos cultivos alimentados, foi observado aumento da concentração de oxigênio no meio, redução da demanda de oxigênio e consumo incompleto do glicerol, dados que indicam a ocorrência de inibição da atividade respiratória da bactéria pelas altas concentrações de produtos presentes no meio. Os resultados permitem concluir que o glicerol é um substrato adequado para a produção de 2,3-butanodiol/acetoína por *E. aerogenes*.

Palavras-chave: *Enterobacter aerogenes*, glicerol, 2,3-butanodiol/acetoína, efeito da concentração de substrato, efeito do oxigênio, cultivo em regime descontínuo alimentado.

ABSTRACT

In this work, the use of glycerol as carbon source for cell growth and 2,3-butanediol/acetoin production in the in cultivation of *Enterobacter aerogenes* ATTT 13048 was studied. The influence of initial substrate concentration (S_0) and oxygen transfer rate (OTR) was assessed in batch-mode experiments. Initially, cultivations with S_0 of approximately 20 to 180 g/L, impeller speed of 500 rpm and specific air flow rate of 0.50 volume of air per volume of medium per minute (vvm), corresponding to characteristic OTR values between 10 and 13 mmol/L/h approximately, were performed. In the sequence, runs with S_0 in the range 40 to 180 g/L, with varying impeller speed (650 to 750 rpm) and specific air rate (0.50 to 0.87 vvm) were carried out to maintain the dissolved oxygen concentration close to 30% of saturation as long as possible during the process. Characteristic OTR values for the conditions with the upper-limit impeller speed (750 rpm) and specific air flow rate (0.87 vvm) were about 34 and 24 mmol/L/h for the lowest and highest glycerol concentrations, respectively. In batch mode, for any OTR evaluated, S_0 values up to 60 g/L did not result in growth inhibition of *E. aerogenes*, with maximum specific growth rates ($\mu_{X,m}$) of 0.70 and 0.73 h⁻¹ being measured for low and high OTR, respectively. On the other hand, an S_0 of about 180 g/L led to a strong cell growth inhibition, especially under low OTR condition, and glycerol consumption was incomplete. In the group of runs performed with low OTR, the largest final 2,3-butanediol/acetoin final concentration (63.6 g/L) was achieved with a measured S_0 of 146.4 g/L, but the highest yield was attained with $S_0 = 92.7$ g/L. In the cultivations under high OTR, the maximum final product concentration (46.8 g/L) was obtained with $S_0 = 92.7$ g/L, whereas the maximum yield of 70% was achieved with $S_0 = 102.5$ g/L. Increasing OTR values favored productivity and cell yield but, however, resulted in decreasing conversion of glycerol to products. Afterwards, two fed-batch cultivations were done to avoid the strong inhibition due to high glycerol concentrations, and to allow that elevated concentrations of 2,3-butanediol/acetoin could be achieved. The first fed-batch run was carried out at the high-OTR conditions previously defined and the second one with impeller speed of 750 rpm and specific air flow rate of 0.50 vvm. The mass of glycerol employed corresponded to that needed to have an S_0 of 240 g/L in batch-mode. With high OTR, a final product concentration of 90.4 g/L was quantified after 56 h of process, that means a yield of 83.2% and a productivity of 1.61 g/L/h,. In the experiment with 750 rpm and 0.50 vvm, 102.6 g/L of products were obtained after 74 h, with a yield of 94.7% and a productivity of 1.37 g/L/h. During the final hours of the fed-batch cultivations, increasing oxygen concentrations, decreasing oxygen uptake rate and incomplete glycerol consumption were observed, these data indicating the occurrence of inhibition of the bacterium respiratory activity by the high product concentrations which were present in the medium. The results allow concluding that glycerol is an adequate substrate for the production of 2,3-butanediol/acetoin by *E. aerogenes*.

Keywords: *Enterobacter aerogenes*, glycerol, 2,3-butanediol/acetoin, effect of substrate concentration, effect of oxygen, fed-batch mode cultivation.

1. INTRODUÇÃO

A produção de biocombustíveis no Brasil tem sido cada vez mais incrementada, com destaque, nos últimos anos, para o biodiesel. No entanto, no processo de produção de biodiesel, há uma expressiva formação de glicerol como subproduto, na base de 10% em relação ao volume de biocombustível produzido. Assim, considerando-se a crescente produção de biodiesel no país, um volume cada vez maior de glicerol será gerado, influenciando negativamente no custo de produção do biocombustível, em razão da necessidade de dar-se um tratamento adequado a este resíduo. Acrescente-se que, devido ao fato de este glicerol apresentar elevado teor de impurezas, suas aplicações industriais convencionais se tornam praticamente inviáveis.

Por outro lado, no Rio Grande do Sul, principal estado produtor de biodiesel do País, fontes de substratos açucarados para o emprego em bioprocessos, como a cana-de-açúcar, são escassas, por razões climáticas e, principalmente, pela existência de uma matriz agrícola bem definida. Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2014), no Estado, há nove empresas produtoras de biodiesel, em um total de quatorze da Região Sul, com produção acumulada em 2014, até o mês de agosto, superando 590.000 m³. Com isso, pode-se estimar que o total de glicerol residual gerado se aproxima de 60.000 m³ mensal.

A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado é uma alternativa relevante para a valorização da produção do biodiesel. O glicerol pode, por exemplo, substituir carboidratos como a sacarose e a glicose na obtenção de metabólitos, como o 2,3-butanodiol. Este composto e seus derivados possuem potencial aplicação na indústria de plásticos e na produção de solventes, como agente aromatizante altamente valorizado em produtos alimentares e como aditivo de combustíveis. Além disso, o valor calorífico do 2,3-butanodiol (27,198 J/g) se compara favoravelmente ao de outros combustíveis líquidos, como o metanol (22,081 J/g) e o etanol (29,055 J/g). Entre os microrganismos capazes de metabolizar glicerol e ter como produto principal o 2,3-butanodiol, destacam-se as bactérias anaeróbias facultativas *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*.

No ano de 2012, a Universidade de Caxias do Sul e a Petrobrás iniciaram o desenvolvimento de pesquisas conjuntas que visam à utilização de resíduos da produção de biocombustíveis, entre estes o glicerol, para a obtenção de produtos de interesse industrial,

como hidrogênio, biogás e, também, 2,3-butanodiol, com os estudos do presente trabalho se situando neste contexto.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo geral estudar o uso de glicerol como fonte de carbono para a produção de 2,3-butanodiol por *E. aerogenes* ATCC 13048, considerando a influência dos parâmetros operacionais fundamentais –concentração inicial de substrato e suprimento de oxigênio – sobre o desenvolvimento microbiano e a formação dos produtos. Nos estudos, os objetivos específicos foram os seguintes:

- avaliar a influência de concentrações iniciais crescentes de glicerol em ensaios conduzidos com baixa transferência de oxigênio em regime descontínuo;
- avaliar o efeito de concentrações iniciais crescentes de glicerol em ensaios conduzidos com alta transferência de oxigênio em regime descontínuo;
- estudar a formação dos produtos e o desenvolvimento microbiano em cultivos realizados em regime descontínuo alimentado, a fim de minimizar os efeitos negativos causados por altas concentrações iniciais de glicerol e atingir elevadas concentrações finais de produto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico, propriedades e aplicações de 2,3-butanodiol

A produção microbiológica de 2,3-butanodiol tem um histórico de mais de cem anos. As pesquisas deste composto foram relatadas primeiramente em 1906, por Harden & Walpole. Neste estudo, foi utilizada a bactéria *Aerobacter aerogenes* (hoje identificada como *Klebsiella pneumoniae*) na produção de 2,3-butanodiol, empregando como substrato glicose e manitol (Ji *et al.*, 2011).

Durante a Segunda Guerra Mundial, com a escassez de matérias-primas para a produção de borracha, o interesse na produção fermentativa de 2,3-butanodiol foi intensificado. O objetivo fundamental era a obtenção de 1,3-butadieno, intermediário na produção de borracha sintética. No entanto, com o fim da guerra, o interesse diminuiu, uma vez que a obtenção de 1,3-butadieno a partir de derivados do petróleo passou a ter um custo reduzido (Celinska & Grajek, 2009). Já na década de 1970, o aumento no preço do petróleo, fez com que o empenho na produção de 2,3-butanodiol a partir de biomassa voltasse a aumentar (Ji *et al.*, 2011).

O 2,3-butanodiol é um composto quiral, sendo também conhecido como 2,3-butilenoglicol ou 2,3-di-hidroxibutano. Sua fórmula química é $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, com massa molecular de 90,12 k. É um líquido incolor e sem cheiro (Syu, 2001).

São descritas três formas isoméricas de 2,3-butanodiol (Figura 1), sendo que a sua forma de apresentação vai depender do microrganismo produtor (Ji *et al.*, 2011).

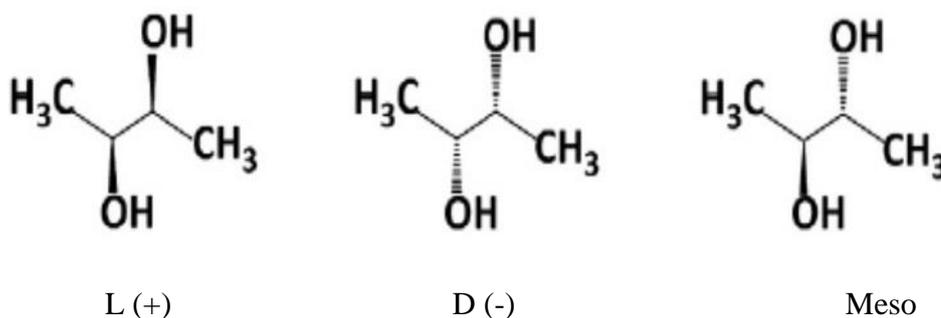


Figura 1 - Estereoisômeros de 2,3-butanodiol (Ji *et al.*, 2011).

Os pontos de ebulição dos três estereoisômeros são diferentes, variando de 177 a 182°C. Assim, todos são mais elevados que o ponto de ebulição da água. Por outro lado, a forma levoisômero possui baixo ponto de congelamento (-60°C), podendo ser utilizado como agente anticongelante (Garg & Jain, 1995; Syu, 2001; Celinska & Grajek, 2009).

O valor calorífico de 2,3-butanodiol (27,198 J/g) se compara favoravelmente ao de outros combustíveis líquidos, como o metanol (22,081 J/g) e o etanol (29,055 J/g), indicando a possibilidade de sua utilização como biocombustível (Flickinger, 1980).

2,3-Butanodiol e/ou seus derivados tem aplicação na indústria de plásticos e na produção de solventes. O produto da desidrogenação de 2,3-butanodiol, o diacetil, pode ser usado como agente aromatizante, sendo altamente valorizado em produtos alimentares por proporcionar sabor amanteigado (Bartowsky & Henschke, 2004). A desidratação de 2,3-butanodiol resulta em metil-etil-cetona, utilizada como solvente para resinas e vernizes e também como aditivo de combustíveis. A esterificação de 2,3-butanodiol leva à formação de precursores de espumas de poliuretano para uso em medicamentos, produtos cosméticos, loções, pomadas e antitranspirantes (Garg & Jain, 1995). Na Figura 2, são representados os processos aplicados em 2,3-butanodiol e os respectivos derivados.

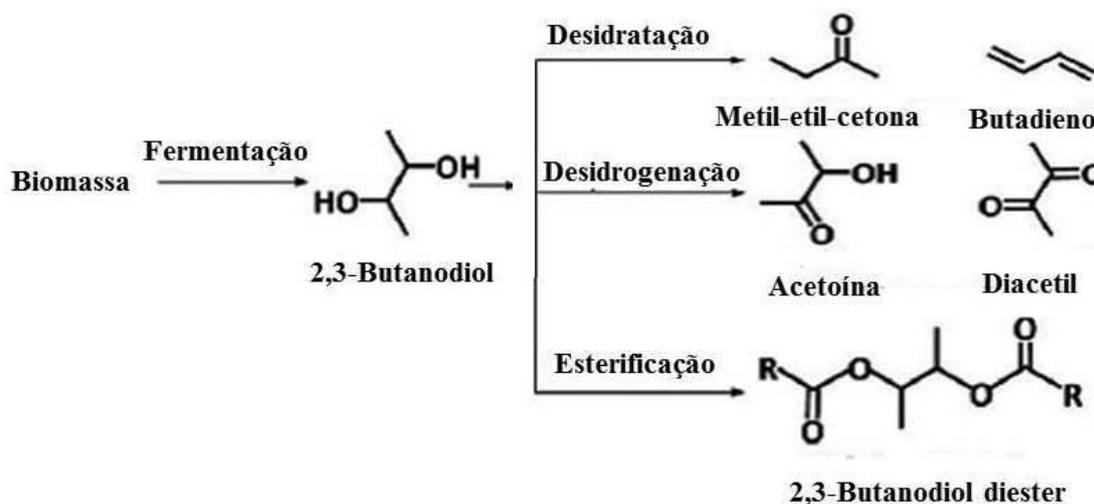


Figura 2 - Derivados de 2,3-butanodiol (Adaptado de Ji *et al.*, 2011).

2.2 Microrganismos relacionados à produção fermentativa de 2,3-butanodiol

Muitas espécies de bactérias são capazes de sintetizar 2,3-butanodiol como produto final da fermentação a partir de diferentes substratos. Os principais gêneros relatados como

produtores de 2,3-butanodiol incluem *Klebsiella* (Jansen *et al.*, 1984; Ramachandran & Goma, 1987; Silveira *et al.*, 1998; Berbert-Molina *et al.*, 2001), *Enterobacter* (Bothast & Saha, 1999; Perego *et al.*, 2000; Girardi *et al.*, 2014), *Serratia* (Rao *et al.*, 2012) e *Bacillus* (Laube *et al.*, 1984; Ramos *et al.*, 2000). As principais espécies são mostradas na Figura 3.

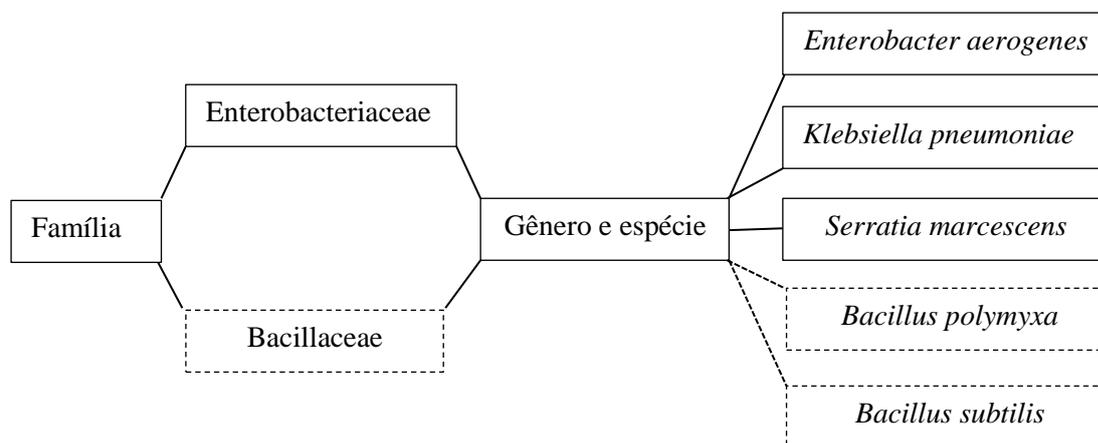


Figura 3 - Principais famílias, gêneros e espécies produtoras de 2,3-butanodiol.

Destaque é dado para *Enterobacter aerogenes*, espécie utilizada nesse trabalho, é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-negativa e com morfologia de bastonete. Os principais produtos da fermentação por *E. aerogenes* são etanol, ácido lático, ácido fórmico, 2,3-butanodiol, acetil-metil-carbinol (acetoína), 1,3-propanodiol, dióxido de carbono e hidrogênio, sendo que a formação destes compostos irá depender do meio de cultivo utilizado e também das condições do ensaio (Tortora *et al.*, 2012).

2.3 Glicerol: características, obtenção e aplicações

O glicerol foi descrito em 1779 pelo farmacêutico K.W. Scheele, denominado também como 1,2,3-propanotriol ou trihidroxipropano. É um líquido viscoso, incolor e inodoro. O glicerol contém três grupos hidroxila (Figura 4) que são hidrofílicas pelo caráter higroscópico e pela solubilidade deste composto em água (Quispe *et al.*, 2013). Na natureza, o glicerol está presente em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, algodão) e em animais, em formas combinadas de glicerol com ácidos graxos (triglicerídeos) (Thompson & He, 2006).

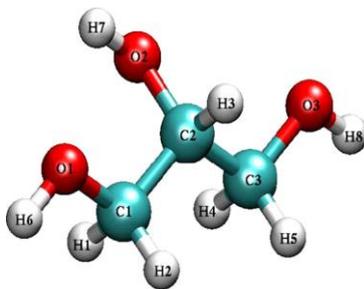


Figura 4 - Estrutura molecular do glicerol (Blieck *et al.*, 2005).

Na produção do biodiesel, obtêm-se glicerol como subproduto, geralmente na proporção de 10% em relação ao volume total de biodiesel produzido (Amaral *et al.*, 2009). O biodiesel é produzido a partir de óleos vegetais e gorduras animais através da transesterificação com etanol ou metanol (alcoólise), reação geralmente catalisada por NaOH ou KOH (Silva *et al.*, 2009), como esquematizado na Figura 5.

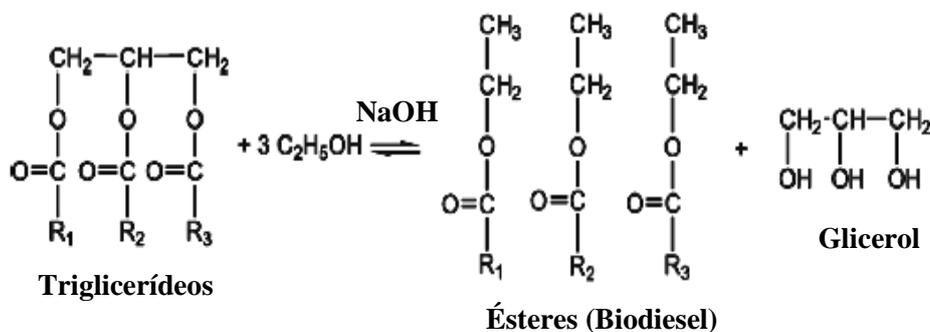


Figura 5 - Reação de transesterificação de um triglicerídeo com etanol (alcoólise), utilizando NaOH como catalisador, com a formação de biodiesel e glicerol (Silva *et al.*, 2009).

Considerando-se a necessidade crescente de combustíveis renováveis em todo o mundo e o aumento da demanda e da produção de biodiesel, um excesso de glicerol estará disponível no mundo e isso afetará negativamente o preço do biodiesel, uma vez que há gastos com o tratamento desse resíduo (Rivaldi *et al.*, 2008). A Figura 6 mostra as projeções da produção de glicerol no mundo e os preços dos últimos anos. Observa-se um aumento na produção com o decorrer dos anos. Já em relação à comparação dos preços do glicerol refinado e do glicerol residual, observa-se, na Figura 6, que os valores do glicerol refinado, apesar de mostrar redução com o passar dos anos, este sempre foi mais elevado que o valor do glicerol residual, que também apresenta diminuição com o decorrer do tempo (Quispe *et al.*, 2013).

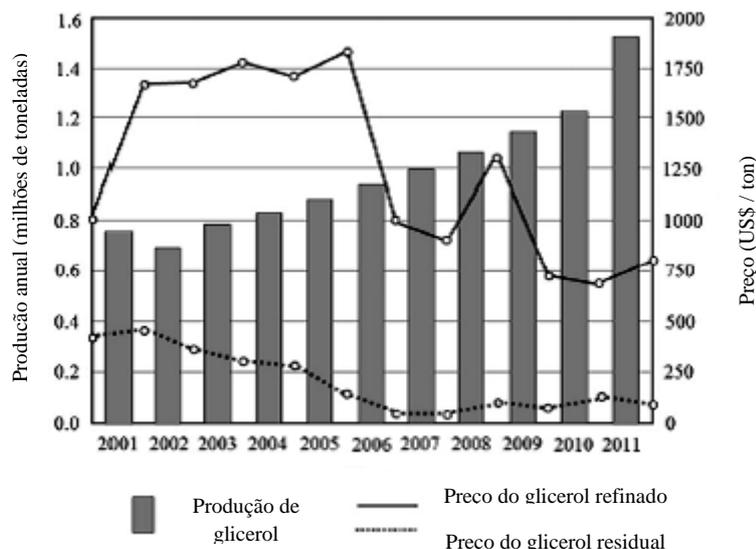


Figura 6 - Produção mundial e preços do glicerol (Quispe *et al.*, 2013).

De acordo com dados da ANP (2014), o Brasil possui 58 plantas de biodiesel autorizadas para operação e comercialização, sendo 9 localizadas no estado do Rio Grande do Sul. A região Sul foi a segunda maior produtora de biodiesel no mês de Agosto de 2014. A Figura 7 mostra a produção nacional mensal de biodiesel e a capacidade total autorizada pela ANP. No Rio Grande do Sul, fontes de substratos açucarados para o emprego em processos biotecnológicos, como a cana-de-açúcar, são escassas, por razões climáticas e, principalmente, pela existência de uma matriz agrícola bem definida. Dessa forma, o glicerol seria uma fonte de carbono alternativa, uma vez que seria possível reduzir gastos como o de transporte, já que o glicerol está prontamente disponível no Estado.

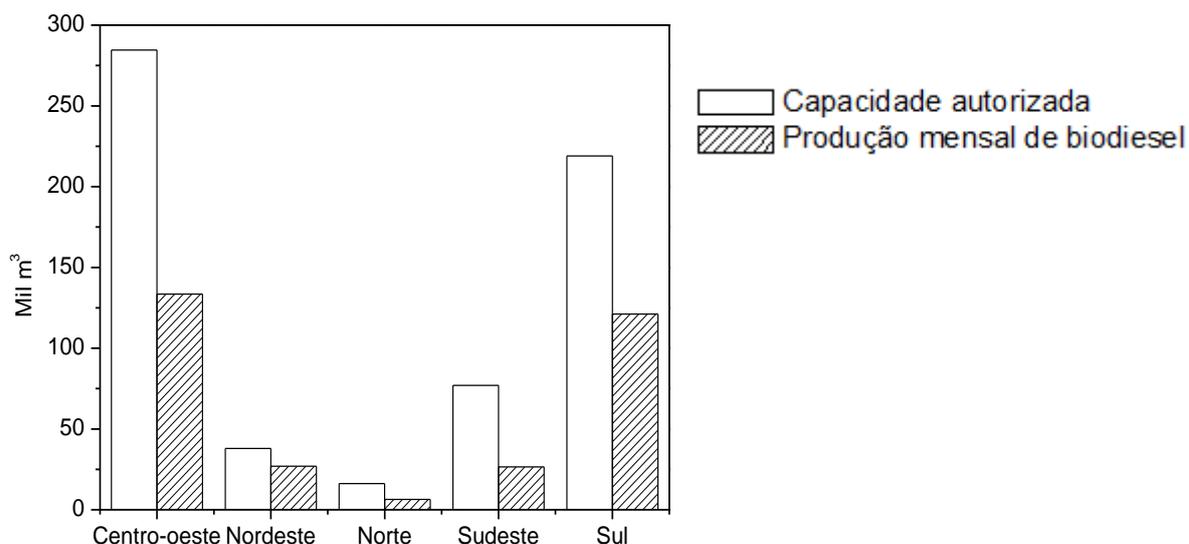


Figura 7 - Produção e capacidade nominal autorizada pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis em agosto de 2014 (www.anp.gov.br).

A rentabilidade de vários processos químicos depende, em parte, da venda dos subprodutos gerados, permitindo a redução dos custos de produção e conseqüentemente, do preço final do produto. Deste modo, com o intuito de minimizar os futuros problemas derivados da acumulação do glicerol, torna-se necessária a busca de alternativas para o uso do glicerol bruto decorrente da etapa produtiva. Este glicerol apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que lhe conferem um baixo valor comercial (Ooi *et al.*, 2004). Diante disso, estudos têm abordado métodos de purificação do glicerol ou o seu reaproveitamento direto. Os processos de purificação incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca iônica, no entanto, esses tratamentos são de alto custo para pequenos e médios produtores de biodiesel (Alves & Abreu, 2006).

Devido à combinação de propriedades como não toxicidade, ausência de cor e odor, o glicerol comercial é uma substância com grande variedade de aplicações. Na indústria farmacêutica, o glicerol tem aplicação em cosméticos, cremes dentais, medicamentos e em produtos de maquiagem. Na indústria alimentícia, tem sido usado como estabilizante, antioxidante, sequestrante, umectante e emulsificante. Na indústria química, é utilizado em detergentes, tintas, adesivos, papel e aditivos (Arruda *et al.*, 2007).

Uma parte considerável do glicerol gerado nas plantas de biodiesel no Brasil é queimada em fornos e caldeiras para geração de energia em unidades industriais, como na produção do próprio biocombustível, além de olarias e siderúrgicas. A Oleoplan, empresa

produtora de biodiesel no Rio Grande do Sul, usinas de biodiesel da Argentina e da Alemanha exportam o glicerol excedente para outros países, como a China, onde não se produz biodiesel (Vasconcelos, 2012).

A conversão microbiana de glicerol em produtos de maior valor agregado consiste em uma alternativa para sua maior valorização. O glicerol pode ser usado em substituição a outros carboidratos, como sacarose e glicose, em muitos processos industriais de fermentação. Como exemplo, destaca-se o emprego de glicerol como matéria-prima na obtenção de metabólitos como 2,3-butanodiol, etanol, hidrogênio e ácidos orgânicos (Papanikolaou *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2009).

2.4 Conversão microbiológica do glicerol

O glicerol é considerado uma fonte de carbono assimilável por bactérias, sob condições aeróbias e anaeróbias, para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula. Além disso, o glicerol é um dos poucos substratos que atravessa a membrana por difusão facilitada nas células procarióticas. Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática, o glicerol pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas independentes (Dills *et al.*, 1980; Rivaldi *et al.*, 2008).

Em bactérias anaeróbias facultativas, como as pertencentes aos gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella*, o glicerol pode ser metabolizado tanto de forma oxidativa, quanto de forma redutora. Neste processo, a geração de energia na forma de ATP e equivalentes redutores, na forma de NADH_2 , ocorre na via oxidativa, enquanto a regeneração para NAD^+ ocorre na via redutora (Kaur *et al.*, 2012). Na via redutora, em condições de anaerobiose, o glicerol sofre desidratação, levando à formação de 3-hidroxi propionaldeído, reação catalisada pela enzima glicerol desidratase, a qual é dependente da coenzima B_{12} . Posteriormente, este intermediário é convertido pela enzima NADH dependente 1,3-propanodiol desidrogenase em 1,3-propanodiol (Figura 8), principal intermediário para produção de polímeros, resinas e aditivos de importantes aplicações industriais (Rivaldi *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2012).

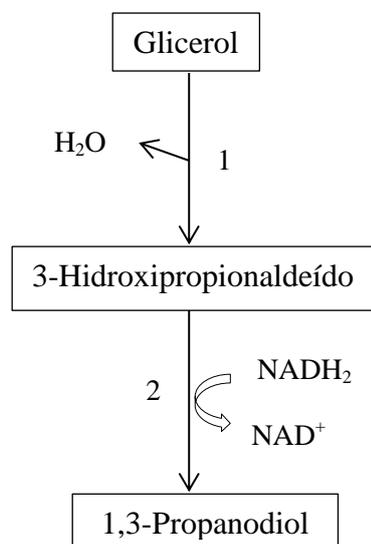


Figura 8 - Via metabólica de assimilação do glicerol por bactérias anaeróbicas facultativas para formação de 1,3-propanodiol, em condições de anaerobiose. 1- glicerol desidratase; 2- 1,3-propanodiol desidrogenase. Adaptado de Kaur *et al.* (2012).

Na via oxidativa, o glicerol é desidrogenado para formar di-hidroxiacetona pela ação de NAD-dependente glicerol-3-fosfato desidrogenase que, em seguida, é fosforilada pela di-hidroxiacetona quinase, tendo como produto di-hidroxiacetona fosfato. Na conversão de glicerol em piruvato, o rendimento líquido é de duas moléculas de NADH₂ e uma molécula de ATP. Em condições de aerobiose, uma rota alternativa é seguida, em que o glicerol é fosforilado para glicerol-3-fosfato, em reação catalisada pela glicerol quinase. Glicerol-3-fosfato é convertido em di-hidroxiacetona fosfato pela NAD-dependente glicerol-3-fosfato desidrogenase (Silva *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2012). As etapas das duas rotas metabólicas oxidativas de glicerol a piruvato são mostradas na Figura 9.

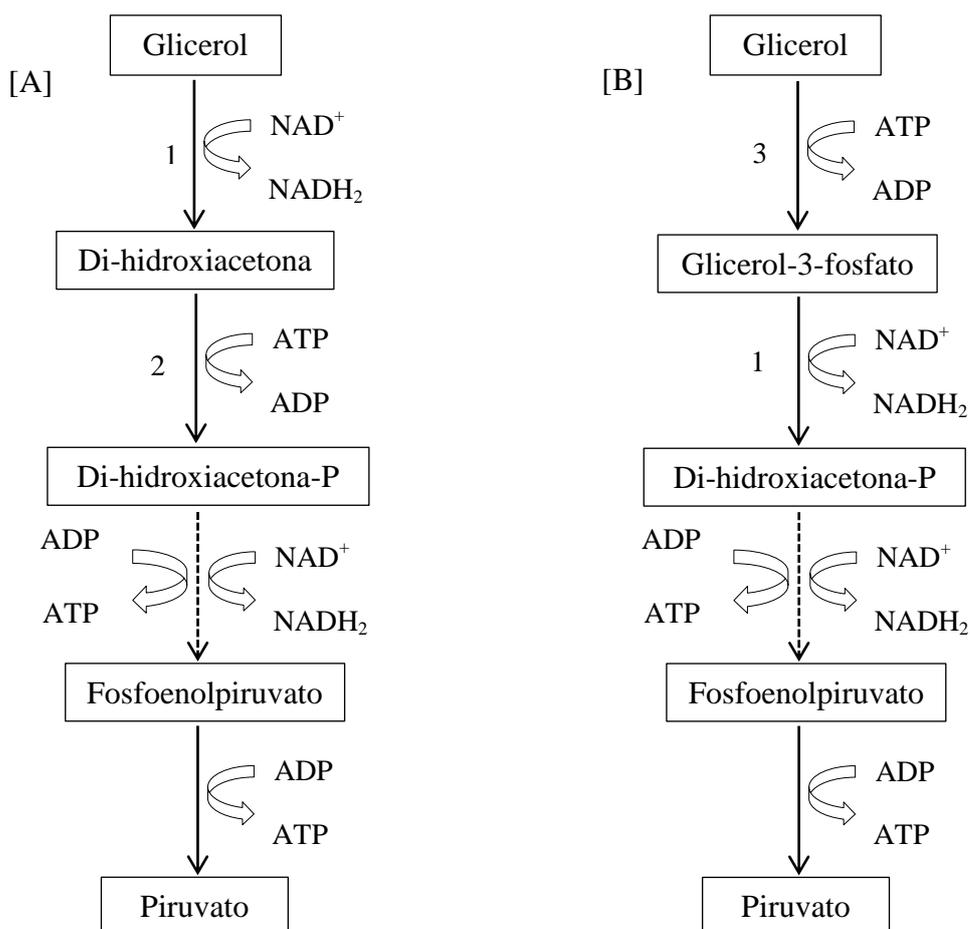


Figura 9 - Vias metabólicas de conversão do glicerol em piruvato por bactérias anaeróbicas facultativas. [A] Via metabólica em condições de anaerobiose. [B] Via metabólica em condições de aerobiose. 1- glicerol-3-fosfato desidrogenase; 2- di-hidroxiacetona quinase; 3-glicerol quinase. Adaptado de Rivaldi *et al.* (2008), Silva *et al.* (2009) e Kaur *et al.* (2012).

O 2,3-butanodiol é produzido a partir de piruvato em processo fermentativo, o qual envolve compostos intermediários como o α -acetolactato e a acetoína (acetil-metil-carbinol). Além de 2,3-butanodiol, outros produtos finais são sintetizados como o lactato, etanol, acetato, formiato, dióxido de carbono e hidrogênio, sendo que a formação destes irá depender das condições impostas, como meio de cultivo, pH, tipo de substrato e suprimento de oxigênio (Celinska & Grajek, 2009). A Figura 10 apresenta os produtos da conversão do glicerol em piruvato em processos fermentativos.

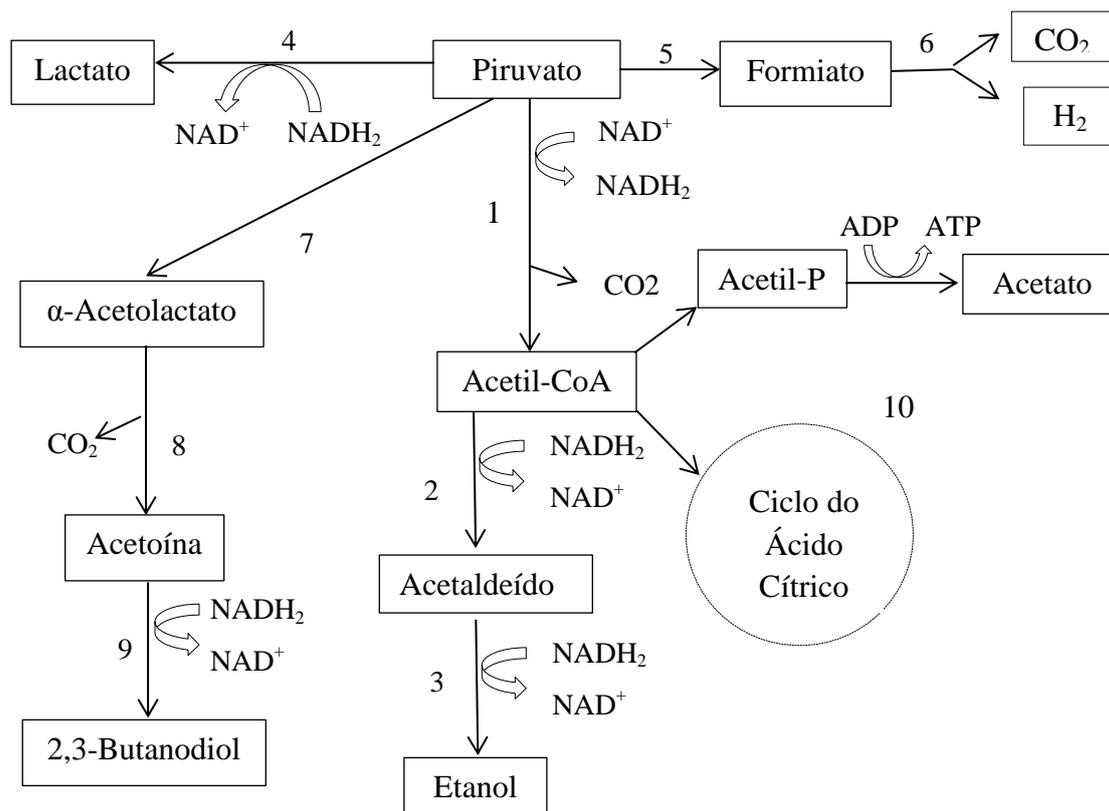


Figura 10 - Vias metabólicas de conversão do piruvato em produtos por bactérias anaeróbicas facultativas. 1-piruvato desidrogenase; 2-acetaldeído desidrogenase; 3-etanol desidrogenase; 4-lactato desidrogenase; 5-piruvato-formiato liase; 6-formiato-hidrogênio liase; 7- α -acetolactato sintase; 8-acetolactato descarboxilase; 9-acetoína redutase (butanodiol desidrogenase); 10-acetato quinase. Adaptado de Silva *et al.* (2009) e Ji *et al.* (2011).

Para a síntese de 2,3-butanodiol a partir de piruvato, as três principais enzimas envolvidas são α -acetolactato sintase, acetolactato descarboxilase e acetoína redutase, também denominada de butanodiol desidrogenase (Gottshalk, 1986). Em condições de aerobiose, α -acetolactato sintase é inativada, sendo a formação de 2,3-butanodiol encerrada. No entanto, neste caso, o piruvato é convertido em acetil-CoA pela piruvato desidrogenase. O acetil-CoA formado é, então, direcionado principalmente para o ciclo do ácido cítrico, tendo como principais produtos dióxido de carbono e água, favorecendo a geração de energia e, consequentemente, a formação de células microbianas (Gottshalk, 1986).

Em condições não totalmente aeróbicas, ou seja, em limitação de oxigênio, é evidenciada a ação das principais enzimas: lactato desidrogenase, piruvato-formiato liase e α -acetolactato sintase. A ação destas enzimas é também favorecida em condições com valores

de pH em torno de 6,0 (Magee & Kosaric 1987). O produto final da ação de lactato desidrogenase é o lactato, sendo que esta reação requer reoxidação de NADH_2 . Em decorrência da ação de piruvato-formiato liase, é formado o formiato, que pode, posteriormente, ser metabolizado pelo complexo formiato-hidrogênio liase para a geração dos produtos finais, dióxido de carbono e hidrogênio. O sistema enzimático α -acetolactato sintase catalisa a conversão de piruvato, formando α -acetolactato, que é, então, convertido em acetoína pela acetolactato descarboxilase. Em seguida, a acetoína redutase (butanodiol desidrogenase) reduz a acetoína em 2,3-butanodiol. Além destes compostos, nestas condições, também são gerados etanol e acetato, pela ação de outras enzimas (Figura 10).

2.5 Parâmetros de processo que influenciam a produção de 2,3-butanodiol

Os principais parâmetros que exercem influência sobre a produção fermentativa de 2,3-butanodiol são: pH, temperatura, concentração de substrato e suprimento de oxigênio. As condições de aeração, agitação e concentração de substrato interferem diretamente na transferência de oxigênio e, em se tratando de organismo anaeróbio facultativo, afeta, conseqüentemente, a formação de biomassa e 2,3-butanodiol.

2.5.1 pH

O pH desempenha um papel importante na produção de 2,3-butanodiol. Segundo Garg & Jain (1995), valores de pH em torno de 6,5, favorecem a formação de ácidos orgânicos, diminuindo, assim, a formação de butanodiol. No entanto, condições ácidas favorecem a formação de butanodiol.

Wong *et al.* (2014) realizaram ensaios com a bactéria *Klebsiella* sp. Zmd30, em que avaliaram o efeito de valores do pH entre 4,5 e 9,0. Como fonte de carbono, foi utilizada glicose, com uma concentração inicial de 146 g/L. Os resultados indicaram que a composição dos metabólitos produzidos são altamente relacionados com o valor de pH em que a bactéria foi cultivada. Em ensaio com valor de pH de cerca de 6,0, foi obtida concentração de 2,3-butanodiol em torno de 52,3 g/L, com produtividade de 2,10 g/L/h. O controle do pH do meio em valores superiores a 6,0 favoreceram a produção de lactato e acetato. Já a produção de succinato foi beneficiada a valores de pH neutro. Além disso, quando o pH foi controlado em 4,5, um elevado nível de citrato (70 g/L) foi produzido. Utilizando a mesma fonte de carbono com concentração inicial de 20 g/L e a bactéria *E. aerogenes* NCIMB 10102, Perego *et al.* (2000) avaliaram o efeito do pH, entre 4,0 e 8,0, sobre a produção de 2,3-

butanodiol. Ensaio conduzido em pH 6,0 proporcionou a obtenção de resultado superior de produtividade de 2,3-butanodiol, cerca de 0,36 mmol/L/h.

Já em condições não controladas de pH, Biebl *et al.* (1998) estudaram a produção 2,3-butanodiol por *K. pneumoniae* DSM 2026, com o uso de glicerol. Nos cultivos contínuos, em que os valores pH foram reduzidos aos poucos, de pH 7,3 para 5,4, foi relatado o início da formação de 2,3-butanodiol em pH 6,6. A conversão máxima obtida foi de 12,4 mol/100 mol de glicerol consumido em pH 5,5.

Em modo contínuo, Zeng *et al.* (1990) realizaram cultivos de *E. aerogenes* DMS 30053 em meio contendo glicose como fonte de carbono, com concentração inicial de 10 g/L. Os autores destacaram a obtenção de concentrações superiores de 2,3-butanodiol, próximo a 25 g/L, em pH 5,5.

2.5.2 Temperatura

A temperatura é um parâmetro que influencia a eficiência de cultivo, uma vez que a atividade de enzimas e a manutenção celular são fatores dependentes deste parâmetro (Garg & Jain, 1995; Celinska & Grajek, 2009).

Empregando *Klebsiella* sp. HE1, Wu *et al.* (2011) avaliaram a influência da temperatura na produção de 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, etanol e hidrogênio. Dentre as temperaturas avaliadas, entre 30 e 40°C, os autores constataram que a temperatura que favoreceu a obtenção de todos os produtos foi 35°C.

Perego *et al.* (2000), em estudos relacionados à utilização de glicose por *E. aerogenes* NCIMB 10102, avaliaram a influência da temperatura, entre 23 e 46°C, em cultivos com concentração inicial de glicose de 20 g/L. Os autores relataram um aumento progressivo dos valores de produtividade até 39°C, sendo estimada nesta temperatura valor 1,59 mmol/L/h. Níveis de temperatura acima de 39°C provocaram decréscimo na produtividade.

Estudo sobre o efeito da temperatura, na faixa de 30 a 37°C, comparando as bactérias *E. aerogenes* e *K. pneumoniae*, em meio baseado em soro de leite, foi realizado por Barrett *et al.* (1983). Entre as condições avaliadas, os autores descreveram que 33°C foi apropriada para o desenvolvimento de *K. pneumoniae* e, nos cultivos de *E. aerogenes*, as mudanças na temperatura exerceram pouca influência na formação de 2,3-butanodiol, embora a 37°C a produção tenha ocorrido em menor tempo.

Em ensaios conduzidos em frascos sob agitação recíproca de 300 rpm, Becker *et al.* (2013a) avaliaram o efeito da temperatura sobre o crescimento de *E. aerogenes* ATCC 13048. Foram testadas temperaturas de 28 a 37°C e, como substrato, foi utilizado glicerol comercial.

Os autores determinaram as máximas velocidades específicas de crescimento (μ_{xm}) de 0,56, 0,60, 0,77, 0,74 e 0,77 h^{-1} , respectivamente, nos cultivos a 28, 30, 32, 34 e 37°C, indicando que valores de temperatura a partir de 32°C não interferiram nos resultados de μ_{xm} .

2.5.3 Concentração inicial de substrato

Com vistas à realização do processo fermentativo de produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol, a obtenção de alta concentração de produto no meio é de extrema importância. Para isto, torna-se necessário o emprego de elevadas concentrações de glicerol no processo, que poderia acarretar em perda de produtividade em razão de uma possível inibição pelo substrato no desenvolvimento celular (Garcia, 2006).

Sablayrolles & Goma (1984) estudaram o efeito da concentração inicial de glicose (22 a 195 g/L) em cultivos de *A. aerogenes* NRRL B199 (*K. pneumoniae*) sobre a produção de 2,3-butanodiol/acetoina. Os autores relataram o aumento dos valores de conversão de substrato em produtos ($Y_{P/S}$) (0,320 a 0,450 g/g, respectivamente) com o incremento do teor de glicose. Por outro lado, o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) diminuiu com o aumento da concentração de glicose, sendo obtidos valores de 0,21 a 0,045 g/g, respectivamente, devido à mudança de metabolismo, que favoreceu a formação de produtos. Além disso, concentração superior de 2,3-butanodiol/acetoina de 88 g/L foi obtida no ensaio com concentração inicial de glicose de 195 g/L.

Empregando xilose, Jansen *et al.* (1984) avaliaram a influência da concentração inicial do substrato, entre 5 e 150 g/L, na produção de 2,3-butanodiol/acetoina por *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Os autores identificaram aumento da concentração final dos produtos com o incremento de xilose, sendo obtidos 49 g/L em ensaio com concentração inicial de substrato de 150 g/L.

Berbert-Molina (1995) relatou a produção de 2,3-butanodiol/acetoina em cultivos de *K. pneumoniae* NRRL B199 em caldo de cana-de-açúcar, com concentração inicial de sacarose entre 140 e 150 g/L, em frascos sob agitação. A adição de 5,0 a 10,0 g/L de fosfato de amônio ao caldo levou às concentrações finais de 2,3-butanodiol de até 64 g/L e rendimentos, em relação ao máximo teórico, na ordem de 81%, em cerca de 38 horas.

Ao utilizar sacarose como fonte de carbono em cultivos de *K. pneumoniae* NRRL B199, Silveira *et al.* (1998) destacaram que, entre as concentrações iniciais de 20 a 204 g/L, foi obtido cerca de 93% de rendimento e 1,34 g/L/h de 2,3-butanodiol/acetoina com a utilização de 95 g/L de sacarose.

O uso de glicerol com concentrações iniciais de 20 a 60 g/L em cultivos é descrito por

Romio *et al.* (2014), utilizando a bactéria *K. oxytoca* ATCC 8724. Os autores descreveram com relação à $Y_{X/S}$, um comportamento decrescente (0,27 a 0,12 g/g, respectivamente) em relação às concentrações de glicerol. Por outro lado, aumento nos valores $Y_{P/S}$ (0,21 a 0,30 g/g) foi observado.

2.5.4 Suprimento de oxigênio

Processos fermentativos envolvendo o cultivo de microrganismos anaeróbios facultativos exigem um adequado dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio, ou seja, da operação da dissolução do oxigênio contido na fase gasosa para a fase líquida, permitindo a sua utilização pela população microbiana no metabolismo respiratório. Desta forma, a transferência de oxigênio é uma etapa limitante em um bioprocessos, devido a sua baixa solubilidade no meio (Schmidell *et al.*, 2001).

Componentes do meio de cultivo, como sais inorgânicos, fontes de carbono, assim como a presença de compostos que aumentam a viscosidade, reduzem ainda mais o percentual de oxigênio na saturação. Em ensaios conduzidos em biorreatores em escala de laboratório, algumas variáveis influenciam na transferência de massa, sendo os mais importantes a velocidade de agitação – modelo e número dos agitadores – e a vazão de ar comprimido (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009).

Em cultivos microbianos conduzidos em frascos sob agitação, a transferência de oxigênio e a mistura são proporcionadas por meio da ação recíproca do sistema, sendo influenciada pelo volume de meio e modelo do Erlenmeyer utilizado. Becker *et al.* (2013b), em cultivos de *E. aerogenes*, avaliaram o efeito do volume reacional, de 80 a 200 mL de meio contendo glicerol como fonte de carbono sobre a produção de 2,3-butanodiol. Os ensaios foram conduzidos em agitador de bancada, (recíproca-300 rpm) em Erlenmeyer de 500 mL com gargalo alongado, . Os autores relataram o aumento nos valores de $Y_{P/S}$ com o aumento do volume de meio (0,140 a 0,407 g/g). Por outro lado, concentrações superiores de biomassa celular de 3,7 e 4,0 g/L foram obtidas, respectivamente, nos ensaios com 80 e 100 mL de meio, indicando que a formação de 2,3-butanodiol é favorecida em condições de limitação de oxigênio, que ocorreram em volumes superiores de meio.

Ramachandran & Goma (1988), em cultivos de *K. pneumoniae* NRRL B199, estudaram o efeito do suprimento de oxigênio em fermentação contínua. Neste trabalho foram testadas velocidades de transferência de oxigênio (OTR) de 17,5 a 40,0 mmol/L/h, com concentração inicial de 100 g/L de glicose. A condição ideal encontrada foi com OTR entre 25-30 mmol/L/h, sendo que a concentração de 2,3-butanodiol/acetoína e rendimento obtidos

foram, respectivamente, de 35 g/L e 50%.

Silveira *et al.* (1993) também avaliaram a influência do suprimento de oxigênio em cultivos realizados com diferentes valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}), de 8 a 620 h^{-1} e 40 g/L de sacarose com *K. pneumoniae* NRRL B199. Foi observado o incremento nos valores de biomassa com o aumento do K_{La} . No entanto, a formação de 2,3-butanodiol diminuiu, mesmo com o incremento da porção de acetoína na mistura com 2,3-butanodiol.

Jansen *et al.* (1984) realizaram cultivos de *K. oxytoca* em xilose, visando à avaliação da influência de valores distintos de OTR na conversão em 2,3-butanodiol. Os autores propuseram que o maior fornecimento de oxigênio favoreceria a formação de biomassa, entretanto, não foi observado o efeito positivo em termos de produção de 2,3-butanodiol. Por outro lado, a diminuição da OTR teve como consequência menor formação de biomassa e aumento do rendimento em 2,3-butanodiol, embora com conversão global inferior.

Uma forma alternativa quanto ao suprimento de oxigênio foi proposto por Ji *et al.* (2009). Neste estudo, o microrganismo utilizado foi *K. oxytoca*, em meio contendo glicose (200 g/L) como fonte de carbono. Inicialmente, foram testadas as frequências de agitadores de 100 a 400 rpm e aeração de 1 vvm, sendo estes parâmetros mantidos até o final do ensaio. Baseando-se nos resultados, os autores selecionaram as frequências de agitadores de 300 e 200 rpm, sendo empregadas em duas etapas. Primeiro foram utilizadas 300 rpm por um período de aproximadamente 15 horas e, posteriormente, a velocidade foi diminuída para 200 rpm, até o final do ensaio, em torno de 70 horas. Agitação superior na primeira etapa favoreceu a formação de biomassa e, posteriormente, com menor velocidade de dissolução de O_2 , a formação de 2,3-butanodiol foi priorizada. Nestas condições, os autores relatam a obtenção de 95,5 g/L de 2,3-butanodiol.

2.5.5 Formas de condução do processo fermentativo

No processo fermentativo de produção de 2,3-butanodiol/acetoína, diferentes formas de condução foram avaliadas. Em regime descontínuo, para a obtenção de concentrações superiores de produto, há necessidade de condições de limitação de oxigênio e altas concentrações iniciais de substrato. No entanto, estas condições podem provocar efeito inibitório no crescimento celular e gerar baixos valores de produtividade (Jansen *et al.*, 1984; Sablayrolles & Goma, 1984; Silveira *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 2014). Ensaio conduzido em regime descontínuo alimentado proporcionam condições adequadas para obtenção de elevadas concentrações finais de produto (Olson & Johnson, 1948; Yu & Saddler, 1983; Petrov &

Petrova, 2010). Por outro lado o modo contínuo possibilita melhores resultados em termos de produtividade (Ramachandran & Goma, 1988). Na Tabela 1, estão resumidos alguns resultados de produção de 2,3-butanodiol obtidos em cultivos de *K. pneumoniae*.

Ensaio conduzidos em regime descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo foram realizados por Wong *et al.* (2014) com a bactéria *Klebsiella* sp. Zmd30 em cultivos com concentração de glicose de 146 g/L. Em regime descontínuo, concentração, produtividade e rendimento obtidos foram 57,2 g/L, 1,59 g/L/h e 82%, respectivamente. Já em regime descontínuo alimentado, maior concentração de 2,3-butanodiol e rendimento foram obtidos, em torno de 110 g/L e 94 %, respectivamente; por outro lado, a produtividade foi menor, de cerca de 0,88 g/L/h. A mais alta produtividade de 2,81 g/L/h, foi obtida em regime contínuo.

Petrov & Petrova (2010) avaliaram a produção de 2,3-butanodiol por *K. pneumoniae* a partir de glicerol em ensaio conduzido em regime descontínuo alimentado, com alimentação total de 135 g/L e relataram a obtenção de 70 g/L de 2,3-butanodiol.

Já a partir de sacarose, Silveira *et al.* (1998) estudaram a produção de 2,3-butanodiol/acetoína por *K. pneumoniae* ATCC 8724 em concentrações crescentes (20 a 204 g/L), em modo descontínuo e descontínuo alimentado. Os autores indicaram que, em modo descontínuo, o crescimento e a formação dos produtos foram cada vez mais inibidos com concentrações iniciais de substrato superiores a 60 g/L. Em ensaios em modo descontínuo alimentado, em que a inibição pelo substrato pode ser evitada, concentração final de produtos de 80 g/L foi alcançada e produtividade de 2,63 g/L/h. Com o mesmo microrganismo, Ramachandran & Goma (1988) realizaram ensaios empregando glicose como substrato em modo contínuo com reciclo de células e obtiveram produtividade superior de 9,8 g/L/h, mas concentração final de produtos inferior, em torno de 40 g/L.

Utilizando glicerol como fonte de carbono, Hartmann *et al.* (2014) avaliaram a produção de 2,3-butanodiol por *K. oxytoca* ATCC 8724 em regime descontínuo e descontínuo alimentado, com concentração de 160 g/L. Em regime descontínuo não houve consumo total de glicerol, quantificado em 72 horas, com valor de substrato residual de 100 g/L. Isso ocorreu, provavelmente, devido à inibição no crescimento celular causada por alta concentração inicial de glicerol. Já em ensaio realizado em regime descontínuo alimentado, foi possível contornar o efeito inibitório, sendo obtida concentração de 2,3-butanodiol de 74 g/L e rendimento de 84%.

Tabela 1 - Processos fermentativos para obtenção de 2,3-butanodiol com a utilização de diferentes substratos e formas de cultivo por *Klebsiella pneumoniae*.

Modo de operação	Substrato ou matéria-prima (g/L)	2,3-Butanodiol (g/L)	Produtividade (g/L/h)	Referência
Descontínuo	Xilose – 100	29,6	1,35	Jansen <i>et al.</i> (1984)
Descontínuo	Glicose – 195	88	1,10	Sablaylorles & Goma (1984)
Descontínuo	Sacarose – 204	84	1,05	Silveira <i>et al.</i> (1998)
Descontínuo	Glicose – 146	57	1,59	Wong <i>et al.</i> (2014)
Descontínuo	Caldo de cana-de-açúcar – 180 (açúcares redutores totais)	70	2,0	Berbert-Molina <i>et al.</i> (2001)
Descontínuo alimentado	Glicose – 265	99	0,92	Olson & Johnson (1948)
Descontínuo alimentado	Glicose – 226	113	0,50	Yu & Saddler (1983)
Descontínuo alimentado	Glicerol – 180	70	0,47	Petrov & Petrova (2010)
Descontínuo alimentado	Glicerol – 138	49	-	Petrov & Petrova (2009)
Descontínuo alimentado	Glicose – 146	110	0,88	Wong <i>et al.</i> (2014)
Descontínuo alimentado	Sacarose – 219	80	2,63	Silveira <i>et al.</i> (1998)
Contínuo c/ reciclo	Glicose – 100	39	9,84	Ramachandran & Goma (1988)
Contínuo	Glicose – 146	34	2,81	Wong <i>et al.</i> (2014)

Entre os referenciais levantados, foi constatado que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre a produção microbiológica de 2,3-butanodiol/acetoína relata a utilização de glicose como fonte de carbono e a bactéria *K. pneumoniae*. Diante disso, destaca-se o diferencial do presente estudo, em que é empregado glicerol como fonte de carbono, um substrato de baixo custo e presente em elevadas quantidades, e o uso alternativo da bactéria *E. aerogenes*, potencial produtora de 2,3-butanodiol/acetoína.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Enterobacter aerogenes ATCC 13048 (Figura 11), adquirida do Centro de Culturas Tropical André Tosello (São Paulo-SP, Brasil), foi utilizada em todos os experimentos deste trabalho.

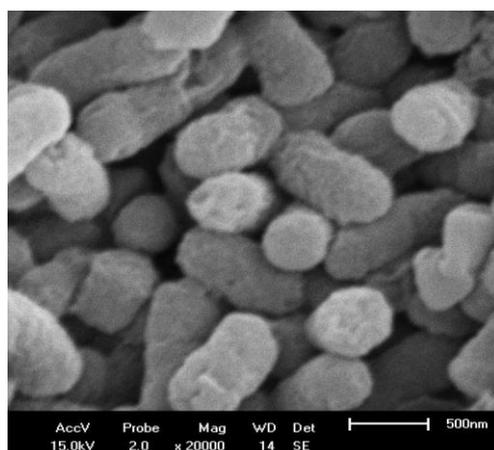


Figura 11 - *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, aspecto dos bacilos obtidos de meio fermentado em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Imagem obtida do Laboratório de Caracterização de Materiais, Universidade de Caxias do Sul.

3.2 Meios de cultura

O meio para conservação e propagação das culturas foi o ágar-nutriente (HIMEDIA[®]). A conservação das culturas foi feita em tubos de ensaio com ágar-nutriente inclinado e tampão de gaze e algodão hidrófobo, mantidos a 4°C.

Para o preparo dos inóculos, ensaios em regimes descontínuo e descontínuo alimentado (batelada inicial e alimentação), foi utilizado o meio descrito por Pirt & Callow (1958), com a seguinte composição (g/L) (excluindo-se o glicerol):

• (NH ₄) ₂ SO ₄	7,20
• (NH ₄) ₂ HPO ₄	6,00
• KOH	0,45
• EDTA	0,51
• MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30
• CaCl ₂ .6H ₂ O	0,09
• FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0225
• ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0075
• MnSO ₄ .7H ₂ O	0,0038

A esta solução de nutrientes, foi adicionado glicerol puro (VETEC®) em concentração de acordo com o ensaio a ser conduzido. No caso do meio para preparo de inóculos, a concentração inicial de glicerol foi sempre de 20 g/L.

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

A esterilização de todos os meios foi feita em autoclave à pressão de 1 atm, por 20 minutos.

Nos Ensaio 7 ($S_0 = 180$ g/L, 500 rpm - 0,50 vvm), 11 e 12 ($S_0 = 140$ e 180 g/L, respectivamente, 650 - 750 rpm, 0,50 - 0,87 vvm), em função dos resultados, em determinados períodos, foram adicionadas aos meios soluções concentradas de sulfato e fosfato de amônio, de 8 e 6 g, respectivamente, dissolvidos em 10 mL de água destilada, durante o processo, conforme será detalhado nos itens 4.1 e 4.2.

3.3 Preparo dos inóculos

O preparo dos inóculos seguiu o mesmo procedimento em todos os ensaios. A partir de culturas estocadas em tubos de ensaio, foram realizados repiques em placas de Petri, contendo meio ágar-nutriente, sendo as placas incubadas a 37°C por 15 h. Em seguida, frascos Erlenmeyer de 500 mL, com colo longo, contendo 100 mL de meio, foram inoculados com alçadas diretas das culturas crescidas nas placas. Os frascos foram cobertos com manta de algodão hidrófobo e gaze e mantidos sob agitação recíproca em agitador de bancada (Certomat U, B. Braun Biotech, Sartorius) a 300 rpm por 10 horas, a 37°C. Para manter-se os valores de pH em faixa adequada para o desenvolvimento microbiano, adicionou-se aos meios, antes da inoculação, 2,5 g/L de carbonato de cálcio. Posteriormente, no biorreator, os meios de cultivo foram inoculados com o volume necessário para que se tivesse uma concentração celular inicial de 0,2 g/L.

3.4 Descrição do fermentador

Os ensaios foram realizados em biorreator de bancada New Brunswick modelo BioFlo/CelliGen 115, com uma cuba de vidro com volume máximo de 7,5 L e volume de trabalho entre 5,6 L e 2 L, operada, neste trabalho, em volume de 4 L. A unidade de controle do equipamento permite a determinação e a manutenção de parâmetros básicos de processo, como o pH, a temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido.

A cuba do reator tem diâmetro interno de 185 mm, sendo a agitação proporcionada por três turbinas do tipo Rushton, com 60 mm de diâmetro, com seis lâminas planas, separadas a uma distância de 30 mm. A dispersão do ar é feita a partir de um anel perfurado instalado na extremidade inferior do eixo central do agitador. O reator contém um conjunto com quatro chicanas equidistantes, com 20 mm de largura cada uma.

A temperatura dos foi ajustada a 37°C, com a circulação da água da camisa da cuba do reator sendo feita através de uma bomba acoplada ao fermentador.

O eletrodo de pH foi calibrado com soluções tampões com valores de pH de 4,0 e 7,0, e o controle deste parâmetro foi feito automaticamente em 5,5 com a adição de NaOH 7,0 mol/L.

As concentrações de oxigênio dissolvido foram obtidas na forma de percentagem da saturação do meio com oxigênio, com o auxílio de uma sonda polarográfica conectada ao reator e calibrada antes da inoculação.

O biorreator dispõe de um sistema de amostragem, que é mostrado na Figura 12. Este sistema consiste de um tubo de aço inoxidável, cuja extremidade situa-se à altura da turbina mais próxima do fundo da cuba, conectado a uma mangueira de silicone, seguido de frasco amostrador, mangueira de silicone, filtro e seringa de 60 mL. Desta forma, a coleta de amostras foi feita por meio de diferença de pressão causada pelo deslocamento do êmbolo da seringa.

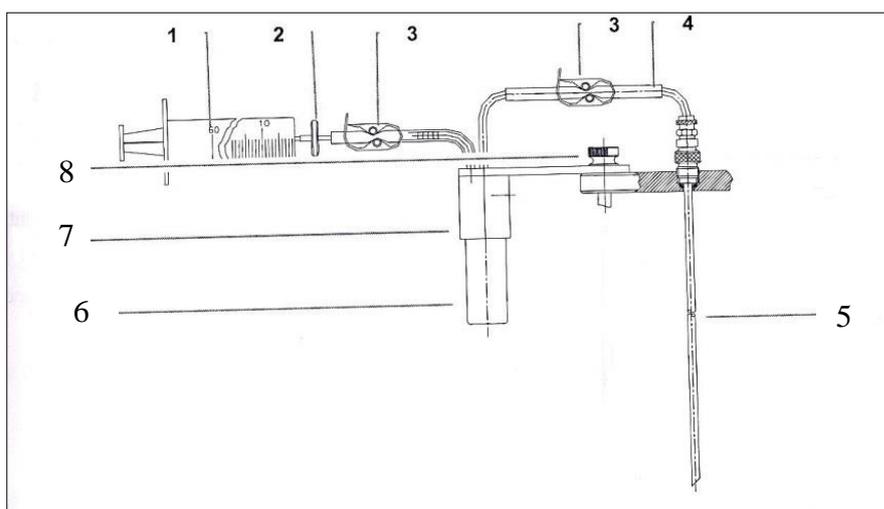


Figura 12 - Sistema de amostragem acoplado ao fermentador. 1-seringa, 2-filtro, 3-pinça, 4-mangueira de silicone, 5-tubo de aço inoxidável, 6-frasco coletor de amostra, 7- suporte para o frasco de amostragem, 8-peça de fixação do sistema ao fermentador (New Brunswick BioFlo® / CelliGen® 115 *Bentchop Fermentor & Bioreactor, Operating Manual* M1369-0050 *Revision E*, Junho 6, 2012).

O biorreator é controlado por um *software* (Biocommand) que possibilita armazenar dados durante os ensaios, como valores de pH, de oxigênio dissolvido, de temperatura e de fluxo de ar, sendo possível, também, determinar o intervalo de tempo em que se deseja registrar estes dados.

Conectado ao fermentador, há um analisador de gases, que é composto por uma bomba e um módulo de monitoramento, em que é possível registrarem-se os valores de frações molares de oxigênio e dióxido de carbono no fluxo gasoso à saída do fermentador.

O sistema de fermentação completo é mostrado na Figura 13.

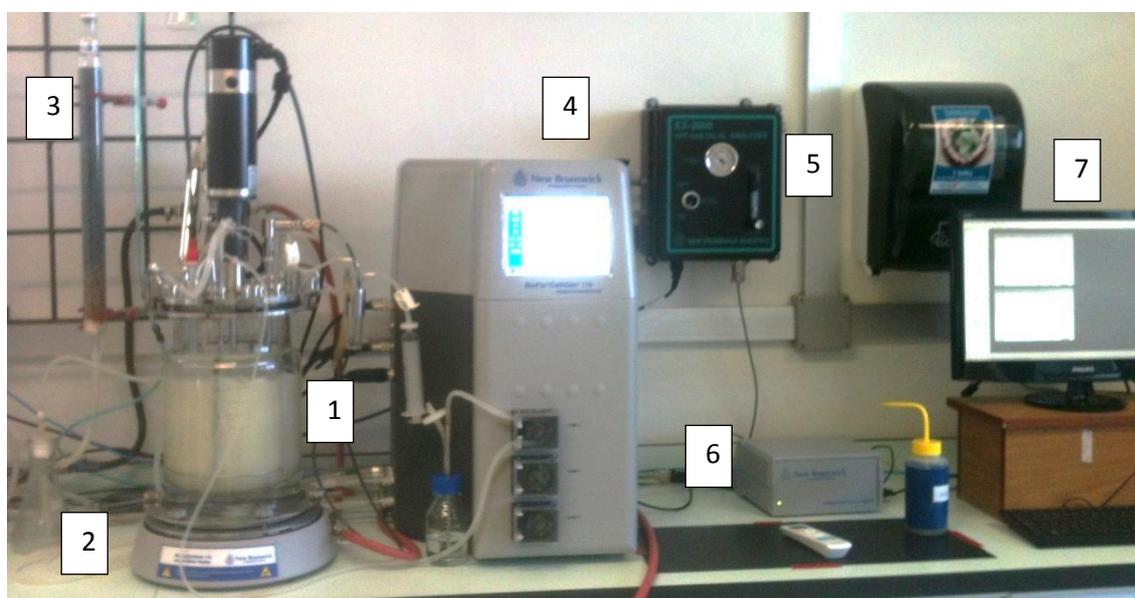


Figura 13 - Sistema utilizado nos cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em biorreator de agitação mecânica New Brunswick BioFlo/CelliGen 115 (EUA). 1-cuba do biorreator, 2-trap para umidade excedente, 3-coluna recheada com cristais de sílica, 4-sistema de monitoramento dos parâmetros acoplado ao reator, 5-bomba, 6-módulo do sistema analisador dos gases, 7- tela com *softwares* utilizados para registro de dados.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Coleta e preparo das amostras

As amostras dos ensaios em fermentador foram coletadas em volumes entre 3 e 4 mL. Imediatamente após a amostragem, uma alíquota de 0,5 mL da cultura foi convenientemente diluída para a medição da absorbância da suspensão de células. O volume restante foi

centrifugado a 10.000 rpm, em centrífuga Sigma, modelo 1-13, equipada com rotor de 9 cm de diâmetro, por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e congelado para determinação de consumo de glicerol e formação de produtos.

3.5.2 Concentração celular

A concentração celular em todos os ensaios foi determinada pela medição da absorbância de suspensões diluídas de meio em fermentação, a 520 nm, e sua conversão em concentração, massa de matéria seca por unidade de volume, através de curva de calibração. As medições foram executadas em espectrofotômetro (PG Instruments).

Para a construção da reta de calibração, um volume de 200 mL de cultura obtido nas condições de preparo do inóculo, foi centrifugado e lavado duas vezes com água destilada, sendo as células ressuspensas a um volume final de 100 mL. Após, 3 mL desta suspensão concentrada foram colocados em três cadinhos de porcelana (3 mL/cadinho). Os cadinhos contendo a suspensão foram mantidos por 24 h, a 90°C. Depois deste período, os cadinhos foram transferidos para um desumidificador por 60 minutos para resfriamento. Uma vez conhecidos os volumes e a massa de células, esta última obtida pela subtração do peso dos cadinhos vazios do peso dos cadinhos com células, determinou-se a concentração celular na cultura original. Em paralelo, mediu-se a absorbância de suspensões celulares em diferentes concentrações em espectrofotômetro (PG Instruments). Para isso, preparou-se uma suspensão celular com absorbância aproximadamente igual a 0,600, medida a 520 nm. A partir desta diluição, foram preparadas diluições de 1:10 até 9:10. A absorbância de cada diluição foi medida e, com base nas absorbâncias das diluições e na concentração já conhecida da cultura original, foi construída uma reta de calibração relacionando a absorbância com a concentração celular (Figura 14).

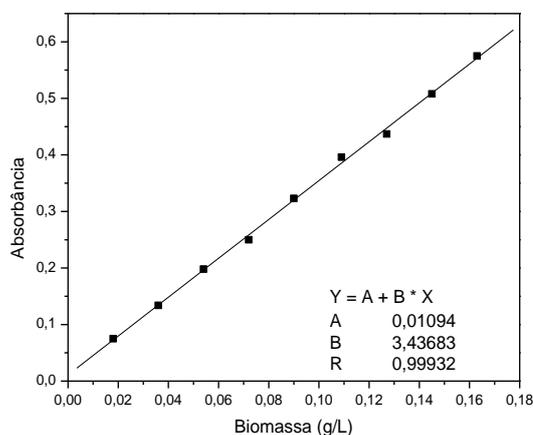


Figura 14 - Exemplo de curva de calibração utilizada na determinação da concentração celular.

3.5.3 Concentração de glicerol

A determinação de concentração de glicerol seguiu a metodologia descrita por Carra (2012), utilizada para quantificar sorbitol, que, no presente trabalho, foi adaptada para glicerol. O procedimento para execução do método consiste em diluir convenientemente as amostras em água destilada, e, em tubo de ensaio, adicionar 0,1 mL de amostra e 0,5 mL de formato de potássio 0,7 mol/L. Em seguida, foram adicionados ao tubo 1 mL de periodato de potássio 3,5 mM e, após 1 minuto, 0,75 mL do reagente descrito a seguir neste item. Ensaios em branco foram preparados, substituindo-se o volume da amostra diluída por água destilada. Os tubos foram, então, levados a um banho a 100°C por 2 minutos, resfriados em banho de gelo, sendo a eles adicionados 2,5 mL de água destilada. A absorbância das preparações foi medida em espectrofotômetro (PG Instruments), a 450 nm. As concentrações de glicerol presentes nas amostras foram determinadas através de reta de calibração construída com soluções de glicerol entre 100 e 1000 mg/L, submetidas ao mesmo processo.

O reagente foi preparado pela dissolução de 70 g de acetato de amônio em 200 mL de água destilada, adicionando-se à solução 1,6 g de tiosulfato de sódio dissolvido em 100 mL de água e 5 mL de acetilacetona, sendo o volume da solução completado com água destilada a 500 mL.

3.5.4 Concentração de produtos da fermentação

Os principais produtos da fermentação – 2,3-butanodiol, acetil-metil-carbinol (acetoína) e etanol – foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Agilent Technology, modelo 9100, utilizando detector de índice de refração, coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, 9 µm), em forno a 60°C, e, como fase móvel, ácido sulfúrico 0,5 mmol/L, à vazão de 0,6 mL/min. Devido ao equilíbrio observado na formação entre 2,3-butanodiol e acetoína, a análise destes resultados foi realizada em conjunto.

3.6 Medição de outros parâmetros

3.6.1 Oxigênio dissolvido

A concentração de oxigênio dissolvido no meio de fermentação (C) foi medida com o uso de uma sonda polarográfica conectada ao fermentador, em que é indicada a percentagem deste gás em relação à saturação no momento da medição. Assim, a concentração de oxigênio

dissolvido foi determinada pelo produto da percentagem medida pela concentração de oxigênio na saturação (C^*) para as condições iniciais de processo. A forma de estimativa de C^* é descrita no item 3.7.5.

Instantes antes da inoculação do meio, já com o fluxo de ar específico e frequência dos agitadores a serem utilizadas no ensaio ajustados, procedeu-se à calibração da sonda de oxigênio dissolvido a 0%, introduzindo-se um fluxo de nitrogênio no meio até que o eletrodo de oxigênio dissolvido acusasse um valor mínimo e constante. Na sequência, ar comprimido seco foi injetado no meio até que um valor máximo e constante fosse registrado; o medidor foi, então, calibrado em 100% de saturação em oxigênio.

3.6.2 Pressão

A pressão no interior do fermentador foi estimada pelo deslocamento de colunas de mercúrio, colocadas em determinadas posições. Em todos os ensaios, estas pressões tiveram valores insignificantes em relação à pressão total, sendo, portanto, desprezadas nos cálculos. Em todos os cálculos, considerou-se a pressão atmosférica constante (aproximadamente igual a 0,92 atm).

3.6.3 Temperatura do fluxo gasoso

A temperatura dos gases que saíam do fermentador foi medida com um termômetro acoplado à saída do condensador. As medidas mostraram não haver diferença considerável entre as temperaturas na entrada e na saída do sistema de fermentação. Assim, considerou-se a temperatura medida na saída do sistema como representativa de toda a fase gasosa do sistema de fermentação.

3.6.4 Oxigênio e dióxido de carbono no fluxo gasoso

Para a determinação das frações molares de oxigênio e de dióxido de carbono no sistema descrito no item 3.4, o fluxo gasoso proveniente do fermentador foi desumidificado pela passagem pelo condensador, pelo *trap* e pela coluna contendo cristais de sílica. Após, os gases foram encaminhados para o analisador de gases acoplado ao fermentador, conforme mostrado na Figura 13.

3.7 Cálculo de parâmetros de avaliação

3.7.1 Fatores de conversão, produtividade volumétrica e rendimento

O fator de conversão de substrato em células relaciona a produção de biomassa com o consumo de substrato e foi determinado pela expressão:

$$Y_{X/S} = (M_{Xf} - M_{X0}) / M_{Scons}$$

Onde:

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

M_{Xf} – massa celular final (g);

M_{X0} – massa celular inicial (g);

M_{Scons} – massa de glicerol consumida (g).

A massa de glicerol consumida foi calculada pela soma das massas inicial e adicionada, da qual se subtraiu a massa residual do substrato.

O fator de conversão de substrato em produto relaciona a formação de 2,3-butanodiol/acetoina e etanol com o consumo de substrato, sendo calculado pela expressão:

$$Y_{P/S} = (M_{Pf} - M_{P0}) / M_{Scons}$$

Onde:

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

M_{Pf} – massa final de produto (g);

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

M_{Scons} – massa de glicerol consumida (g).

Teoricamente, para cada grama de glicerol consumido são formados, no máximo, 0,489 g de butanodiol (2 moles de glicerol \rightarrow 1 mol de 2,3-butanodiol) e 0,500 g de etanol (1 mol de glicerol \rightarrow 1 mol de etanol).

Assim, para o cálculo dos rendimentos para cada produto utilizou-se a equação:

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

Onde:

ρ - rendimento (%);

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

f – fator estequiométrico de conversão.

As produtividades volumétricas para os produtos formados durante o processo foram calculadas por:

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

Onde:

p – produtividade (g/L/h);

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

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

t – tempo de fermentação (h).

Para o cálculo de produtividades em ensaios em regime descontínuo alimentado, as concentrações iniciais (P_0) eram corrigidas pela multiplicação pelo fator V_0/V_f (volume inicial / volume final).

3.7.2 Velocidade específica de crescimento celular

As velocidades específicas de crescimento (μ_x) foram determinadas a partir de curvas correlacionando o logaritmo de concentrações celulares (X) com o tempo de cultivo (t). A derivação da curva $\ln X = f(t)$ gera, então, uma nova curva correlacionando $\mu_x (= d\ln X/dt)$ com o tempo.

Para o caso particular da determinação da máxima velocidade específica de crescimento (μ_{xm}) em um dado ensaio, fez-se a regressão linear do trecho correspondente à fase exponencial da curva $\ln X = f(t)$, sendo o coeficiente angular da equação de reta obtida o próprio valor de μ_{xm} .

3.7.3 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($K_L a$) foi determinado em meio não inoculado, utilizando-se o método estático definido por Moo-Young & Blanch (1989), em que um eletrodo de oxigênio dissolvido é acoplado ao reator para registrar os valores de porcentagem de oxigênio na saturação.

Inicialmente, com a frequência de agitadores mantida no valor em que se desejava medir o $K_L a$, introduziu-se um fluxo de nitrogênio no reator até que o eletrodo de oxigênio dissolvido acusasse um valor mínimo e constante. Na sequência, ar comprimido seco foi injetado no reator na vazão em que se desejava medir o $K_L a$ e, com auxílio de um cronômetro, foram registrados os dados de tempo e percentual de oxigênio na saturação. A partir dos dados obtidos, o $K_L a$ foi calculado a partir da equação:

$$K_L a = - [\ln (1-\beta) / (1-\alpha)] / t$$

Onde:

α – fração da saturação em oxigênio no início da medida;

β – fração da saturação em oxigênio no final da medida;

t – tempo para que a concentração de oxigênio dissolvido aumente de α até β .

3.7.4 Demanda de oxigênio pelo cultivo

A demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR, *oxygen uptake rate*) foi calculada pela equação (Silveira, 1991):

$$\text{OUR} = (Q_{\text{N}_2} / V) \cdot \{ [Y_{\text{O}_2\text{e}} / (1 - Y_{\text{O}_2\text{e}})] - [Y_{\text{O}_2\text{s}} / (1 - Y_{\text{O}_2\text{s}} - Y_{\text{CO}_2\text{s}})] \}$$

Onde:

OUR - demanda de oxigênio no cultivo (mmol/L/h)

Q_{N_2} - vazão molar de nitrogênio na entrada do biorreator (mmol/h);

V - volume de meio (L)

$Y_{\text{O}_2\text{e}}$ - fração molar de oxigênio na entrada do fermentador (0,209)

$Y_{\text{O}_2\text{s}}$ - fração molar de oxigênio na saída do fermentador

$Y_{\text{CO}_2\text{s}}$ - fração molar de dióxido de carbono na saída do fermentador

O valor de Q_{N_2} foi calculado pelo produto da vazão molar de ar na entrada do sistema (Q_{Ar}) pela fração molar média de nitrogênio no ar (0,791). Q_{Ar} , por sua vez, foi determinado pela seguinte equação:

$$Q_{\text{Ar}} = Q_{\text{V}} \cdot P \cdot 1000 / (R \cdot T)$$

Onde:

Q_{Ar} - vazão molar de ar na entrada do biorreator (mmol/h);

Q_{V} - vazão volumétrica de ar na entrada do biorreator (L/h);

P - pressão total no biorreator (atm);

R - constante dos gases (0,082 atm.L/(mol.K));

T - temperatura da fase gasosa (K).

3.7.5 Concentração de oxigênio na saturação

Para a estimativa da concentração de oxigênio na saturação no meio (C^*), no tempo inicial de processo, seguiu-se o modelo descrito por Schumpe & Quicker (1982), mostrado a seguir, em que são considerados os efeitos dos diferentes componentes, eletrólitos e não-eletrólitos, presentes em solução:

$$\log (C_0^* / C^*) = \sum H_i \cdot I_i + \sum K_j \cdot C_j$$

Onde:

C_0^* - concentração de oxigênio na saturação em água (mmol/L);

C^* - concentração de oxigênio na saturação no meio (mmol/L);

H_i - efeito de espécies iônicas sobre a solubilidade do oxigênio (L/mol);

I_i - força iônica (mol/L);

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

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

Para a parcela ΣH_i do meio de Pirt & Callow (PC), o valor de 0,0261 foi previamente determinado por Silveira (1991). Para o glicerol, o parâmetro K_j tabelado por Schumpe & Quicker (1982) é $4,07 \cdot 10^{-4}$ L/g.

Considerando-se que a temperatura de 37°C e pressão de 0,92 atm, valor admitido para a altitude média de Caxias do Sul, C_0^* é aproximadamente igual a 0,196 mmol/L, C^* foi calculado pela seguinte equação:

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

Onde:

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

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

3.7.6 Máxima velocidade de transferência de oxigênio

A máxima velocidade de transferência de oxigênio (OTR característica, *oxygen transfer rate*) foi calculada, conforme Pirt (1975), a partir da equação:

$$\text{OTR característica} = K_{La} \cdot C^*$$

Onde:

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

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

C^* – concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio (mmol/L)

3.8 Ensaios realizados

Nos itens a seguir, são descritos os ensaios realizados neste trabalho e o objetivo de estudo em cada um. As condições experimentais dos ensaios também são descritas.

3.8.1 Cultivos conduzidos em regime descontínuo

Inicialmente, neste trabalho, foram conduzidos cultivos em regime descontínuo sob suprimentos de oxigênio relativamente baixos (Ensaios 1 a 7), com valores fixos de frequência de agitadores (500 rpm) e de fluxo específico de ar (0,50 vvm) e diferentes concentrações iniciais de glicerol (S_0) (Tabela 2). O objetivo destes ensaios foi verificar o efeito conjunto de S_0 e da limitação de oxigênio sobre o crescimento de *E. aerogenes* e a formação dos produtos de fermentação (2,3-butanodiol / acetoína e etanol).

Na sequência, foram conduzidos novos experimentos, sob condições que proporcionavam elevada transferência de oxigênio ao meio, em ensaios com diferentes concentrações iniciais de glicerol (Tabela 2). Nestes ensaios, teve-se como objetivo aumentar

a produtividade do processo através do favorecimento do crescimento celular por um período maior dos cultivos. No caso, procurou-se manter, pelo maior tempo possível, a concentração de oxigênio dissolvido (C) acima da concentração crítica para o microrganismo. Porém, na falta de dados específicos para o valor da concentração crítica de oxigênio para *E. aerogenes*, optou-se por manter C em valores mínimos em torno de 30% da saturação, admitindo-se que, nesta condição, tinha-se a garantia de disponibilidade irrestrita de oxigênio para o microrganismo. Desta forma, as condições iniciais de agitação e aeração foram, respectivamente, 650 rpm e 0,50 vvm e, no decorrer do cultivo, conforme a concentração de oxigênio dissolvido mensurado fosse abaixo de 30% da saturação, a frequência dos agitadores foi aumentada até o limite de 750 rpm. Após isso, passou-se a usar o aumento do fluxo específico de ar, até o máximo de 0,87 vvm, para tentar manter o controle do oxigênio dissolvido.

Tabela 2 - Condições operacionais utilizadas nos ensaios conduzidos em regime descontínuo.

Ensaio	S₀ (g/L)	Frequência dos agitadores (rpm)	Fluxo específico de ar (vvm)
1	20	500	0,50
2	40	500	0,50
3	60	500	0,50
4	80	500	0,50
5	100	500	0,50
6	140	500	0,50
7	180	500	0,50
8	40	650-750	0,50-0,87
9	60	650-750	0,50-0,87
10	100	650-750	0,50-0,87
11	140	650-750	0,50-0,87
12	180	650-750	0,50-0,87

S₀ – concentração inicial nominal de glicerol.

3.8.2 Cultivos conduzidos em regime descontínuo alimentado

Ensaio em regime descontínuo alimentado, com baixa e alta transferência de oxigênio, foram realizados tendo como base os resultados obtidos nos ensaios em batelada com concentrações iniciais crescentes de glicerol. Os cultivos foram iniciados com 3 L de meio, contendo 60 g/L de glicerol. Durante a fermentação, 1 L de meio, com 780 g de glicerol e nutrientes do meio de Pirt & Callow, foram adicionados ao fermentador, a uma vazão inicial de 20 mL/h, sendo esta vazão reduzida ou aumentada, de acordo com o consumo de substrato. O início de alimentação ocorreu quando foi quantificada a concentração de glicerol no meio em torno de 30 g/L. As condições de frequência dos agitadores e fluxo de ar específico para o cultivo denominado 13 foram as mesmas do grupo dos ensaios caracterizados como elevada transferência de oxigênio. Já para o ensaio denominado 14, as condições operacionais referentes à frequência dos agitadores e fluxo específico de ar foram, respectivamente, de 750 rpm e 0,50 vvm, com o objetivo de diminuir o suprimento de oxigênio no meio, favorecendo, assim, o aumento da concentração final de 2,3-butanodiol / acetoína. Nesses ensaios conduzidos em regime descontínuo alimentado, a concentração inicial equivalente correspondeu a 240 g/L.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos no presente trabalho, com respeito à formação de produtos de fermentação e ao crescimento de *Enterobacter aerogenes*, relacionados aos seguintes aspectos:

- efeito da concentração inicial de glicerol (20 a 180 g/L) em ensaios conduzidos em regime descontínuo com baixa velocidade de transferência de oxigênio (12,9 a 9,7 mmol/L/h, respectivamente), com frequência de agitadores de 500 rpm e fluxo específico de ar de 0,50 vvm;

- avaliação da influência da concentração inicial de glicerol (40 a 180 g/L) em experimentos realizados em regime descontínuo com alta velocidade de transferência de oxigênio (22,8 a 15,8 mmol/L/h), frequência dos agitadores que variaram de 650 até 750 rpm e fluxo específico de ar de 0,50 até 0,87 vvm;

- análise do processo conduzido em regime descontínuo alimentado, nas condições de alta e baixa velocidade de transferência de oxigênio definidas acima, buscando-se evitar a inibição no crescimento celular causada por altas concentrações iniciais de glicerol e atingir elevadas concentrações de 2,3-butanodiol/acetoina.

4.1 Efeito da concentração de glicerol em cultivos em regime descontínuo com baixa velocidade de transferência de oxigênio

Neste item são discutidos os resultados obtidos nos ensaios conduzidos com concentrações iniciais de glicerol (S_0) de 20 a 180 g/L, todos submetidos à mesma condição de frequência dos agitadores e fluxo específico de ar, de 500 rpm e 0,50 vvm, respectivamente, condição definida neste trabalho como de baixa transferência de oxigênio. Estes ensaios foram denominados 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente para S_0 de 20, 40, 60, 80, 100, 140 e 180 g/L e OTR característica de 12,9, 11,8, 11,0, 10,5, 10,3, 9,6 e 9,7 mmol/L/h.

Nas Figuras de 15 a 21, são mostrados os perfis cinéticos dos ensaios com (S_0) de 20 a 180 g/L, com relação às variações das concentrações de células, glicerol e oxigênio dissolvido (C) e da demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

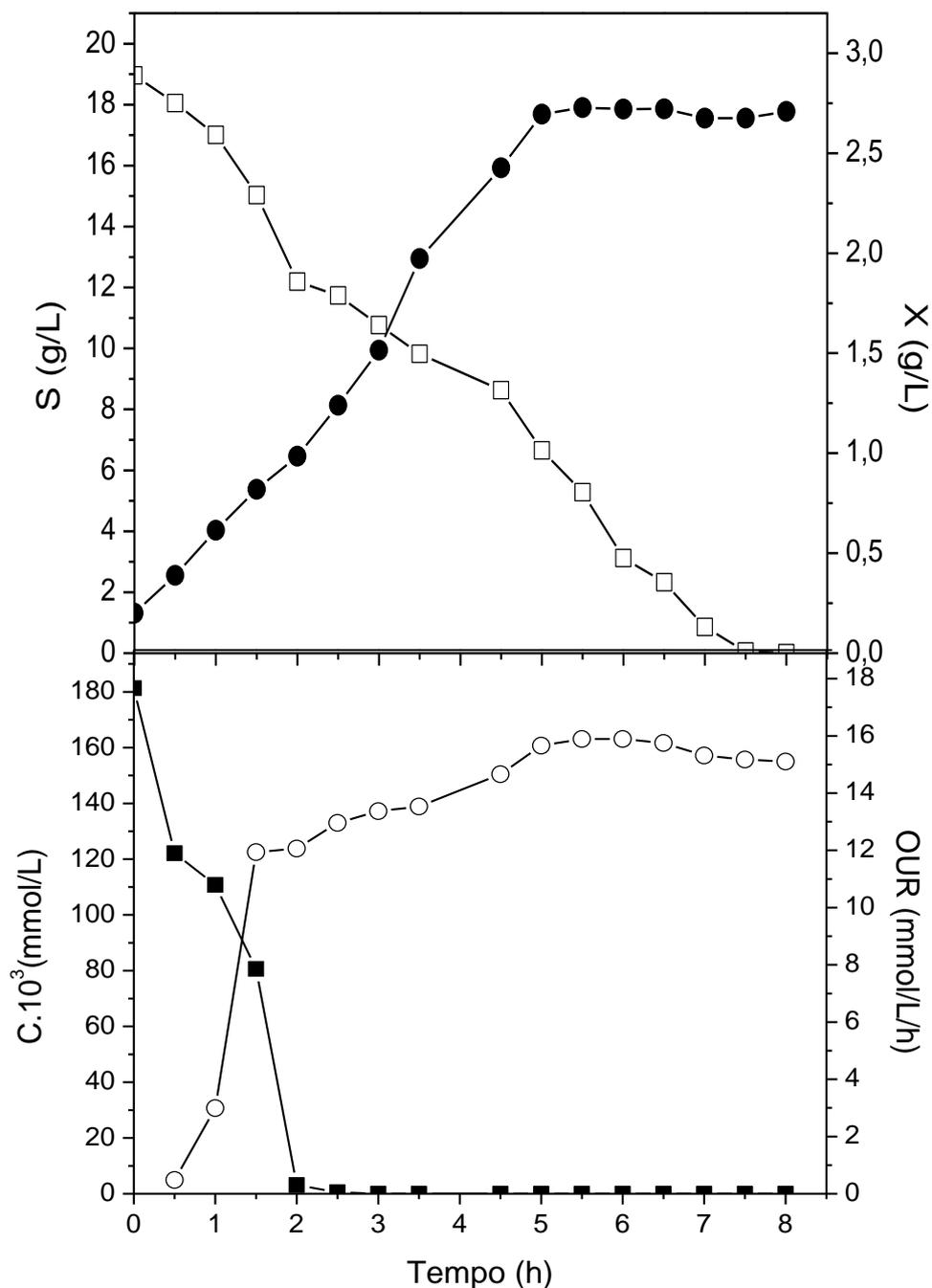


Figura 15 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (12,9 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 1 ($S_0 = 20$ g/L). (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

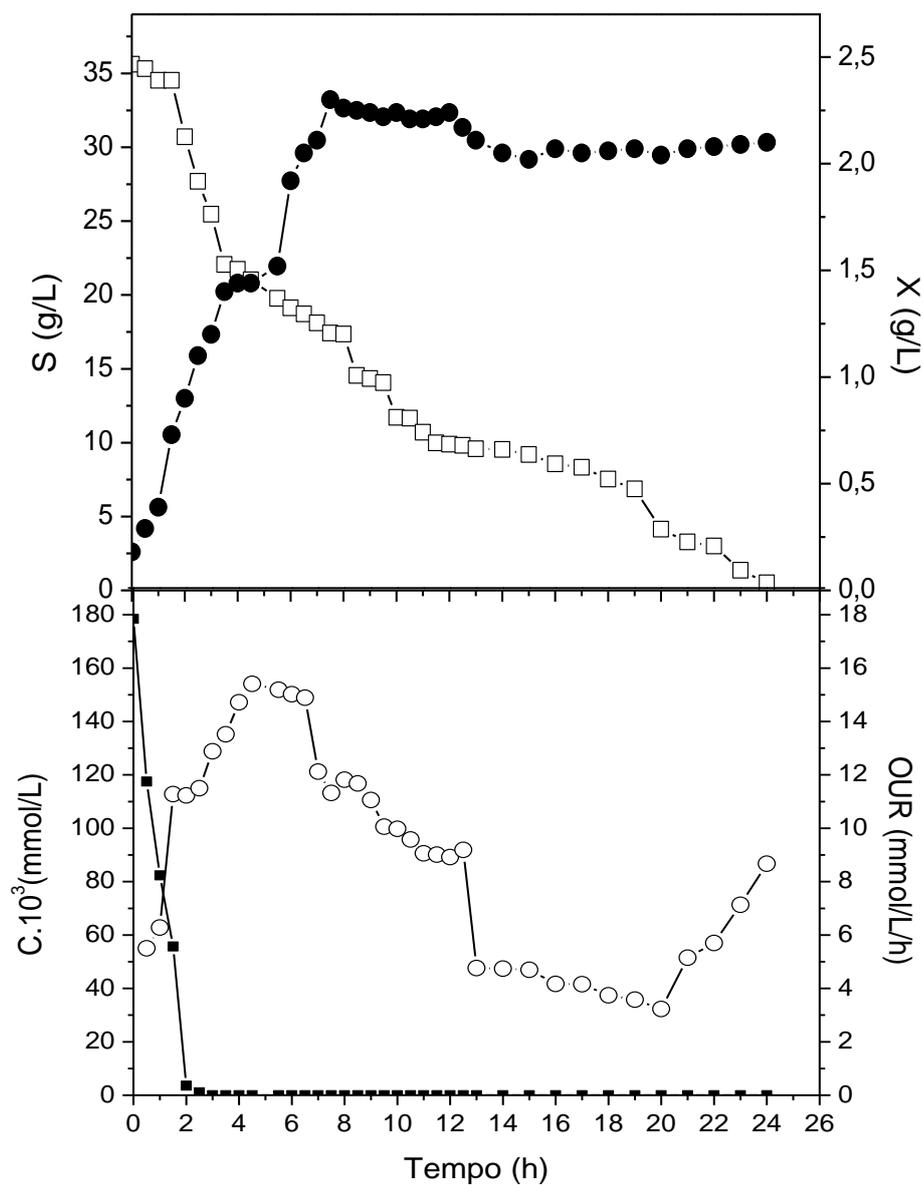


Figura 16 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (11,8 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 2 ($S_0 = 40$ g/L). (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

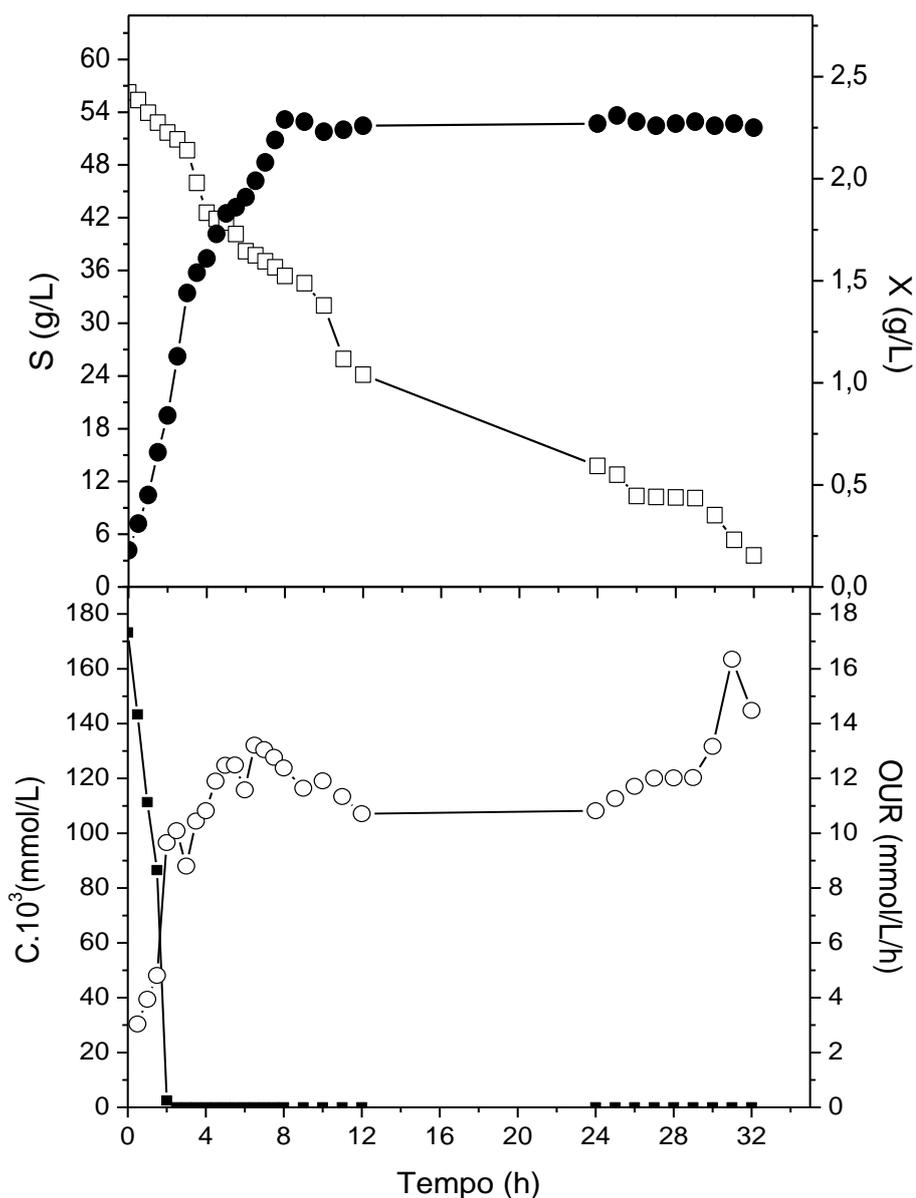


Figura 17 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (11,0 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 3 ($S_0 = 60$ g/L). (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

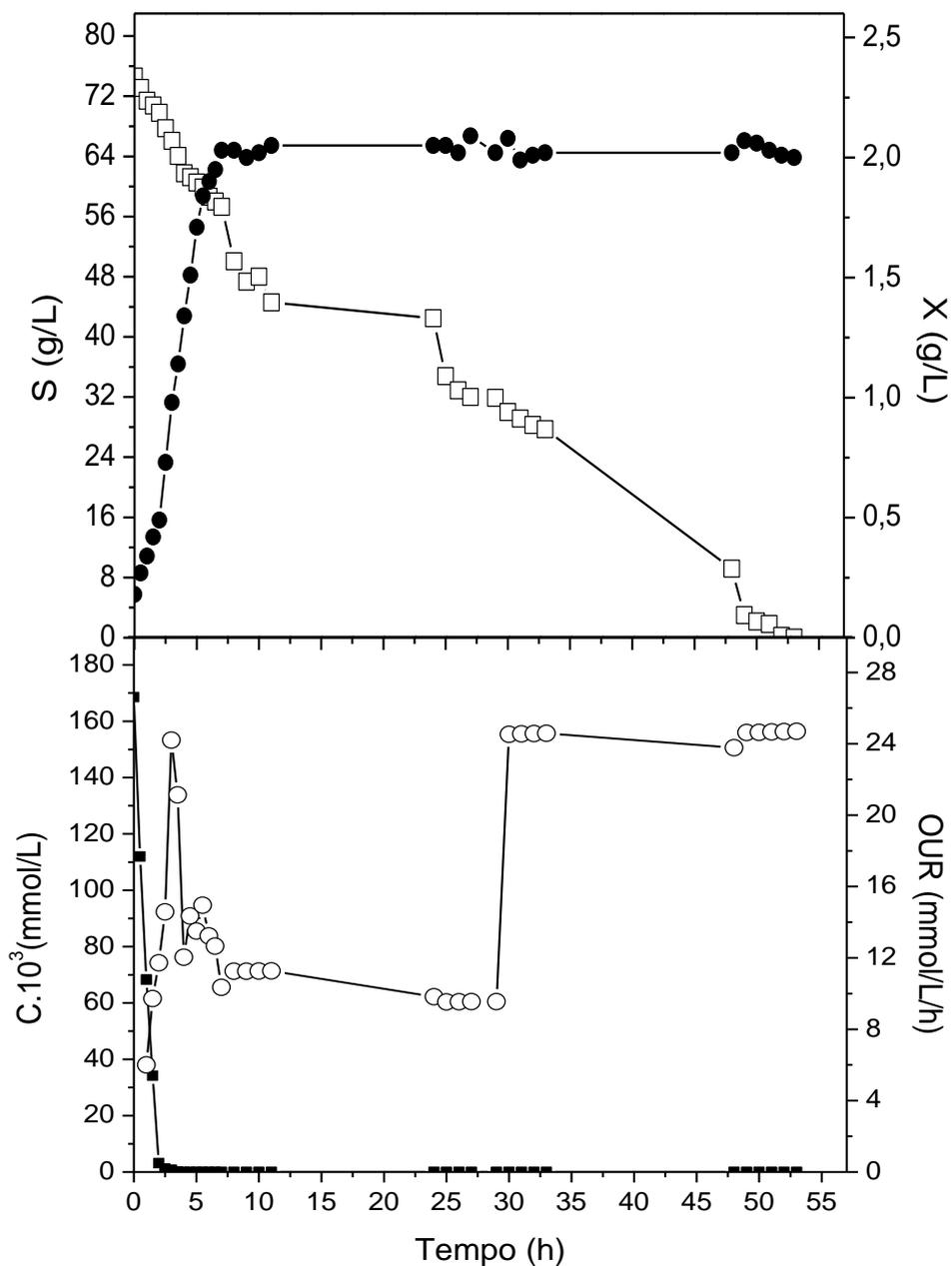


Figura 18 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (10,5 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 4 ($S_0 = 80$ g/L). (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

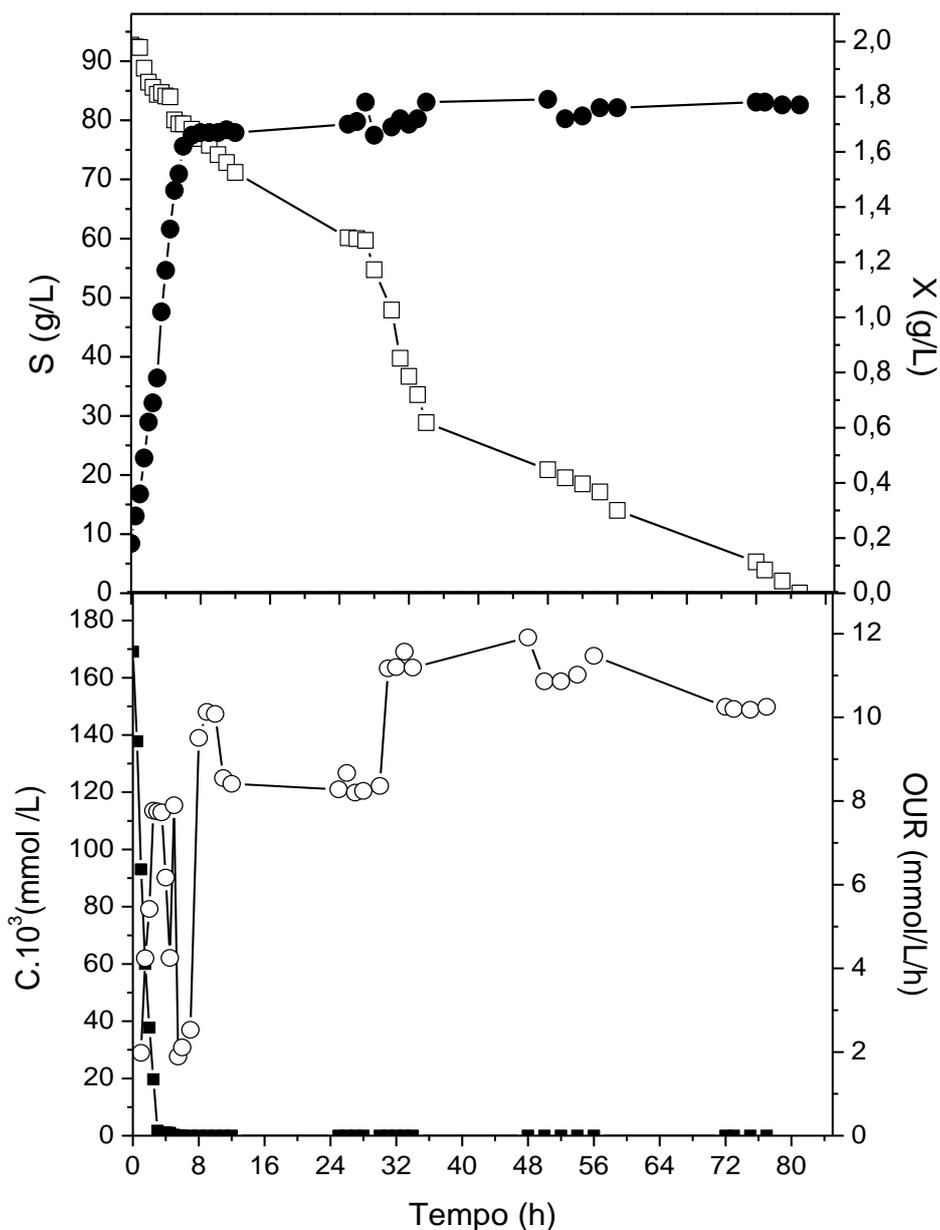


Figura 19 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (10,3 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 5 ($S_0 = 100$ g/L). (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

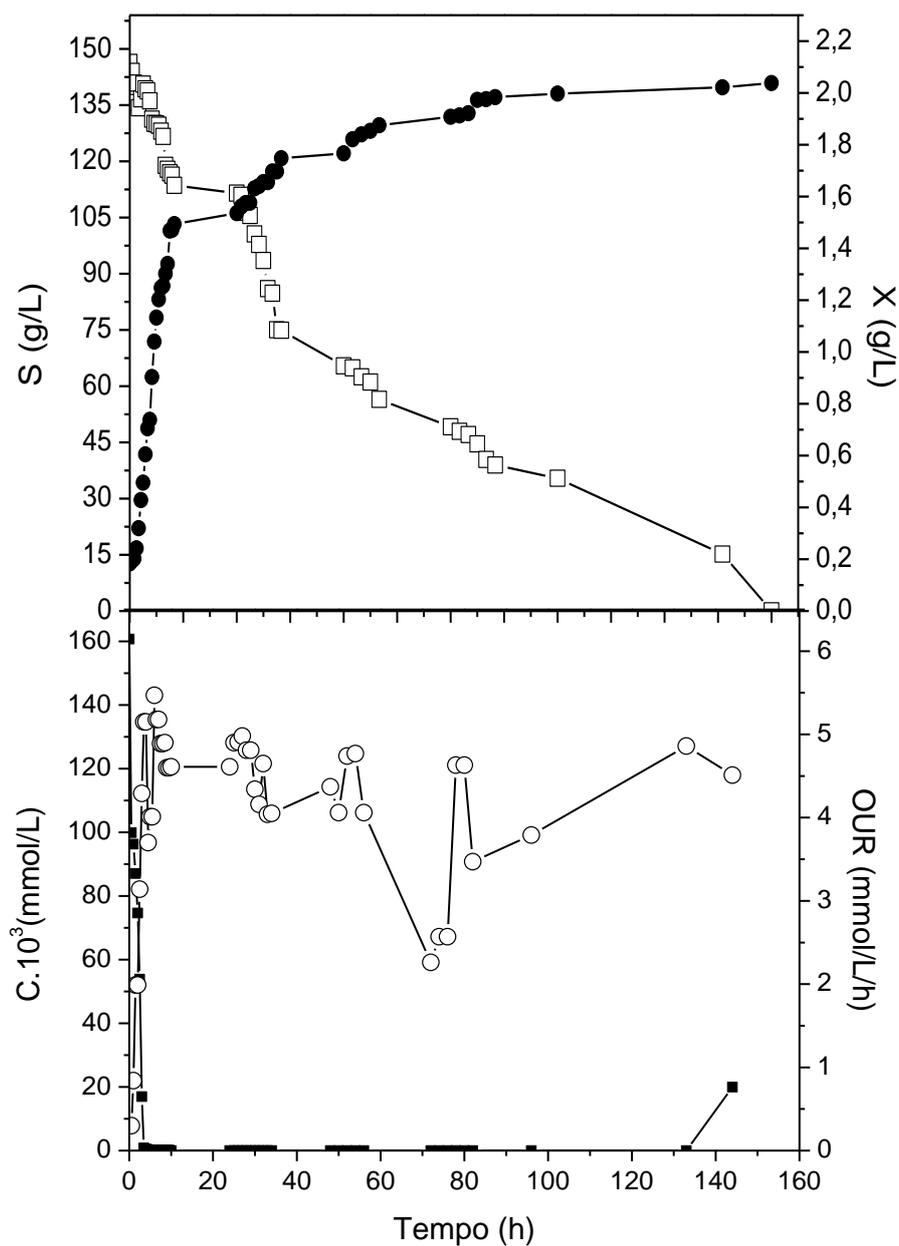


Figura 20 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (9,6 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 6 ($S_0 = 140$ g/L). (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

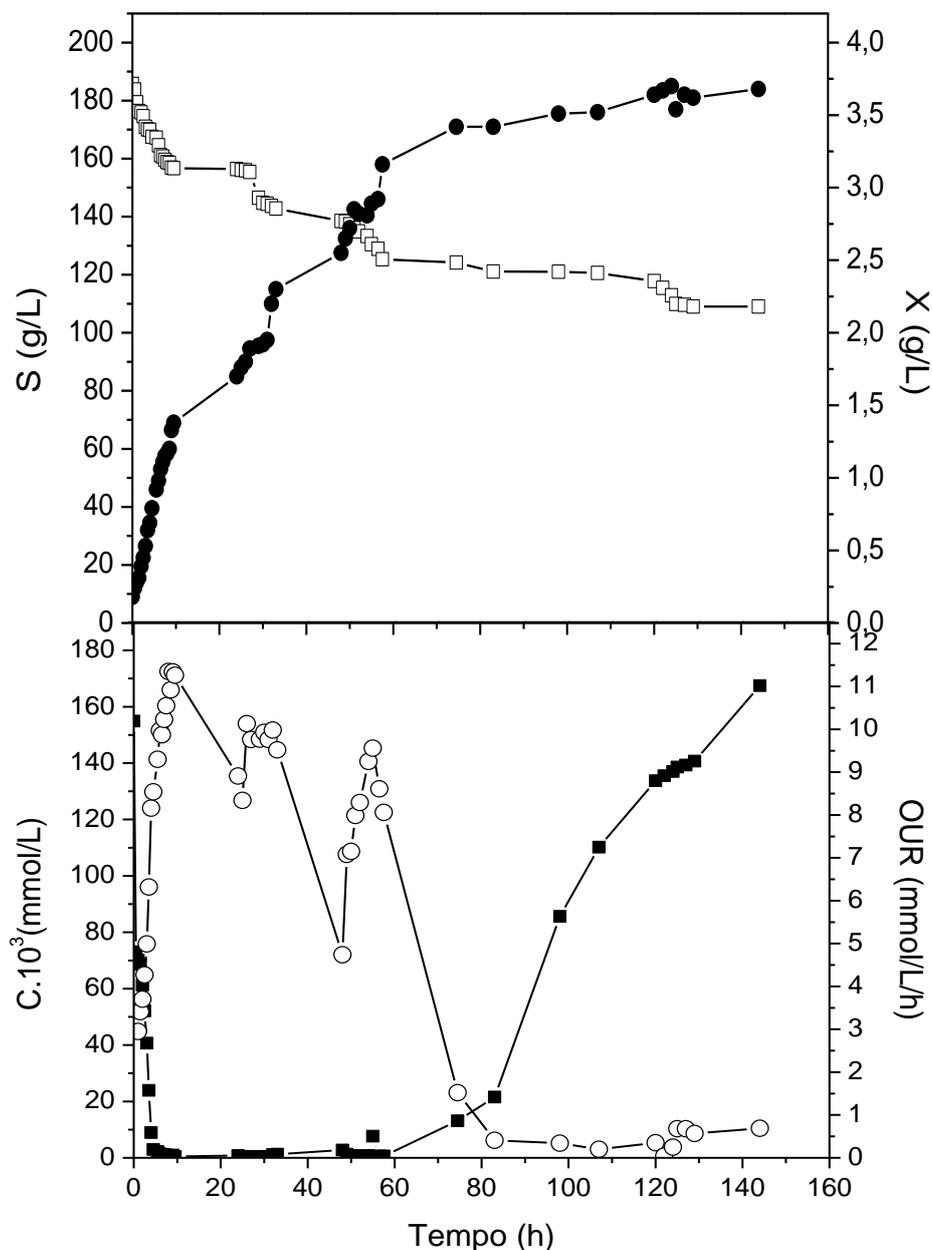


Figura 21 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (9,7 mmol/L/h), 500rpm, 0,50vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 7 ($S_0 = 180$ g/L). Adição ao meio de cultivo dos sais nutrientes fosfato e sulfato de amônio (8 e 6 g, respectivamente, dissolvidos em 10 mL de água destilada) em 48 h e 56 h de ensaio. (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

Independentemente da concentração de glicerol utilizada, a fase “lag” de crescimento celular foi praticamente nula. Nos Ensaios 1 e 2 (Figuras 15 e 16), valores de oxigênio dissolvido nulo foram observados após cerca de 2 horas de cultivo. Nos Ensaios 3, 4, 5 e 6 (Figuras 17 a 20) valores nulos foram observados em torno de 3 horas de processo. Já no Ensaio 7, com $S_0 = 180$ g/L (Figura 21), o oxigênio permaneceu em solução por aproximadamente 6 horas.

A curta fase de adaptação celular e a queda acentuada nos valores de concentração de oxigênio dissolvido em todos os ensaios se deveram ao intenso metabolismo microbiano. Os valores de OUR foram superiores nas primeiras horas, em torno de 13 mmol/L/h no Ensaio 1, mantendo-se neste patamar até o final do ensaio, e 16 mmol/L/h no Ensaio 2, seguido de queda nos valores e aumento nas horas finais de ensaio. Nos demais Ensaios foram observadas oscilações nos perfis, que se devem à atividade respiratória do microrganismo, que é intensa nos períodos iniciais de cultivo e reduzida nos períodos de fase estacionária de crescimento celular.

Quando há declínio nos valores de C para zero, o perfil do crescimento celular em função do tempo se tornou linear. No entanto, longa fase estacionária foi constatada nos Ensaios 2, 3, 4, 5 e 6, que tiveram início em, aproximadamente, 6, 8, 7, 8 e 10 h, respectivamente, mantendo-se até o final dos cultivos. Estas longas fases estacionárias se deveram, provavelmente, à condição de limitação no suprimento de oxigênio imposta neste grupo de ensaios.

Maior concentração celular foi alcançada no Ensaio 7, em torno de 3,7 g/L. Nos demais ensaios valores próximos a 2 g/L foram atingidos, com exceção do Ensaio 1, em que foi quantificada ao final da fermentação concentração celular de 2,7 g/L. Cabe ressaltar que, neste cultivo, o período de limitação de oxigênio foi menor quando comparado com os demais, em virtude da menor concentração de glicerol empregada, favorecendo, assim, a formação de massa celular.

No Ensaio 7, foi observado, em torno de 48 h, aumento nos valores de C, fato que pode ter ocorrido em virtude da escassez de algum nutriente (Figura 21). Devido a isso, foi acrescentada no cultivo uma solução concentrada de sulfato e fosfato de amônio (8 e 6 g, respectivamente, dissolvidos em 10 mL de água destilada). Imediatamente após a adição destes nutrientes, a concentração de oxigênio dissolvido decaiu para valores nulos. Em torno de 56 h, o mesmo comportamento foi observado e, novamente, foram adicionadas as fontes de nitrogênio, da mesma forma como descrito anteriormente. Igualmente, a concentração de oxigênio dissolvido decaiu para zero. A queda nos valores de C pode ser atribuída ao retorno

do metabolismo microbiano em direção à via oxidativa, em que a formação de células é priorizada. Isto pôde ser verificado no aumento da concentração celular após a adição dos nutrientes. No entanto, no tempo de aproximadamente 75 h, mais uma vez houve aumento nos valores de C, sendo gradual até valores próximos de 0,170 mmol/L (Figura 21). Porém, neste momento, não foi adicionada ao meio nenhuma fonte de nutriente. No momento em que houve aumento nos valores C, foi observada redução na OUR, devido ao menor consumo de oxigênio, sendo diminuídos no final do ensaio para valores próximos a zero.

Há relatos na literatura mostrando que altas concentrações de nutrientes podem reduzir a atividade de água, afetando assim o desenvolvimento microbiano e, também, a formação de 2,3-butanodiol. Este fato é referido por Berbert-Molina (1995), em ensaios com caldo de cana-de-açúcar, diluído a aproximadamente 180 g/L de sacarose e a bactéria *K. pneumoniae* ATCC 8724 suplementado com 8 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, e também com o mesmo meio de nutrientes utilizado no presente trabalho. Foi relatada redução nos valores de máxima velocidade específica de crescimento de $0,61 \text{ h}^{-1}$ em ensaio com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, para $0,45 \text{ h}^{-1}$ em ensaio com meio rico em nutrientes. Além disso, ocorreu também diminuição nos valores das máximas velocidades específicas de formação de produto, $0,53$ e $0,45 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Quanto ao consumo de glicerol, destaque-se que, no Ensaio 7, determinou-se uma concentração residual de 109,4 g/L, mesmo após 125 h de cultivo, em função provavelmente de inibição no desenvolvimento celular causada por alta concentração inicial de glicerol, que acarretou em fermentação incompleta. Em ensaios realizados por Hartmann *et al.* (2014) com a bactéria *K. oxytoca* ATCC 8724, comportamento semelhante foi observado. Em cultivo com 160 g/L de glicerol, a fermentação foi incompleta, sendo quantificado, em 72 h, valor residual de 100 g/L. Ao comparar o uso de glicerol com o uso de substratos açucarados, como sacarose, glicose e xilose, tal característica de fermentação incompleta não é observada. Silveira *et al.* (1998), em experimento em que empregaram S_0 da ordem de 200 g/L de sacarose com condições de OTR de aproximadamente $4 \text{ mmolO}_2/\text{L/h}$, metade do que o utilizado no presente estudo, verificaram, no entanto, consumo total da sacarose. Ji *et al.* (2009) realizaram ensaio com 200 g/L de glicose, frequência dos agitadores de 100 rpm e fluxo específico de ar de 1 vvm, com *K. oxytoca* ME-UD-3. Ao final do cultivo, em aproximadamente 70 h, consumo total de glicose foi observado. Jansen *et al.* (1984), em cultivo de *K. oxytoca* com o emprego de concentrações iniciais crescentes de xilose (5 a 150 g/L), relatou consumo integral deste substrato em todas as condições testadas.

Ao realizar uma busca na literatura sobre outros usos do glicerol, foi encontrado que

ele é largamente utilizado como estabilizante para atividade enzimática e na prevenção do crescimento microbiano nos produtos (Placek *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2013). Além disso, há relatos do uso na área da medicina veterinária (Gioso *et al.*, 2002). Associando o fato de consumo incompleto do glicerol tanto por *E. aerogenes*, quanto por *K. oxytoca*, pode-se levantar a hipótese de que elevadas concentrações iniciais de glicerol, acima de 140 g/L, associadas à baixa transferência de oxigênio, podem ser mais prejudiciais para o desenvolvimento microbiano do que se observa com substratos açucarados.

Foram efetuadas medidas de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) em meio isento de células nas condições operacionais de cultivo (500 rpm, 0,50 vvm, 37°C). Valores de K_{La} de 70 h⁻¹ e 63 h⁻¹, foram obtidos respectivamente para concentrações de glicerol de 20 e 180 g/L, não havendo grandes alterações nos valores nas concentrações intermediárias. Desta forma, alterações nos valores de K_{La} são possíveis se forem modificados parâmetros como frequência dos agitadores e fluxo específico de ar (Tabela 3).

Na Tabela 3 são mostrados os resultados gerais obtidos nos ensaios realizados. Máximas velocidades específicas de crescimento (μ_{xm}) foram medidas quando o oxigênio permanecia em solução. Observou-se redução nos valores de μ_{xm} com o aumento de S_0 , especialmente a partir do Ensaio 4 ($S_0 = 80$ g/L), sendo esta redução mais acentuada no Ensaio 7 ($S_0 = 180$ g/L) em que foi determinado μ_{xm} de 0,26 h⁻¹, indicando, assim, efeito inibidor de concentrações mais altas de substrato sobre o crescimento celular. Estes valores são semelhantes aos obtidos nos ensaios realizados por Hartmann *et al.* (2014), com *K. oxytoca* e glicerol como fonte de carbono. Os autores relataram que em cultivo com $S_0 = 160$ g/L, valores de μ_{xm} de 0,21 h⁻¹ foram quantificados. Jansen *et al.* (1984), em cultivos com *K. oxytoca*, descreveram redução nos valores μ_{xm} , com concentrações de xilose a partir de 20 g/L. Sablayrolles & Goma (1984) também estudaram o efeito da concentração de glicose sobre cultivos de *Aerobacter aerogenes* (*K. pneumoniae*), tendo medido, para $S_0 = 195$ g/L, um valor de μ_{xm} de 0,19 h⁻¹. No entanto, os valores do trabalho atual são inferiores quando comparados com os estudos realizados por Berbert-Molina *et al.* (2001). Nesse trabalho foi utilizada *K. pneumoniae* e caldo de cana-de-açúcar diluído a aproximadamente 180 g/L de sacarose. Nessas condições os autores relataram valores de μ_{xm} de 0,36 h⁻¹. As bactérias citadas - *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* e *A. aerogenes* - são todas descritas à mesma linhagem, NRRL B199, ou também descritas com a linhagem ATCC 8724.

Tabela 3 - Resultados gerais dos cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, a 37°C, pH 5,5, 500 rpm, 0,50 vvm, com concentrações crescentes de glicerol e baixa velocidade de transferência de oxigênio (12,9 a 9,7 mmol/L/h).

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7
S₀ (g/L)	18,9	35,6	56,2	74,6	92,7	146,4	185,7
X₀ (g/L)	0,19	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
X_f (g/L)	2,70	2,10	2,25	2,00	1,77	2,03	3,68
S_F (g/L)	0	0,5	3,5	0	0	0	109,4
t_f (h)	8	24	32	53	77	144	144
Y_{X/S} (g/g)	0,132	0,055	0,039	0,034	0,017	0,008	0,047
μ_{xm} (h⁻¹)	0,69	0,83	0,70	0,51	0,52	0,45	0,26
C* (mmol/L)	0,181	0,178	0,175	0,172	0,169	0,161	0,155
OTR característica (mmol/L/h)	12,9	11,8	11,0	10,5	10,3	9,6	9,7
K_La (h⁻¹)	71	66	63	61	61	60	63
2,3-Butanodiol/acetoína (t₀) (g/L)	0,48	0,54	0,52	0,63	0,52	0,47	0,50
2,3-Butanodiol/acetoína (t_f) (g/L)	4,9	10,9	17,7	31,6	42,2	63,6	31,1
Y_{P/S}butanodiol (g/g)	0,234	0,295	0,326	0,415	0,449	0,431	0,279
ρ_{butanodiol} (%)	47,8	60,3	66,6	84,8	91,8	88,1	57,0
p_{butanodiol} (g/L/h)	0,55	0,43	0,53	0,58	0,54	0,44	0,21
Etanol (t₀) (g/L)	0,31	0,21	0,36	0,31	0,21	0,22	0,23
Etanol (t_f) (g/L)	2,8	3,3	3,6	3,1	3,4	ND	ND
Y_{P/Setanol} (g/g)	0,131	0,090	0,063	0,037	0,034	ND	ND
ρ_{etanol} (%)	26,2	18,0	12,6	7,4	6,8	ND	ND
p_{etanol}(g/L/h)	0,31	0,13	0,10	0,05	0,04	ND	ND

X₀ e X_f - concentração celular inicial e final em cultivos; S₀ e S_f - concentrações inicial e final de glicerol em cultivos; t₀ e t_f - tempo inicial e final dos ensaios; Y_{X/S} - fator de conversão de substrato em células; μ_{xm} - máxima velocidade específica de crescimento celular; C* - concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio; OTR característica - velocidade de transferência de oxigênio; K_La - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio; Y_{P/S} - fator de conversão de substrato em produtos; ρ - rendimento em 2,3-butanodiol/acetoína em relação ao máximo teórico (0,489 g/g glicerol) e rendimento em etanol em relação ao máximo teórico (0,500 g/g glicerol); p - produtividade volumétrica; ND - não detectado, ou apenas traços. 1 - 20 g/L; 2 - 40 g/L; 3 - 60 g/L; 4 - 80 g/L; 5 - 100 g/L; 6 - 140 g/L; 7 - 180 g/L.

Aumento no rendimento em 2,3-butanodiol/acetoína, em relação ao máximo teórico (0,489 g/g de glicerol), foi observado com o incremento de S₀ até 92,7 g/L (Ensaio 5) (Tabela 3), sendo neste ensaio obtido rendimento de 91,8%. Este resultado é semelhante ao encontrado por Silveira *et al.* (1998), com *K. pneumoniae* ATCC 8724, em que, com 95 g/L

de sacarose, foram obtidos 93,2 % de rendimento. Romio *et al.* (2014), em cultivo com a mesma linhagem bacteriana, com concentração inicial de glicerol de 57,9 g/L, relataram a obtenção de 61% de rendimento, resultado semelhante ao obtido no Ensaio 3 ($S_0 = 60$ g/L), em que se obteve 66% de rendimento.

Com relação aos resultados de produtividade volumétrica de 2,3-butanodio/acetoina, não foram observadas grandes variações nos valores nos Ensaio 1 a 6, havendo, por outro lado, considerável redução no Ensaio 7 (Tabela 3). Uma vez que não houve incremento na concentração celular com o aumento de S_0 , devido provavelmente à limitação no suprimento de oxigênio, os ensaios exigiram um maior tempo de processo, já que a população microbiana era inferior para converter o glicerol em 2,3-butanodiol/acetoina. Isto influenciou de forma negativa os valores de produtividade. No Ensaio 6 ($S_0 = 140$ g/L), mesmo com a maior concentração final de 2,3-butanodiol/acetoina, a produtividade obtida foi de 0,44 g/L/h, sendo que o tempo necessário de cultivo foi de 144 h.

Perego *et al.* (2000) testaram a influência de S_0 (20 a 100 g/L de glicose) sobre a produção de butanodiol por *E. aerogenes* (NCIMB 10102). Em termos de concentração final e produtividade, os autores relataram aumento nos valores com concentrações crescentes de glicose. No ensaio com S_0 de 100 g/L, é descrito pelos autores produtividade de 0,52 mmol/L/h (média de produtividade volumétrica calculada no final do ensaio) e concentração final de 33 g/L de butanodiol. Essa concentração é inferior quando comparada com a obtida no presente estudo com mesmo S_0 . Silveira *et al.* (1998) relataram aumento na produtividade com o incremento de sacarose até 95 g/L, observando redução com o uso de S_0 em torno de 200 g/L. Sablayrolles & Goma (1984) também observaram aumento nos valores de produtividade com o aumento da concentração de glicose. No entanto, estes mesmos autores observaram redução na produtividade, ao aumentar a concentração de glicose de 107 g/L para 195 g/L, sendo obtidos valores de 2,02 e 1,10 g/L/h, respectivamente. Jansen *et al.* (1984) descreveram comportamento semelhante, incremento na produtividade com o aumento de S_0 até 100 g/L de xilose.

Observa-se, a partir dos resultados mostrados na literatura, que o uso de substratos açucarados em concentrações crescentes de até aproximadamente 100 g/L não afeta consideravelmente a produtividade, resultando, pelo contrário, em aumento nos seus valores. Essa característica não foi observada no presente estudo, em função, provavelmente, do tempo de cultivo que foi cada vez maior com o aumento de S_0 . Isso se deve, provavelmente, ao fato de que, no presente estudo, a espécie microbiana utilizada é diferente da dos trabalhos encontrados.

Em termos de formação de etanol, ao contrário do que se observa para a produção de 2,3-butanodiol/acetoína, não houve aumento na concentração do produto com o incremento de S_0 . Ressalte-se, ainda, que nos Ensaios 6 e 7, não foi detectada a produção de etanol. Estes resultados mostram que, nas condições testadas, 2,3-butanodiol/acetoína é o produto preferencial. Isto está de acordo com o que é proposto por Sablayrolles & Goma (1984), em que os autores relataram que o metabolismo celular direcionado para a formação de etanol é mais sensível à presença de elevadas concentrações de substrato do que aquele direcionado para a produção de 2,3-butanodiol/acetoína.

Com relação ao fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), a redução nos valores é observada com o incremento de S_0 até $S_0 = 140$ g/L (Ensaio 6). No entanto, tendência oposta é observada em relação ao fator de conversão de substrato em 2,3-butanodiol/acetoína ($Y_{P/Sbutanodiol}$) (Tabela 3). Apesar de decréscimo de $Y_{X/S}$ com maiores S_0 , a formação de produto é favorecida nestes casos devido à limitação de oxigênio, condição que predomina em cultivos com maior duração, ou seja, naqueles com S_0 superiores. Os resultados de $Y_{P/Sbutanodiol}$ são superiores aos obtidos por Romio *et al.* (2014) em ensaios conduzidos com *K. oxytoca* ATCC 8724, em que os autores descreveram resultados de 0,210, 0,250 e 0,300 g/g, respectivamente para $S_0 = 18,5, 37,0$ e $57,9$ g/L. No trabalho atual, foram alcançados valores de 0,234, 0,295 e 0,326 g/g, respectivamente para $S_0 = 18,9, 35,6$ e $56,2$ g/L (Tabela 3). No Ensaio 7, a redução nos valores de $Y_{P/Sbutanodiol}$ foi, provavelmente, influenciada pela alta concentração inicial de glicerol.

Na Figura 22 são mostrados os perfis cinéticos de variação dos valores de $Y_{X/S}$ ao longo do tempo nos diferentes ensaios. Pode ser observado que, inicialmente, houve aumento nos valores devido à conversão preferencial de glicerol em células. Após esta fase, foi observada queda na conversão em biomassa celular, provavelmente, em função da conversão prioritária de glicerol em produtos. Em cada ensaio, isto ocorreu em períodos diferentes, em razão do S_0 e também da concentração de oxigênio em solução. Entretanto no Ensaio 7 ($S_0 = 180$ g/L), este decréscimo não ficou tão evidente, percebendo-se um longo período de estagnação, em virtude, provavelmente, da forte inibição causada pela alta concentração inicial de glicerol empregada neste ensaio. Nestes ensaios foi quantificada a formação de produtos apenas nas amostras iniciais e finais, devido a isso não foi possível construir um perfil cinético de $Y_{P/S}$. No entanto, partindo de uma busca na literatura e comparando com os dados de $Y_{X/S}$ obtidos no presente estudo, os resultados indicam, de acordo com teoria proposta por Gaden (1955), que a produção de 2,3-butanodiol/acetoína pode ser classificada como semi-associada ao crescimento celular. Esta característica foi relatada com o uso de

sacarose (Silveira, 1991), caldo de cana-de-açúcar (Berbert-Molina, 1995) e glicose (Sablayrolles & Goma, 1984).

O aumento inicial nos valores de $Y_{X/S}$ estão associados a presença de oxigênio no meio de cultivo. Durante essa fase do processo com oxigênio não limitado em solução, o consumo de glicerol resulta na formação preferencial de biomassa microbiana. No caso, o substrato é direcionado para o ciclo do ácido cítrico e para cadeia transportadora de elétrons, sendo os principais produtos resultantes dióxido de carbono e água, favorecendo a geração de energia (na forma de ATP). No entanto, em condições de limitação de oxigênio, quando os níveis de oxigênio dissolvido estão abaixo da concentração crítica, o oxigênio se torna escasso no final da cadeia transportadora de elétrons. Essa insuficiência de oxigênio significa que a quantidade de NADH que poderia ser oxidado pela cadeia transportadora de elétrons é limitada. Sendo assim, há menor obtenção de energia na forma de ATP, com menor crescimento, levando então ao aumento do fluxo de carbono na direção da produção de 2,3-butanodiol. A produção de 2,3-butanodiol ocorre com objetivo de reoxidar o NADH produzido na conversão de glicerol em piruvato e prover o microrganismo com energia para a atividade celular (Amaral *et al.*, 2009).

As condições do Ensaio 7, com $S_0 = 180$ g/L e OTR de 9,7 mmol/L/h, se mostraram inapropriadas para o cultivo de *E. aerogenes* ATCC 13048, uma vez que esta concentração inicial de glicerol prejudicou a formação de produtos. No Ensaio 6, por sua vez, com o emprego de $S_0 = 140$ g/L, foi possível a obtenção de resultados superiores em termos de concentração final de 2,3-butanodiol/acetoina; no entanto, houve prejuízo para os valores de rendimento e de produtividade, em função da necessidade de maior tempo de cultivo. Em virtude disso, foram realizados novos ensaios em regime descontínuo com mais alta OTR, com o objetivo de buscar favorecer o crescimento celular e, com isto, diminuir o tempo de processo e aumentar a produtividade.

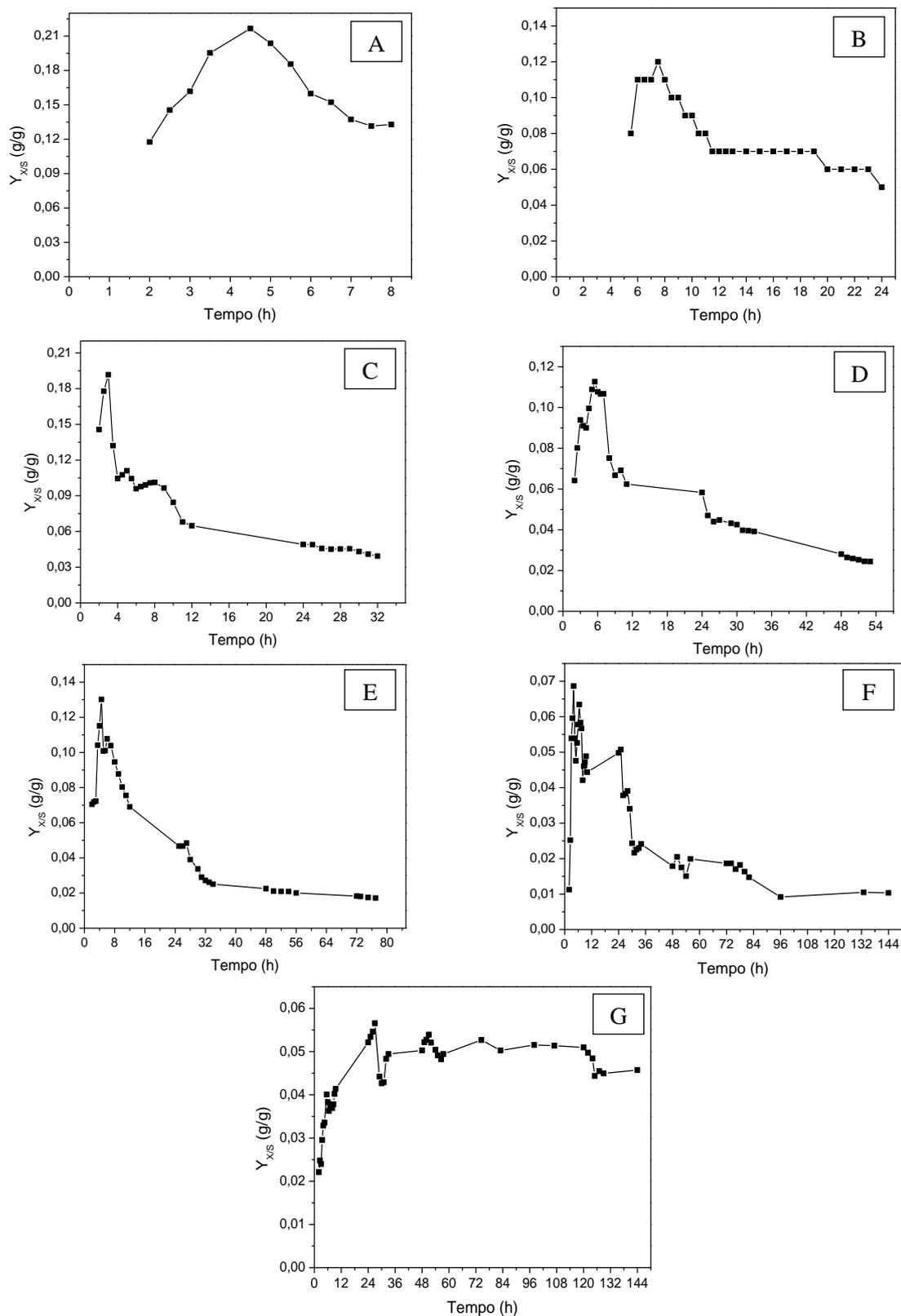


Figura 22 - Variação nos valores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) com o tempo em cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (12,9 a 9,7 mmol/L/h), 500 rpm, 0,50 vvm, a 37°C, pH 5,5. A ($S_0 = 20$ g/L; Ensaio 1); B ($S_0 = 40$ g/L; Ensaio 2); C ($S_0 = 60$ g/L; Ensaio 3); D ($S_0 = 80$ g/L; Ensaio 4); E ($S_0 = 100$ g/L; Ensaio 5); F ($S_0 = 140$ g/L; Ensaio 6); G ($S_0 = 180$ g/L; Ensaio 7).

4.2 Efeito da concentração de glicerol em cultivos em regime descontínuo com alta velocidade de transferência de oxigênio

Neste item, são discutidos os resultados obtidos em ensaios realizados com concentrações iniciais de glicerol (S_0) de 40, 60, 100, 140 e 180 g/L (ensaios 8, 9, 10, 11 e 12, respectivamente). Em todos os experimentos, a condição inicial de frequência dos agitadores e fluxo específico de ar foram de 650 rpm e 0,50 vvm, respectivamente. No decorrer dos cultivos, quando a concentração de oxigênio dissolvido decrescia para cerca de 30% da saturação, procurava-se manter este nível, pelo maior período possível, primeiramente pelo aumento da frequência dos agitadores até o máximo de 750 rpm, e, posteriormente, pelo incremento da aeração até o limite de 0,87 vvm.

Nas Figuras de 23 a 27 são mostrados os perfis cinéticos dos Ensaios 8 a 11 em relação à variação com o tempo das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido (C) e da demanda de oxigênio no cultivo (OUR). Pode ser observado que a fase exponencial de crescimento durou menos de 3 h nos Ensaios 8 e 9, enquanto, nos demais ensaios, este período foi de aproximadamente 6 h. Na sequência, os perfis de crescimento assumiram um comportamento linear, com esta fase perdurando por 4; 4,5; 4,0 e 15 h para os Ensaios 8, 9, 10 e 11, respectivamente. O período de fase linear ocorreu quando os valores de C eram nulos. No entanto, no Ensaio 10, não ocorreu queda nos valores de C para valores nulos; os valores decaíram para 40 mmol/L, em aproximadamente 5 horas de ensaio, e permaneceram neste patamar até o final do ensaio (Figura 25). Nos Ensaios 8 e 9, concentração de oxigênio nula foi observada após 3 horas de cultivo, permanecendo assim até o final dos ensaios. Já no Ensaio 11, $C = 0$ mmol/L foi observada 5 horas após a inoculação. Cabe ressaltar que os valores nulos de C foram observados mesmo quando foram utilizadas frequência dos agitadores e fluxo específico máximo de ar de 750 rpm e 0,87 vvm, respectivamente, indicando intensa atividade metabólica.

Em termos de OUR, no geral, foi observado aumento nos valores nas horas iniciais, seguido de pequena redução e, em seguida, mantendo-se com valores constantes no decorrer dos ensaios. No Ensaio 8, o aumento ocorreu até o final do ensaio, diferente dos valores dos Ensaios 9 e 10, em que foram observados valores constantes até próximo ao final dos cultivos. No Ensaio 9, a queda acentuada no final do processo ocorreu, possivelmente, devido ao término da atividade respiratória microbiana, sendo que comportamento semelhante ocorreu no Ensaio 11.

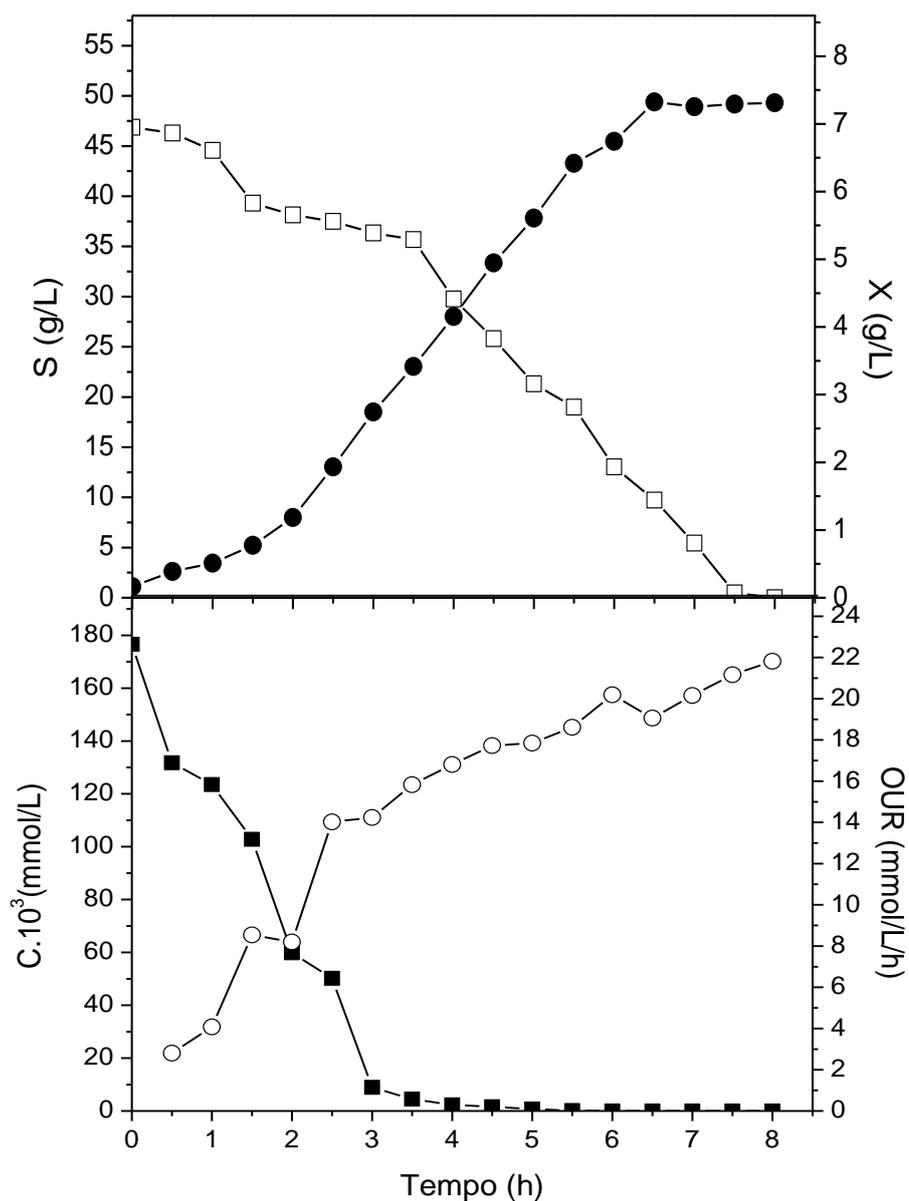


Figura 23 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (22,8 - 34,4 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 8 ($S_0 = 40$ g/L). (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

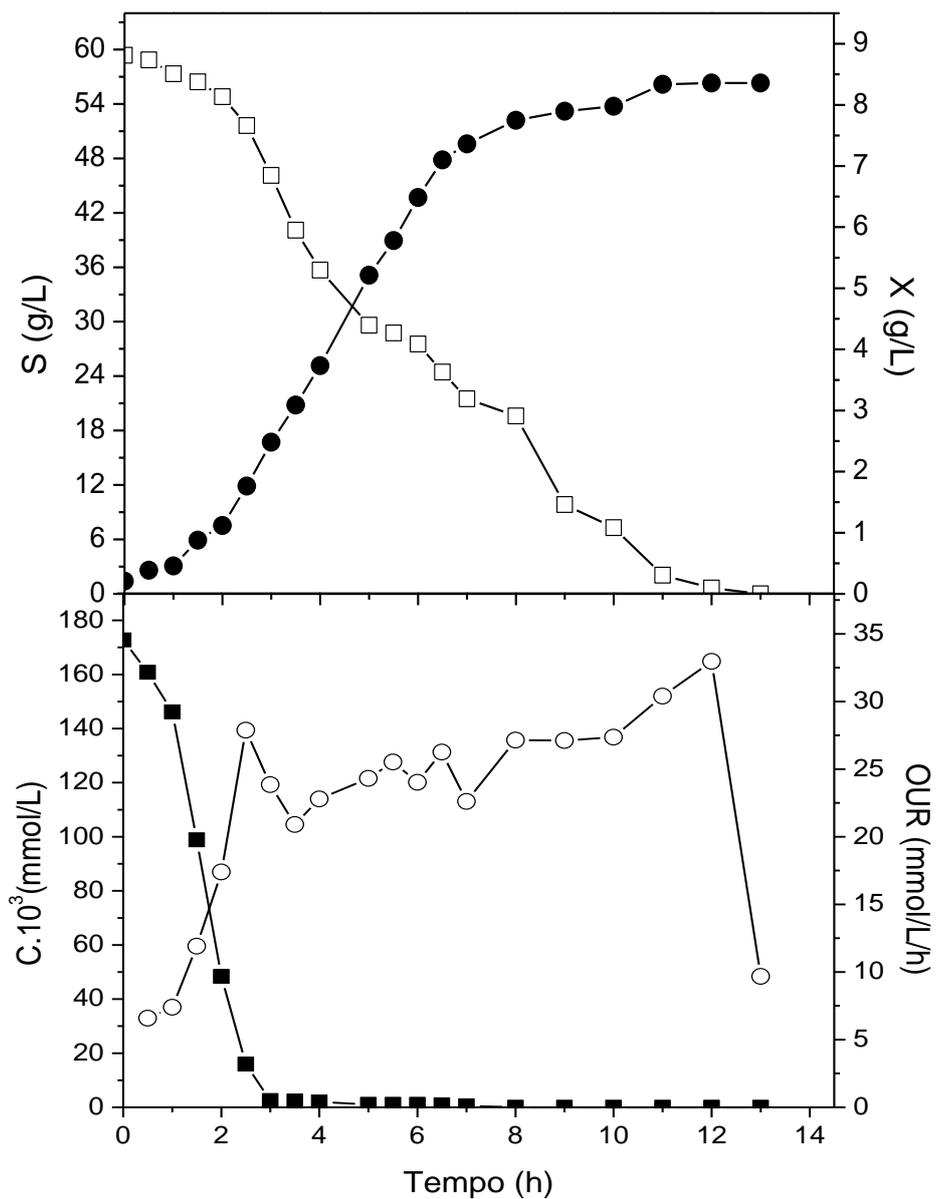


Figura 24 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (22,5 - 32,0 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 9 ($S_0 = 60$ g/L). (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

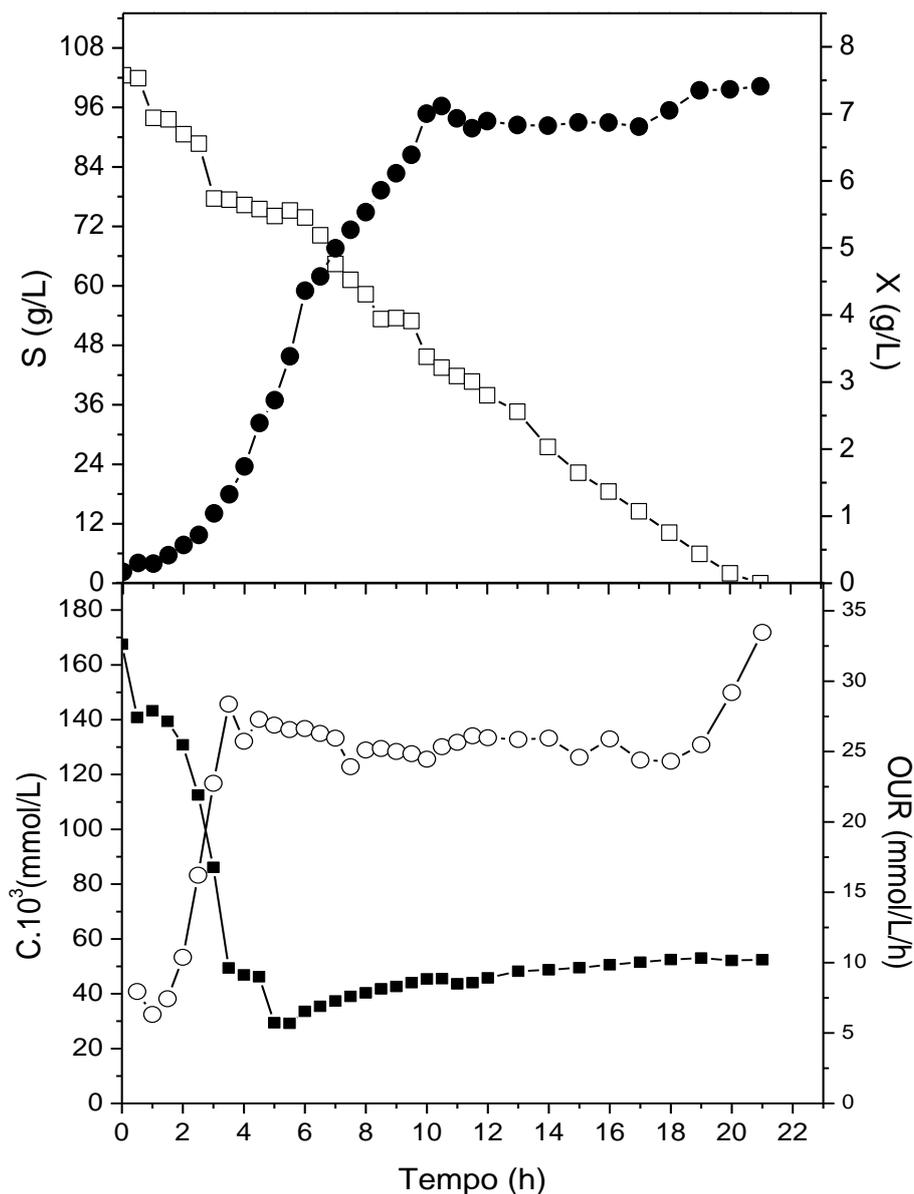


Figura 25 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (20,8 - 30,4 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 10 ($S_0 = 100$ g/L). (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

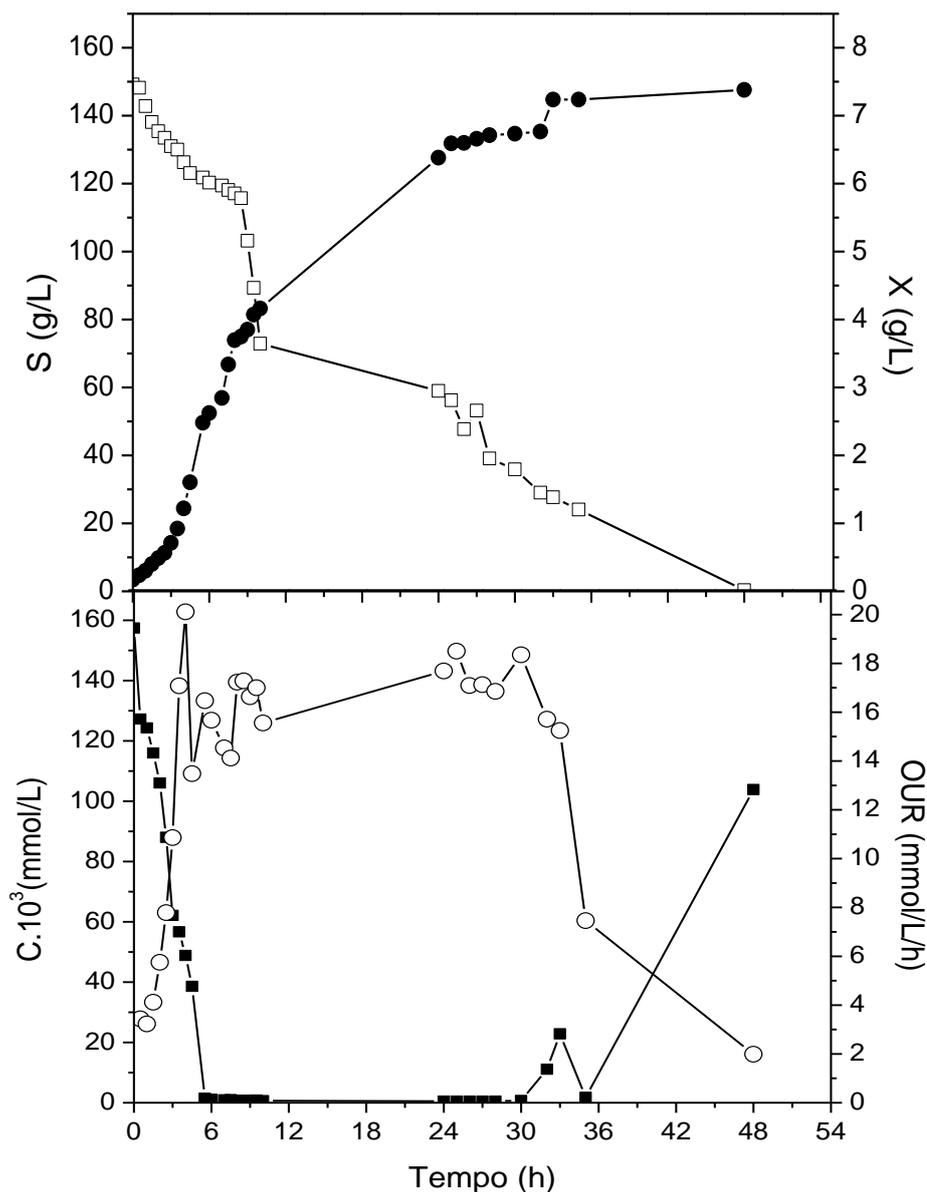


Figura 26 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (19,4 - 28,5 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 11 ($S_0 = 140$ g/L). Adição ao meio de cultivo dos sais nutrientes fosfato e sulfato de amônio (8 e 6 g, respectivamente, dissolvidos em 10 mL de água destilada) em 30 h de ensaio. (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

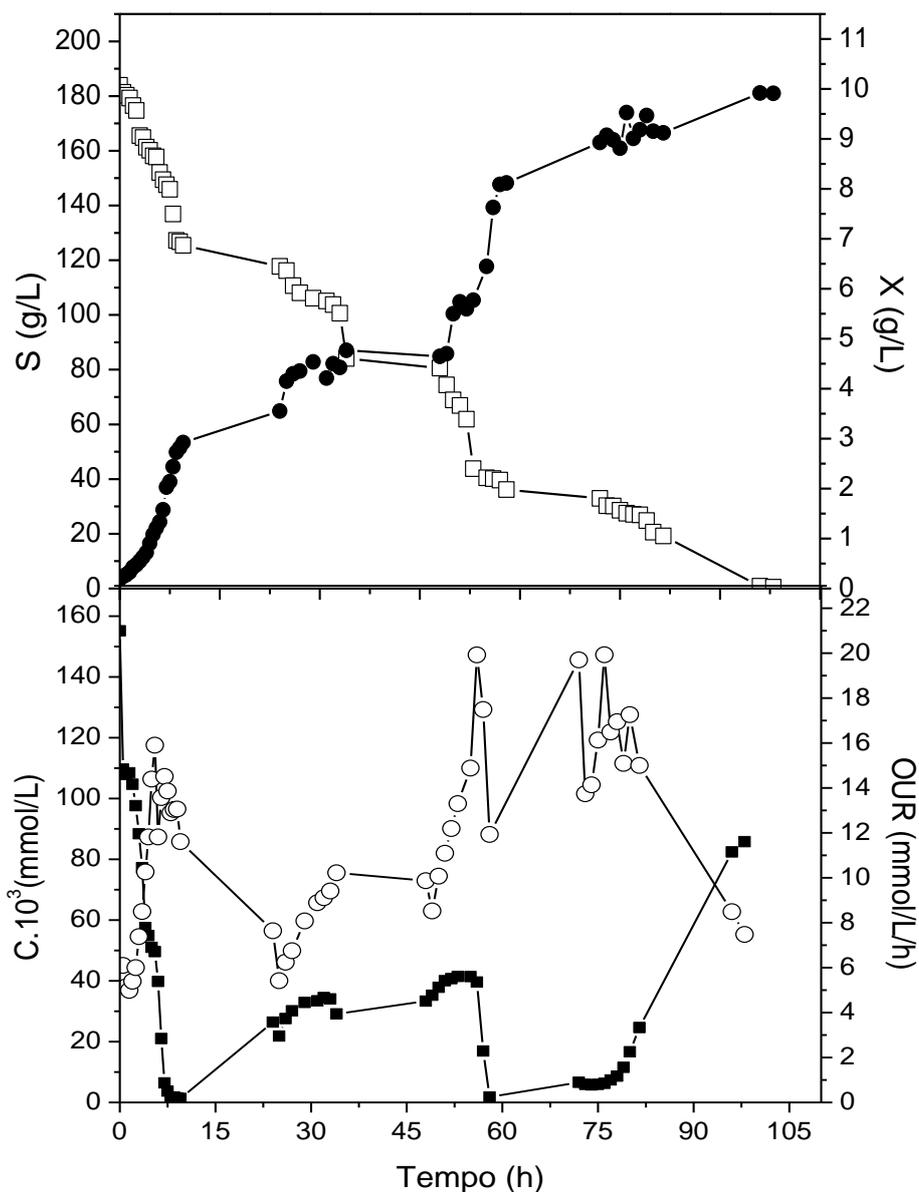


Figura 27 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com alta velocidade de transferência de oxigênio (15,8 - 24,0 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. Ensaio 12 ($S_0 = 180$ g/L). Adição ao meio de cultivo dos sais nutrientes fosfato e sulfato de amônio (8 e 6 g, respectivamente, dissolvidos em 10 mL de água destilada) em 55 h de ensaio. (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

Para a linhagem *K. oxytoca* ATTC 8724 – que, como já comentado, também é referida como *K. pneumoniae* ou *A. aerogenes* NRRL B199 –, comportamento semelhante com relação às fases exponencial e linear de crescimento é relatado na literatura em estudos com fontes açucaradas, como glicose (Sablayrolles & Goma, 1984), xilose (Jansen *et al.*, 1984) e sacarose (Silveira *et al.*, 1993). Assim como descrito anteriormente nos ensaios com baixa OTR, a formação de 2,3-butanodiol/acetoína somente ocorre na ausência de oxigênio dissolvido no meio ou, no máximo, na presença de baixas concentrações deste gás. Com oxigênio presente no meio, há ausência ou pequena produção de 2,3-butanodiol/acetoína e crescimento microbiano exponencial; com oxigênio dissolvido igual ou muito próximo a zero, há formação de 2,3-butanodiol e o desenvolvimento microbiano torna-se linear.

No Ensaio 11, com S_0 de 140 g/L, os valores de C foram nulos até cerca de 30 horas de cultivo (Figura 27). Após este período foi observado aumento de C, devido, provavelmente, à escassez de algum nutriente no meio de cultivo. Esse comportamento também foi observado no Ensaio 7 ($S_0 = 180$ g/L), com baixa OTR (9,7 mmol/L/h). Essa hipótese foi confirmada ao acrescentar-se ao meio um volume de solução concentrada de sulfato e fosfato de amônio (8 e 6 g, respectivamente, dissolvidos em 10 mL de água destilada), após o que constatou-se pequeno aumento na concentração celular e queda nos valores de C. No final do ensaio, com 48 horas de processo, novamente houve aumento nos valores de C, em decorrência do término do substrato. No Ensaio 12, com $S_0 = 180$ g/L, comportamento semelhante foi observado (Figura 27). Por volta de 24 horas, houve aumento nos valores de C, até cerca de 26 mmol/L, permanecendo nesta faixa até aproximadamente 55 horas, período em que foram adicionadas ao cultivo as fontes nitrogenadas, nas mesmas condições aplicadas no Ensaio 11. Em seguida à adição dos nutrientes, acentuado incremento na concentração celular foi observado, resultando em um maior consumo de oxigênio, perfis que podem ser visualizados na Figura 26. A partir de 72 horas, foi observado novamente aumento nos valores de C e, devido a isto, houve redução nos valores de OUR, mantendo-se até o final do ensaio. No entanto, neste período, não foi adicionada ao cultivo fonte de nutrientes, devido a possíveis efeitos negativos que altas concentrações de nutrientes podem causar na atividade de água, como descrito anteriormente. Comparando-se o Ensaio 12 com o Ensaio 7, há comportamento semelhante em termos de concentração de oxigênio dissolvido, mesmo com mudança nas condições de frequência dos agitadores e fluxo específico de ar. Estes resultados indicam que, provavelmente, cultivos de *E. aerogenes* em regime descontínuo com altas concentrações iniciais de glicerol exigem maior concentração de nutrientes, em função de maior tempo de processo.

Concentração celular superior de 9,91 g/L foi alcançada no Ensaio 12, devido, possivelmente, à adição de nutrientes no cultivo. No Ensaio 9, concentração de biomassa de 8,35 g/L foi atingida, enquanto que, nos demais cultivos, os valores obtidos foram em torno de 7 g/L. Com todas as concentrações de glicerol utilizadas neste grupo de ensaios, o aumento nos valores de velocidade de transferência de oxigênio (OTR) resultou em maior concentração celular em comparação às alcançadas no grupo de ensaios sob mais baixa OTR. As condições de alta OTR implicaram em um maior tempo de oxigênio em solução, beneficiando, assim o aumento na formação de biomassa. Isto está de acordo com o que é relatado por Sablayrolles & Goma (1984), em que a obtenção da máxima concentração celular é dependente do período em que o oxigênio permanece em solução. Em todos os ensaios, ao final do cultivo, foi observado consumo total de glicerol.

Foram feitas medidas de K_{La} em meio isento de células nas condições combinadas de agitação e aeração aplicadas aos diferentes cultivos (650, 700 e 750 rpm com aeração de 0,50 e 0,87 vvm). Adicionalmente, foram calculados os valores de concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio (C^*), levando-se em conta a concentração de glicerol no momento em que foram alterados os parâmetros frequência dos agitadores e fluxo específico de ar. A partir destes dados, foram estimados os valores da velocidade de transferência de oxigênio característica (OTR) (Tabela 4). Esta forma de cálculo não reflete exatamente o que ocorre durante o processo – visto que tanto K_{La} quanto C^* sofrem variações ao longo de um cultivo, como mostrado por Silveira *et al.* (1993) em estudos da produção de 2,3-butanodiol por *K. pneumoniae* –, mas serve como referência para a avaliação dos efeitos provocados pelo suprimento de oxigênio sobre os resultados do processo.

Tabela 4 - Resultados gerais dos cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em termos de transferência de oxigênio, a 37°C, pH 5,5, com concentrações crescentes de glicerol.

t (h)	S (g/L)	C* (mmol/L)	Frequência de agitadores - fluxo específico de ar	K _L a (h ⁻¹)	OTR característica (mmol/L/h)
S₀ = 40 g/L					
0	46,8	0,177	650 rpm-0,50 vvm	129	22,8
1	44,6	0,177	700 rpm-0,50 vvm	149	26,4
1,5	39,3	0,178	750 rpm-0,50 vvm	164	29,2
2	38,1	0,178	750 rpm-0,87 vvm	193	34,4
S₀ = 60 g/L					
0	58,5	0,175	650 rpm-0,50 vvm	129	22,5
2,5	51,6	0,176	700 rpm-0,50 vvm	136	23,9
3	46,1	0,177	750 rpm-0,50 vvm	143	25,3
3,5	40,0	0,178	750 rpm-0,87 vvm	180	32,0
S₀ = 100 g/L					
0	102,5	0,168	650 rpm-0,50 vvm	124	20,8
3	77,6	0,172	700 rpm-0,50 vvm	144	24,7
3,5	77,4	0,172	750 rpm-0,50 vvm	165	28,3
4,5	75,5	0,172	750 rpm-0,87 vvm	177	30,4
S₀ = 140 g/L					
0	149,2	0,160	650 rpm-0,50 vvm	121	19,4
3	131,0	0,163	700 rpm-0,50 vvm	133	21,7
3,5	130,0	0,163	750 rpm-0,50 vvm	151	24,7
4,5	121,8	0,165	750 rpm-0,87 vvm	173	28,5
S₀ = 180 g/L					
0	183,9	0,155	650 rpm-0,50 vvm	102	15,8
4,5	160,2	0,159	700 rpm-0,50 vvm	116	18,4
5	158,1	0,159	750 rpm-0,50 vvm	128	20,3
5,5	152,0	0,160	750 rpm-0,87 vvm	150	24,0

K_La - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio; C* - concentração de oxigênio na saturação do meio; S₀ – concentração inicial de glicerol; S – concentração de glicerol no momento em que foram realizadas as alterações; t – tempo de ensaio.

Na Tabela 5 são resumidos os resultados gerais obtidos nos ensaios realizados. Em termos da máxima velocidade específica de crescimento (μ_{xm}), resultado superior (0,79 h⁻¹) foi obtido no Ensaio 8 (S₀ = 40 g/L). Acima deste valor observou-se diminuição gradativa nos valores de μ_{xm} de acordo com o aumento de S₀, com resultados semelhantes aos obtidos nos ensaios com baixa OTR, indicando que a inibição do crescimento de *E. aerogenes* pelo glicerol independe das condições de transferência de oxigênio.

Tabela 5 - Resultados gerais dos cultivos de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, a 37°C, pH 5,5, 650 – 750 rpm, 0,50 – 0,87 vvm, com concentrações crescentes de glicerol e alta velocidade de transferência de oxigênio (22,8 a 24,0 mmol/L/h).

Ensaio	8	9	10	11	12
S₀ (g/L)	46,8	59,3	102,5	149,2	183,9
X₀ (g/L)	0,16	0,20	0,17	0,17	0,18
X_f (g/L)	7,31	8,35	7,41	7,38	9,91
S_F (g/L)	0	0	0	0,3	0,5
t_f (h)	8	13	21	48	98
Y_{X/S} (g/g)	0,152	0,137	0,070	0,048	0,099
μ_{xm} (h⁻¹)	0,79	0,73	0,54	0,47	0,32
2,3-Butanodiol/acetoína (t₀) (g/L)	0,53	0,66	0,60	0,75	0,65
2,3-Butanodiol/acetoína (t_f) (g/L)	8,5	20,5	36,0	40,5	46,8
Y_{P/Sbutanodiol} (g/g)	0,170	0,334	0,345	0,266	0,251
ρ_{butanodiol} (%)	34,7	68,3	70,5	54,4	51,3
p_{butanodiol} (g/L/h)	0,99	1,57	1,68	0,83	0,47
Etanol (t₀) (g/L)	0,32	0,27	0,33	0,23	0,32
Etanol (t_f) (g/L)	2,3	4,0	3,0	ND	ND
Y_{P/Setanol} (g/g)	0,042	0,063	0,026	ND	ND
ρ_{etanol} (%)	8,4	12,6	5,2	ND	ND
p_{etanol} (g/L/h)	0,24	0,28	0,12	ND	ND

X₀ e X_f - concentração celular inicial e final em cultivos; S₀ e S_f - concentrações inicial e final de glicerol em cultivos; t₀ e t_f - tempo inicial e final dos ensaios; Y_{X/S} - fator de conversão de substrato em células; μ_{xm} - máxima velocidade específica de crescimento celular; Y_{P/S} - fator de conversão de substrato em produtos; ρ - rendimento em 2,3-butanodiol/acetoína em relação ao máximo teórico (0,489g/g glicerol) e rendimento em etanol em relação ao máximo teórico (0,500g/g glicerol); p - produtividade volumétrica. ND - não detectado, ou apenas traços. 8-40 g/L; 9-60 g/L; 10-100 g/L; 11-140 g/L; 12-180 g/L

Aumento na concentração final de 2,3-butanodiol/acetoína foi observado com o incremento de S₀, sendo a maior concentração obtida no Ensaio 12 (S₀ = 180 g/L), em torno de 47 g/L, 51% maior que a obtida com baixa OTR com o mesmo S₀. No entanto, nos ensaios com baixa OTR, os valores obtidos foram superiores, sendo que, entre todos os ensaios em regime descontínuo deste trabalho, a maior concentração final de produto foi de 64 g/L no Ensaio 6 (S₀ = 140 g/L).

Em termos de fator de conversão de substrato em 2,3-butanodiol/acetoína (Y_{P/Sbutanodiol}), observou-se aumento nos valores com S₀ até 100 g/L, com redução de Y_{P/Sbutanodiol} nos Ensaios 11 (S₀ = 140 g/L) e 12 (S₀ = 180 g/L), possivelmente em

consequência do incremento do suprimento de oxigênio e da adição das fontes nitrogenadas, favorecendo, assim, a conversão de glicerol em células. Já em relação ao fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), comportamento oposto foi observado; ou seja, no geral, ocorreu diminuição nos valores com o aumento de S_0 . A comparação entre os resultados dos ensaios de baixa OTR com os obtidos com alta OTR, considerando os respectivos S_0 , mostra menores $Y_{P/Sbutanodiol}$ no segundo caso, o que se deveu, evidentemente, às condições de transferência de oxigênio, que favoreceram a respiração microbiana, gerando maiores valores de $Y_{X/S}$.

Valor superior de rendimento foi obtido no Ensaio 10 ($S_0 = 100$ g/L), em torno de 70%. Nos ensaios com baixa OTR, rendimento superior (92%) foi obtido com o S_0 similar (92,7 g/L).

Por outro lado, analisando-se os resultados obtidos em termos de produtividade, constatou-se que o aumento de OTR proporcionou melhores condições para obtenção de resultados superiores para todas as S_0 testadas. No caso, as concentrações celulares mais altas, atingidas nas horas iniciais dos cultivos, implicaram em um menor tempo de processo, favorecendo, assim, a produtividade, apesar das mais baixas concentrações finais de produtos. No entanto, cabe ressaltar que, tanto nos ensaios com alta OTR quanto nos com baixa OTR, valores de S_0 em torno de 140 e 180 g/L afetaram de forma negativa a obtenção de valores superiores de fator de conversão de substrato em produto, rendimentos e produtividades. Comparando-se os resultados de concentração final de 2,3-butanodiol/acetoina, $Y_{P/Sbutanodiol}$ e rendimento, sob alto e baixo valores de OTR, observa-se que as condições de aumento no suprimento de oxigênio prejudicaram a obtenção de melhores resultados, indicando que, para a formação de produtos de forma eficiente, é necessária uma etapa sob limitação de oxigênio, em que o microrganismo disponha de uma maior massa de substrato. Em condições de oxigênio disponível no meio, a enzima α -acetolactatosintase é inativada e, assim, a formação de 2,3-butanodiol é interrompida. Por outro lado, neste caso, o piruvato é convertido em acetil-CoA, que é então direcionado, principalmente, para o ciclo do ácido cítrico, sendo os principais produtos resultantes dióxido de carbono e água, favorecendo a geração de energia e, conseqüentemente, de células (Gottshalk, 1986).

Em relação à produção de etanol, observa-se que, nos Ensaios 11 e 12, não houve a formação deste produto, enquanto que, nas demais condições, a produção se deu em níveis baixos (Tabela 5). Cabe lembrar que a produção de etanol também não ocorreu nos ensaios com baixa OTR com S_0 de 140 e 180 g/L. Sendo o etanol um produto secundário do processo fermentativo, estes resultados sugerem que a sua via metabólica de produção é mais sensível a

altas concentrações iniciais de glicerol do que a do 2,3-butanodiol/acetoína, independentemente da OTR empregada. Estes resultados corroboram os relatados por Sablayrolles & Goma (1984), que descreveram que a formação de etanol é afetada com o incremento na transferência de oxigênio, ou seja, a produção ocorre quando não há mais oxigênio dissolvido no meio.

Na Figura 28 são mostrados os perfis cinéticos em termos da variação parcial de $Y_{X/S}$ com o tempo de cultivo. No geral, é observado aumento nos valores seguido de queda, em virtude do período de limitação de oxigênio, que foi diferente em função do S_0 da cada ensaio. Nos Ensaio 9 (Figura 28B) e 12 (Figura 28E), no entanto, constataram-se comportamentos fora deste padrão. No caso do Ensaio 9, a diferença observada se deveu às alterações na frequência dos agitadores e no fluxo de ar, que beneficiaram a formação de células. Já no Ensaio 12, a adição de sais nutrientes favoreceu a conversão de substrato em células, lembrando que, neste ensaio, foi obtida maior concentração celular. Por outro lado, devido ao efeito de inibição sobre o crescimento celular, neste último ensaio e no Ensaio 11, foram obtidos os menores valores de $Y_{X/S}$ no cultivo como um todo. Comparando o Ensaio 7 e 12, caracterizados por baixa e alta OTR característica, respectivamente, percebe-se que os valores de $Y_{X/S}$ no tempo final foram semelhantes (0,047 e 0,053 g/g, respectivamente). Estes resultados confirmam a discussão anterior do presente trabalho, em que se observou que o aumento da transferência de oxigênio não suprime o efeito inibidor causado pela concentração de glicerol sobre o desenvolvimento celular. Nos demais ensaios realizados sob alta OTR, todos os valores de $Y_{X/S}$ foram maiores do que no grupo de experimentos com baixa OTR, devido ao maior fluxo de carbono para a via respiratória.

Os resultados obtidos até este ponto do trabalho demonstraram que a concentração de substrato e o suprimento de oxigênio ao cultivo são variáveis fundamentais para a produção fermentativa de 2,3-butanodiol/acetoína por *E. aerogenes* ATCC 13048 a partir de glicerol. Assim como para outros substratos e outras espécies bacterianas (Jansen *et al.*, 1984; Sablayrolles & Goma, 1984; Silveira *et al.*, 1993; Ji *et al.*, 2009), *E. aerogenes* sofre inibição por concentrações elevadas de substrato, observando-se, ainda, que condições de limitação de oxigênio são necessárias para que ocorram maiores conversões em produtos. Por outro lado, o incremento no suprimento de oxigênio favorece o aumento da produtividade, devido ao mais intenso crescimento celular, que resulta em menor tempo de processo. Desta forma, para que sejam alcançados resultados expressivos neste processo – especialmente em termos de concentração final de produto, conversão e produtividade –, é necessário que o cultivo seja conduzido sob forte oxigenação do meio, de forma a favorecer o crescimento celular e a

produtividade, mas com massa de substrato suficientemente alta para que se tenha concentração de produto elevada. Levando em conta este último aspecto, fica clara a pertinência do uso do regime descontínuo alimentado de fermentação, a fim de evitar a inibição pelo substrato e todos os seus já comentados efeitos negativos.

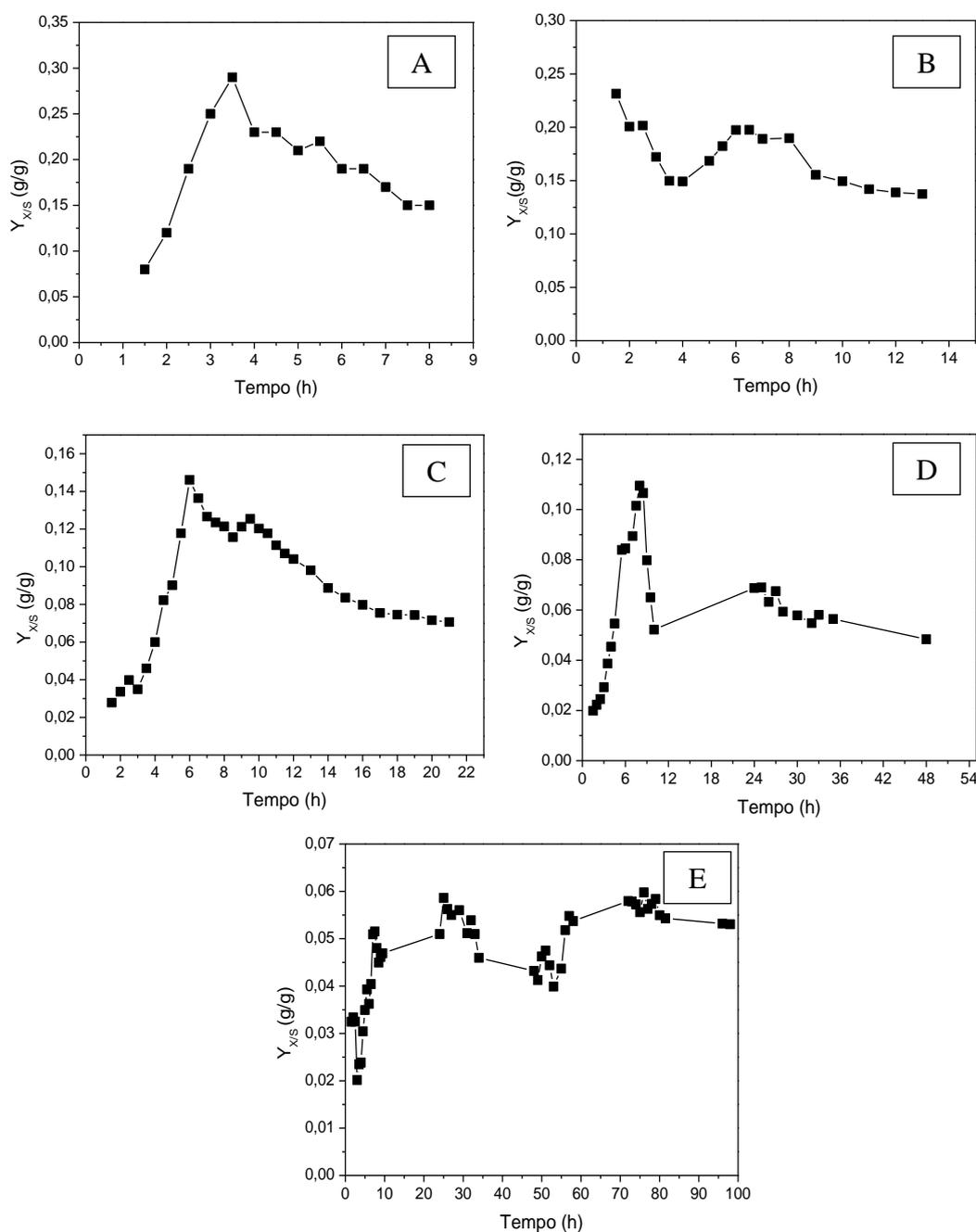


Figura 28 - Variação nos valores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 com baixa velocidade de transferência de oxigênio (22,8 a 24,0 mmol/L/h), 650-750 rpm, 0,50-0,87 vvm, a 37°C, pH 5,5. A ($S_0 = 40$ g/L; Ensaio 8); B ($S_0 = 60$ g/L; Ensaio 9); C ($S_0 = 100$ g/L; Ensaio 10); D ($S_0 = 140$ g/L; Ensaio 11); E ($S_0 = 180$ g/L; Ensaio 12).

4.3 Avaliação do processo conduzido em regime descontínuo alimentado sob condições variáveis de agitação e aeração

Com base nos resultados dos ensaios conduzidos em regime descontínuo, foi realizado um primeiro cultivo em regime descontínuo alimentado, na condição previamente descrita como de alta OTR característica (650 a 750 rpm, 0,50 a 0,87 vvm), a fim de minimizar efeitos inibitórios causados pelo substrato sobre o desenvolvimento celular. As alterações nos valores de OTR característica foram feitas de forma semelhante às dos ensaios descritos no item 4.2. Neste ensaio, iniciado com volume de 3,0 L e S_0 de 60,3 g/L, a massa total de glicerol utilizada foi de 960 g, correspondendo, portanto, à que seria empregada num cultivo descontínuo com $S_0 = 240$ g/L. A alimentação de solução de glicerol e nutrientes do meio PC foi iniciada, à vazão de 20 mL/h, após aproximadamente 5 horas de ensaio, tempo em que foi quantificada uma concentração de 34 g/L de glicerol.

Na Figura 29, são mostrados os perfis cinéticos do cultivo em termos de concentração celular, consumo de glicerol, oxigênio dissolvido (C) e demanda de oxigênio no cultivo (OUR). Observa-se intenso crescimento microbiano até o período entre 9 e 10 horas, sendo, neste período, quantificada concentração celular próxima a 10 g/L, permanecendo neste patamar até o final do ensaio. O início da fase estacionária de crescimento já nas primeiras horas de cultivo pode estar relacionado à insuficiente transferência de oxigênio para o cultivo. Esta elevada população microbiana provocou queda acentuada de C, que atingiu valores nulos em aproximadamente 4 horas de ensaio, mesmo que, neste período, já tivessem sido utilizados os níveis limite para a frequência de agitadores (750 rpm) e fluxo específico de ar (0,87 vvm). Observou-se aumento nos valores de OUR até aproximadamente 28 mmol/L/h, em 4 horas de cultivo, permanecendo neste patamar até cerca de 13 horas, período que corresponde à fase de mais intenso metabolismo bacteriano. Como esperado, a máxima velocidade de crescimento celular (μ_{x_m}), $0,72 \text{ h}^{-1}$, foi determinada na presença de níveis mensuráveis de oxigênio em solução.

Em termos de consumo de glicerol, observou-se que o acelerado desenvolvimento celular gerou um rápido consumo do substrato, que decresceu para valores próximos a 3 g/L após 25 horas de processo, acarretando em aumento nos valores de C e, conseqüentemente, diminuição de OUR (Figura 29). Neste momento, então, foi aumentada a vazão de alimentação para 60 mL/h, fazendo com que todo o restante do meio de alimentação fosse introduzido no biorreator até cerca de 33 horas de cultivo. Após a mudança no perfil de

alimentação, os valores de C permaneceram em um patamar que variou de 130 a 180 mmol/L; porém, em aproximadamente 32 horas de processo, novamente foi observado aumento nos valores de C, mesmo com concentração de glicerol no meio de cultivo próxima a 40 g/L. Este aumento prosseguiu até o encerramento do cultivo em 56 horas, sendo medido valor de 0,16 mmol/L, acompanhado de acentuada queda em OUR (Figura 29). Cabe ressaltar que, no período de 52 a 56 horas, o consumo de glicerol foi praticamente nulo, sendo quantificados, no final do ensaio, 19,5 g/L de substrato.

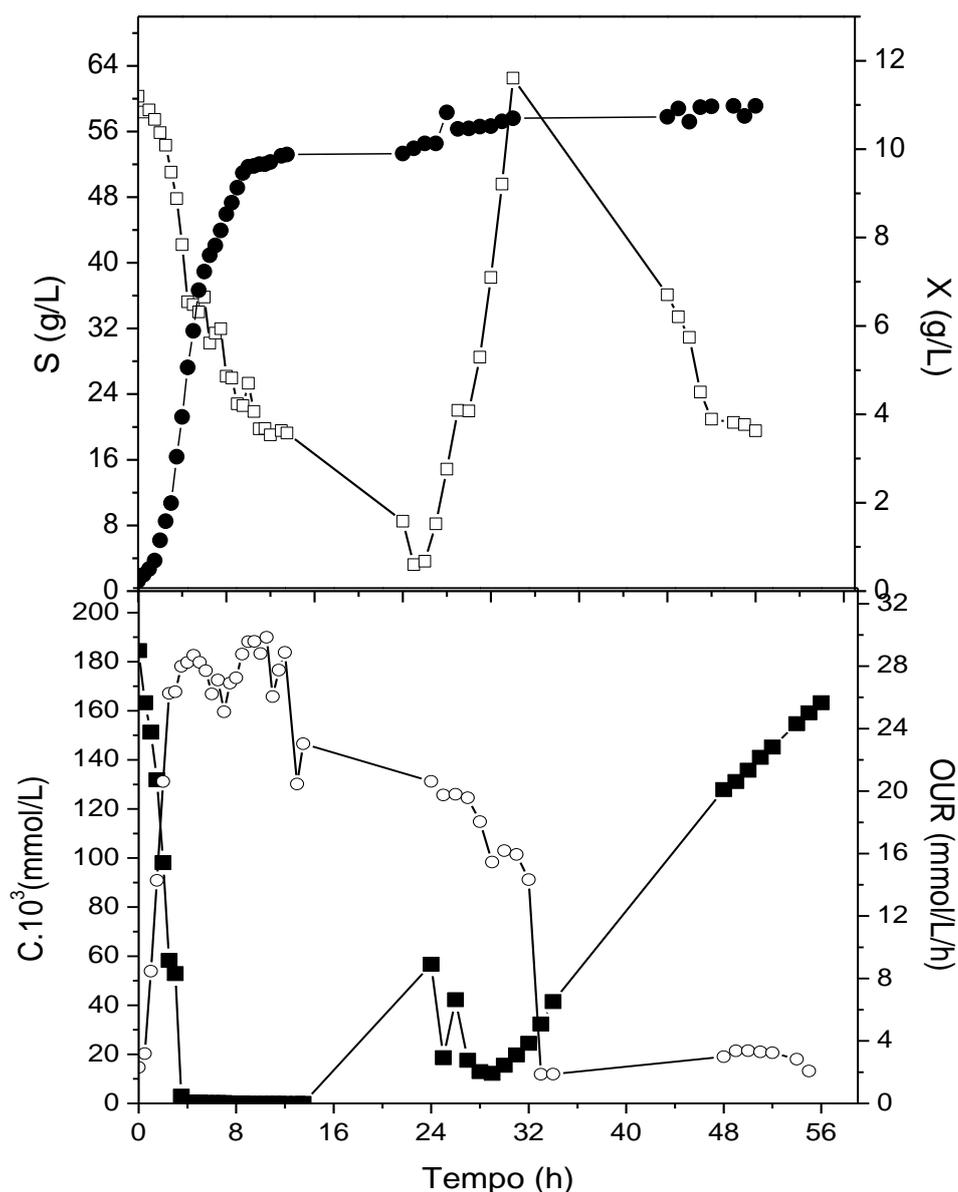


Figura 29 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e oxigênio dissolvido e da demanda de oxigênio com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 sob condições variáveis de agitação e aeração, (650-750rpm, 0,50-0,87vvm), a 37°C, pH 5,5 (Ensaio 13). (□) Glicerol (S); (●) Biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

Na Tabela 6 são mostrados os resultados gerais obtidos no período do ensaio, compreendido entre 26 e 56 horas. Determinaram-se concentrações crescentes de 2,3-butanodiol/acetoína com o passar do tempo, sendo quantificados, em 56 horas, 90,4 g/L de produto, bem como aumento em termos de conversão de substrato em produtos ($Y_{P/S\text{butanodiol}}$) e rendimentos. Por outro lado, no mesmo período, os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) decresceram. Este comportamento é facilmente explicado pelo fato de a concentração celular permanecer praticamente constante no período em discussão, com o consumo de substrato sendo dirigido prioritariamente para a formação de 2,3-butanodiol/acetoína. Com relação à produtividade volumétrica destes produtos, após o período de alimentação, foram obtidos valores de 1,61 g/L/h em 56 horas.

Tabela 6 - Resultados gerais do cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, a 37°C, pH 5,5, sob condições variáveis de agitação e aeração, 650 – 750 rpm, 0,50 – 0,87 vvm, conduzido em regime descontínuo alimentado.

Tempo (h)	26	27	30	33	34	48	56
X_f (g/L)	10,1	10,1	10,4	10,6	10,7	10,7	10,9
S_f (g/L)	3,6	8,2	21,9	49,6	62,5	36,1	19,5
Y_{X/S} (g/g)	0,065	0,063	0,059	0,058	0,059	0,051	0,048
2,3-Butanodiol/acetoína (g/L)	57,8	59,0	61,0	63,6	68,8	84,1	90,4
Y_{P/Sbutanodiol} (g/g)	0,376	0,374	0,351	0,355	0,385	0,410	0,407
ρ_{butanodiol} (%)	76,9	76,4	71,7	72,6	78,7	83,8	83,2
p_{butanodiol} (g/L/h)	2,22	2,18	2,03	1,92	2,02	1,75	1,61
Etanol (g/L)	3,1	2,9	7,0	6,9	6,5	6,6	6,5
Y_{P/Setanol} (g/g)	0,019	0,017	0,039	0,038	0,035	0,032	0,028
ρ_{etanol} (%)	3,8	3,4	8,0	7,0	7,0	6,4	6,0
p_{etanol} (g/L/h)	0,11	0,10	0,22	0,20	0,18	0,13	0,11

X_f - concentração celular; S_f- concentração final de glicerol; Y_{X/S} – fator de conversão de substrato em células; Y_{P/S} – fator de conversão de substrato em produtos; ρ- rendimento em 2,3-butanodiol/acetoína em relação ao máximo teórico (0,489g/g glicerol) e rendimento em etanol em relação ao máximo teórico (0,500g/g glicerol); p- produtividade volumétrica.

Em termos de formação de etanol (Tabela 6), concentrações próximas de 7,0 g/L foram obtidas no processo, no período final da alimentação de 33 horas; nesse mesmo período, fator de conversão de 0,038 g/g e rendimento de 7% foram alcançados.

O aumento nos valores de C, redução de OUR e consumo incompleto do glicerol observados nas horas finais do cultivo podem ser atribuídos a fatores como inibição da atividade respiratória da bactéria, causada por altas concentrações de 2,3-butanodiol/acetoina presentes no meio. A hipótese de falta de algum nutriente no meio, como ocorreu em ensaios discutidos anteriormente, em princípio, pode ser descartada, já que na solução de alimentação havia todos os componentes nutricionais do meio de Pirt & Callow.

Jansen *et al.* (1984) avaliaram o crescimento de *K. oxytoca* na presença de vários níveis de 2,3-butanodiol em cultivos conduzidos em frascos sob agitação, com 80 g/L de xilose. Os autores relataram decréscimo linear no crescimento celular com o incremento de 2,3-butanodiol, não havendo crescimento com concentração superior a 65 g/L. Além disso, nesse mesmo trabalho, foi investigada a inibição pelo produto em biorreator operado em regime descontínuo alimentado, sendo obtidos 60 g/L de 2,3-butanodiol e, nessas condições, foi observado comportamento semelhante aos verificados em ensaios em frascos.

Ao compararem-se estes resultados com aqueles obtidos em regime descontínuo com as mesmas condições operacionais (650-750 rpm, 0,50 - 0,87 vvm), constata-se que o regime descontínuo alimentado proporcionou resultados superiores em termos de concentração de produtos, rendimentos e produtividades. Comportamento semelhante foi relatado por Silveira *et al.* (1998) que, ao conduzirem ensaios em regimes descontínuo e descontínuo alimentado em fermentação de sacarose por *K. pneumoniae*, sob as mesmas condições operacionais (213 g/L de sacarose e OTR = 16 mmol/L/h), concluíram que o modo descontínuo com alimentação foi mais eficiente no processo fermentativo, sendo obtidos ao final do ensaio 80 g/L de 2,3-butanodiol/acetoina, inferior quando comparado ao do presente estudo (90 g/L). Destaca-se ainda que os resultados obtidos nesse ensaio presente estudo são maiores do que os alcançados por Petrov & Petrova (2010), em que em regime descontínuo alimentado empregando glicerol como substrato foi obtido 70 g/L de 2,3-butanodiol.

4.4 Avaliação do processo conduzido em regime descontínuo alimentado sob condições constantes de agitação e aeração

Com base nos resultados obtidos em regime descontínuo alimentado, discutidos no item anterior, foi realizado um segundo cultivo, em que se procurou reduzir o fornecimento de

oxigênio ao cultivo, de forma a aumentar a conversão de glicerol em 2,3-butanodiol/acetoína (Ensaio 14). A concentração inicial de glicerol, assim como a concentração do substrato no meio de alimentação, foram as mesmas usadas no Ensaio 13 (item 4.3). A frequência de agitadores foi fixada em 750 rpm e o fluxo específico de ar em 0,50 vvm, este último calculado em relação ao volume inicial (3,0 L), correspondendo a OTR característica de 25,3 mmol/L/h. A alimentação foi iniciada quando concentrações de glicerol inferiores a 30 g/L foram determinadas no meio. Durante o processo, 1 L de meio, com 780 g/L de glicerol, foi adicionado ao fermentador, sempre com o cuidado para que a concentração máxima de substrato ficasse em torno de 60 g/L.

Na Figura 26, são mostrados os perfis cinéticos do cultivo em termos de concentração celular, consumo de glicerol e demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR). Devido a problemas operacionais com a sonda de oxigênio, neste ensaio, não foram realizadas medidas de oxigênio em solução. No entanto, é possível observar um aumento acentuado nos valores de OUR, atingindo níveis próximos a 70 mmol/L/h em aproximadamente 6 horas de ensaio, seguido de rápido declínio e se estendendo até o final do cultivo. Quando comparado com o Ensaio 13, os valores mais elevados de OUR permaneceram por um período maior. Isso se deve, provavelmente, às condições de transferência de oxigênio, já que no Ensaio 13 a OTR característica foi de cerca de 32,0 mmol/L/h e no Ensaio 14 foi de 25,3 mmol/L/h. Por outro lado, comportamento de queda nos valores de OUR também foi observado.

Intenso metabolismo bacteriano foi visualizado até próximo de 12 horas de ensaio, sendo atingida, nesse período, concentração celular da ordem de 7 g/L, que permaneceu nesta faixa até o final do cultivo. Este dado mostra que, de fato, neste ensaio, a condição de suprimento de oxigênio foi, em média, menos efetiva que a do Ensaio 13, em que a concentração de biomassa celular superou 10 g/L.

Em termos de consumo de glicerol, em 7 horas de cultivo foi quantificada concentração de cerca de 20 g/L, sendo iniciada, então, a alimentação de meio, que foi finalizada em 48 horas. No entanto, a partir de cerca de 59 horas, consumo praticamente nulo de substrato foi observado, sendo quantificado no final do ensaio valor próximo a 27 g/L. Dessa forma, a concentração inicial de glicerol equivalente poderia ter sido entre 210 e 220 g/L, pois com essas concentrações, é possível obter cerca de 100 g/L de 2,3-butanodiol/acetoína, evitando, assim, o desperdício de substrato. Este período de interrupção do consumo de glicerol condiz com o período em que os valores de OUR foram os mínimos calculados.

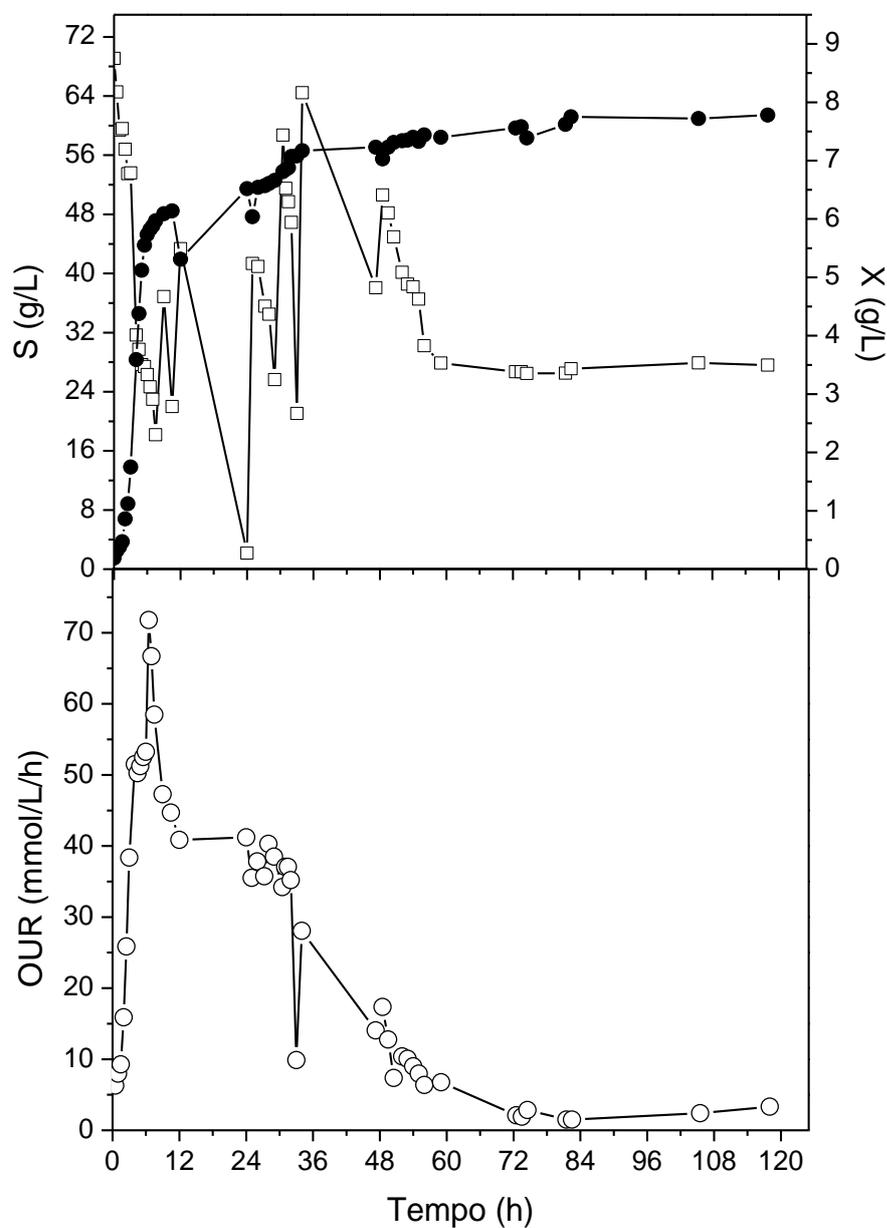


Figura 30 - Variação das concentrações de biomassa celular, glicerol e da demanda de oxigênio no cultivo com o tempo em cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 sob condições constantes de agitação e aeração (750rpm- 0,50 vvm), a 37°C, pH 5,5 (Ensaio 14). (□) Glicerol (S); (●) biomassa (X); (■) concentração de oxigênio dissolvido (C); (○) demanda de oxigênio no cultivo (OUR).

Na Tabela 7 são mostrados os resultados gerais do ensaio a partir de 7,5 horas. Observou-se incremento nos valores de concentração de 2,3-butanodiol/acetoína com o decorrer do tempo de cultivo, sendo que, em 74 horas, foi mensurada concentração de cerca de 103 g/L. Ressalta-se que altas concentrações de produtos facilitam o processo de recuperação. Em termos de $Y_{P/Sbutanodiol}$, foi obtido, neste tempo, resultado de 0,463 g/g, havendo, conseqüentemente, incremento também nos valores de rendimento, que atingiu 94%. Produtividade de 1,37 g/L/h foi obtida também em 74 horas, levemente inferior quando comparada com a do Ensaio 13, em que foi obtido em 56 horas valor de 1,61 g/L/h.

Em termos de formação de etanol, comportamento semelhante é observado nos Ensaio 13 e 14, sendo quantificada concentração de 6,4 g/L em 47 horas. No entanto, é observada queda nos valores a partir deste ponto, que pode ser atribuído a erro no método analítico.

Tabela 7 - Resultados gerais do cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, a 37°C, pH 5,5, sob condições constantes de agitação e aeração, 750 rpm - 0,50 vvm, conduzido em regime descontínuo alimentado.

Tempo (h)	7,5	10,5	33	47	59	74	82	118
X_f (g/L)	5,97	6,14	7,08	7,23	7,4	7,39	7,15	7,18
S_f (g/L)	18,2	22,0	21,0	38,0	27,9	26,5	27,1	27,6
Y_{X/S} (g/g)	0,113	0,073	0,036	0,031	0,033	0,033	0,032	0,032
2,3-Butanodiol/acetoína (g/L)	11,9	22,5	82,8	96,7	97,4	102,6	104,2	103,5
Y_{P/Sbutanodiol} (g/g)	0,343	0,269	0,429	0,423	0,442	0,463	0,471	0,470
ρ_{butanodiol} (%)	70,1	55,0	87,7	86,5	90,3	94,6	96,3	96,1
p_{butanodiol}(g/L/h)	2,32	2,07	2,48	2,04	1,64	1,37	1,26	0,85
Etanol (g/L)	3,7	4,4	5,7	6,4	4,6	3,8	ND	ND
Y_{P/Setanol} (g/g)	0,058	0,051	0,028	0,027	0,02	0,016	ND	ND
ρ_{etanol} (%)	11,6	10,2	5,6	5,4	4,0	3,2	ND	ND
p_{etanol}(g/L/h)	0,39	0,39	0,16	0,13	0,06	0,05	ND	ND

X_f - concentração celular; S_f - concentração final de glicerol; Y_{X/S} - fator de conversão de substrato em células; Y_{P/S} - fator de conversão de substrato em produtos; ρ - rendimento em 2,3-butanodiol/acetoína em relação ao máximo teórico (0,489g/g glicerol) e rendimento em etanol em relação ao máximo teórico (0,500g/g glicerol); p - produtividade volumétrica; ND - não detectado ou apenas traços.

No Ensaio 14, foi considerado tempo final de 74 horas, visto que, a partir desse período, não houve mais consumo do glicerol. No entanto, para análise comparativa dos dois ensaios conduzidos em regime descontínuo alimentado, foram considerados os tempos 56 horas (Ensaio 13) e 59 horas (Ensaio 14). Em relação à concentração de 2,3-butanodiol/acetoína, ressalta-se que valor superior foi obtido no Ensaio 14 (97,4 g/L), mesmo com concentração celular inferior, cerca de 7 g/L. Em termos de rendimento, resultado superior de 90,3% também foi obtido no Ensaio 14. Por outro lado, em termos de produtividade, os resultados foram semelhantes, 1,61 g/L/h no Ensaio 13 e 1,64 g/L/h no Ensaio 14. Sendo assim, como foi descrito nos resultados obtidos dos ensaios conduzidos em regime descontínuo, o suprimento de oxigênio é um parâmetro que exerce forte influência na obtenção de concentrações superiores dos produtos. O cultivo com menor fluxo específico de ar favoreceu a obtenção de resultados superiores de concentração de produtos e rendimentos, mas, por outro lado não beneficiou aumento nos valores de produtividade.

Analisando-se o conjunto de experimentos realizados neste trabalho, pode-se afirmar que, na conversão fermentativa de glicerol em 2,3-butanodiol/acetoína, por *E. aerogenes* ATCC 13048, o uso do regime descontínuo não é adequado para a obtenção de elevadas concentrações de produtos. Por outro lado, o regime descontínuo alimentado proporciona condições para que concentrações superiores destes produtos sejam atingidas, com níveis de produção equiparáveis aos relatados na literatura para substratos como glicose (Sablayrolles & Goma, 1984; Wong *et al.*, 2014), sacarose (Silveira *et al.*, 1998) e xilose (Jansen *et al.*, 1984) e significativamente superiores aos obtidos com o próprio glicerol como substrato (Petrov & Petrova, 2009; Petrov & Petrova, 2010). Os resultados indicam o grande potencial de aplicação do glicerol neste tipo de bioprocessos, especialmente no estado do Rio Grande do Sul, onde há crescente disponibilidade deste substrato em decorrência da ampliação da indústria do biodiesel.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, demonstrou-se que o glicerol tem grande potencial de utilização na produção fermentativa de 2,3-butanodiol/acetoína por *Enterobacter aerogenes*, com resultados comparáveis aos obtidos com outras fontes de carbono, constatando-se que a concentração de substrato e o suprimento de oxigênio são parâmetros essenciais a serem otimizados neste processo.

De forma específica, os resultados permitem concluir que:

- a condução do processo com *E. aerogenes* em meio contendo glicerol apresenta comportamento semelhante ao descrito na literatura para substratos (glicose, xilose e sacarose) e microrganismo (*Klebsiella oxytoca*) convencionais, com respeito à relação do crescimento celular e da formação de produtos com o suprimento de oxigênio;
- concentrações iniciais de glicerol (S_0) de até 60 g/L não afetam as máximas velocidades específicas de crescimento (μ_{xm}), independentemente da velocidade de transferência de oxigênio (OTR) empregada no cultivo;
- em regime descontínuo, S_0 da ordem de 180 g/L exerce forte inibição sobre o desenvolvimento celular, especialmente sob baixa OTR, uma vez que, nesta condição, houve consumo incompleto do glicerol;
- cultivos realizados com valores de OTR características de 10 a 13 mmol/L/h proporcionam a obtenção de resultados superiores em termos de concentração e rendimento em produto, mas, por outro lado, prejudicam a produtividade, em virtude do maior tempo de processo, decorrente das baixas concentrações de biomassa celular;
- o uso de OTR características de 24 a 34 mmol/L/h resulta na obtenção de resultados superiores de produtividade – em razão do menor tempo de processo, que, por sua vez, está associado à maior concentração de biomassa celular –, mas têm influência negativa sobre a concentração final de produtos e o rendimento do processo;
- em regime descontínuo alimentado, é possível evitar a inibição pela concentração de substrato e obter concentrações finais de produto superiores a 100 g/L de 2,3-butanodiol/

acetoína, com rendimento da ordem de 96%, em cerca de 70 horas, dependendo do perfil de suprimento de oxigênio empregado no processo;

- as altas concentrações de 2,3-butanodiol/acetoína atingidas em regime descontínuo alimentado indicam que *E. aerogenes* é suscetível à inibição por estes produtos e, com isso, massas de glicerol equivalentes às que seriam usadas em regime descontínuo com S_0 entre 210 e 220 g/L são ideais para o processo.

Como perspectivas para a continuidade desta pesquisa, sugerem-se:

- aprofundar os estudos cinéticos sobre o crescimento celular e a formação de produtos em cultivos de *E. aerogenes*;
- avaliar outras linhagens da mesma espécie na condução do processo fermentativo;
- aperfeiçoar as condições operacionais de cultivos conduzidos em regime descontínuo alimentado, especialmente com relação ao suprimento de oxigênio e à estratégia de alimentação, com a finalidade de reduzir o tempo de processo e, assim, melhorar a produtividade;
- conduzir ensaios fermentativos em biorreator de bancada empregando o glicerol residual proveniente da produção de biodiesel como fonte de carbono;
- otimizar a composição de sais componentes do meio de produção para o uso de glicerol;
- desenvolver metodologias de recuperação de 2,3-butanodiol/acetoína do meio fermentado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, P. F. F.; Ferreira, T. F.; Fontes, G. C.; Coelho, M. A. Z. (2009). Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**. 87: 179-186.
- Arruda, P. V.; Rodrigues, R. C. L. B.; Felipe, M. G. A. (2007). Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**. 26: 56-62.
- Barret, E. L.; Collins, E. B.; Hall, B. J.; Matoi, S. H. (1983). Production of 2,3-butylene glycol from whey by *Klebsiella pneurnoniae* and *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Dairy Science**. 66: 2507-2514.
- Bartowsky, E. J.; Henschke, P. A. (2004). The 'buttery' attribute of wine diacetyl desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**. 96(3): 235-52.
- Becker, C. M.; Barsé, B.; Harmann, C.; Carra, S.; Girardi, V.; Silveira, M. M.; Malvessi, E. (2013a). Crescimento de *Enterobacter aerogenes* em glicerol frente a diferentes temperaturas. In: XXI Encontro de Jovens Pesquisadores e III Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia. **Resumos**. Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Becker, C. M.; Barsé, B.; Girardi, V.; Malvessi, E. (2013b). Influência do volume de reação no cultivo de *Enterobacter aerogenes* em glicerol visando à produção de 2,3-butanodiol. In: 2º Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica, Instituto Federal do Rio Grande do Sul. **Anais**. Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Berbert-Molina, M. A. (1995). Avaliação de cana-de-açúcar para obtenção de 2,3-butanodiol. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- Berbert-Molina, M. A.; Sunao Satob, S.; Silveira, M. M. (2001). Ammonium phosphate as a sole nutritional supplement for the fermentative production of 2,3-butanediol from sugar cane juice. **Zeitschrift für Naturforschung**. 56: 787-791.
- Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer, W. D. (1998). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 50: 24-29.
- Blicek, J.; Affouard, F.; Bordat, P.; Lerbret, A.; Descamps, M. (2005). Molecular dynamics simulations of glycerol glass-forming liquid. **Chemical Physics**. 317: 253-257.
- Carra, S. (2012). Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Caxias do Sul.

- Celinska, E.; Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol: current state and prospects. **Biotechnology Advances**. 27: 715-725.
- Dills, S. S.; Apperson, A.; Schmidt, M. R.; Saier, M. H. Jr. (1980). Carbohydrate transport in bacteria. **Microbiological Reviews**. 44: 385-418.
- Fernández, D. E. R.; Parada, J. L.; Medeiros, A. B. P.; Carvalho, J. C.; Lacerda, L. G.; Rodríguez-León, J. A.; Soccol, C. R. (2013). Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**. 48(2): 374-379.
- Flickinger, M. C. (1980). Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come? **Biotechnology and Bioengineering**. 22: 27-48.
- Garcia, A. D. (2006). Produção fermentativa de 2,3-butanodiol a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. **Tese de Doutorado**. Biotecnologia Industrial, Faculdade de Engenharia Química de Lorena.
- Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology Advances**. 27: 153-176.
- Garg, S. K.; Jain, A. (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. **Bioresource Technology**. 51: 103-109.
- Gioso, M. A.; Benites, N. R.; Kampf, G. (2002). Análise microbiológica de ossos de cães conservados por longo período de tempo na glicerina a 98% à temperatura ambiente, objetivando a extertia óssea. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 17(4): 242-246.
- Girardi, V.; Torres, A. P. R.; Beal, L. L.; Malvessi, E.; Silveira, M. M. (2014). Estudo comparativo do uso de glicerol residual e comercial na produção de butanodiol por *Enterobacter aerogenes*. In: 22º Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais**, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.
- Gottshalk, G. (1986). **Bacterial metabolism**. Springer Science & Business Media, New York, 359p.
- Hartmann, C.; Oliboni, L.; Barsé, B.; Becker, C. M.; Romio, T.; Silveira, M. M.; Malvessi, E. (2014). Cultivo de *Klebsiella oxytoca* em glicerol para produção de 2,3-butanodiol em regimes descontínuo e descontínuo alimentado. In: XXII Encontro de Jovens Pesquisadores e IV Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia. **Resumos**. Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

- Jansen, N. B., Flickinger, M. C.; Tsao, G. T. (1984). Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnology and Bioengineering**. 26: 362-369.
- Ji, X. J.; Huang, H.; Du, J.; Zhu, J. G.; Ren, L. J.; Li, S. (2009). Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. **Bioresource Technology**. 100: 3410-3414.
- Ji, X. J.; Huang, H.; Ouyang, P. K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. **Biotechnology Advances**. 29: 351-364.
- Jiayang, Q.; Zijun, X.; Cuiqing, M.; Nengzhong, X.; Peihai, L.; Ping, X. (2006). Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. 14(1): 132-136.
- Kaur, G.; Srivastava, A. K.; Chand, S. (2012). Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. **Biochemical Engineering Journal**. 64: 106-118.
- Laube, V. M.; Groleau, D.; Martin, S. M. (1984). 2,3-butanediol production from xylose and other hemicellulosic components by *Bacillus plymyxa*. **Biotechnology Letters**. 6: 257-262.
- Li, L.; Li, K.; Wang, K.; Chen, C.; Gao, C; Ma, C.; Xu, P. (2014). Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain. **Bioresource Technology**. 170: 256-261.
- Magee, R. L.; Kosaric, N. (1987). The microbial production of 2,3-butanediol. **Advances in Applied Microbiology**. 32: 89-161.
- Moo-Young, M.; Blanch, H. W. (1989). Transport phenomena and bioreactor design. **Basic Biotechnology**. 3: 135-151.
- Olson, B. H.; Johnson, M. J. (1948). The production of 2,3-butylene-glycol by *Aerobacter aerogenes* 199. **Journal of Bacteriology**. 55: 209-222.
- Ooi, T. L.; Yong, K. C.; Hazimah, A.H.; Dzulkefly, K. (2004). Glycerol residue - A rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**. 53: 29-33.
- Papanikolaou, S.; Muniglia, L.; Chevalot, L.; Aggelis, G.; Marc, I. (2002). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**. 92: 737-744.
- Perego, P.; Converti, A.; Del Borghi, A.; Canepa, P. (2000). 2,3-butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues. **Bioprocess Engineering**. 23: 623-620.

- Perego, P.; Converti, A.; Del Borghi, M. (2003). Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresource Technology**. 89: 125-131.
- Petrov, K.; Petrova, P. (2009). High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. **Comptes Rendus de L'Académie Bulgare des Sciences**. 62: 233-242.
- Petrov, K.; Petrova, P. (2010). Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 87: 943-949.
- Pirt, S. J.; Callow, D. S. (1958). Production of 2,3-butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a single stage process. **Journal of Applied Bacteriology**. 21: 188-205.
- Pirt, S. J. (1975). **Principles of microbe and cell cultivation**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 90-93.
- Placek, V.; Vacek, K.; Kas, J.; Demnerová, K.; Zidková, J.; Sajdok, J. (2005). Application of ionising radiation for the stabilisation of *Trichoderma viride* cellulases. **Czech Journal of Food Sciences**. 23(3): 111-115.
- Quispe, C. A. G.; Coronado, C. J. R.; Carvalho Jr., J. A. (2013). Glycerol: production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 27: 475-493.
- Ramachandran, K. B.; Goma, G. (1988). 2,3-Butanediol production from glucose by *Klebsiella pneumoniae* in a cell recycle system. **Journal of Biotechnology**. 9: 39-46.
- Ramos, H. C.; Hoffmann, T.; Marino, M.; Nedjari, H.; Presecan-Siedel, E.; Dreesen, O.; Glaser, P.; Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. **Journal of Bacteriology**. 182: 3072-3080.
- Rao, B.; Zhang, L. Y.; Sun, J.; Su, G.; Wei, D.; Chu, J.; Zhu, J.; Shen, Y. (2012). Characterization and regulation of the 2,3-butanediol pathway in *Serratia marcescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 93: 2147-2159.
- Rivaldi, J. D.; Sarroub, B. F.; Fiorilo, R.; Silva, S. S. (2008). Glicerol de biodiesel. **Biociencia, Ciência & Desenvolvimento**. 37: 44-51.
- Romio, T.; Hartmann, C.; Viapiana, F.; Girardi, V.; Carra, S.; Beal, L. L.; Torres, A.P.; Sousa, M.; Malvessi, E.; Silveira, M. M. (2013). Efeito da concentração de glicerol sobre a produção de butanodiol por *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. In: 8º Congresso Internacional de Bioenergia. **Anais**. São Paulo, 2013.
- Romio, T.; Hartmann, C.; Viapiana, F.; Meneghel, L.; Carra, S.; Torres, A. P.; Sousa, M. P.; Beal, L. L.; Malvessi, E.; Silveira, M. M. (2014). Cultivo de *Klebsiella oxytoca* em glicerol

- para a produção de 2,3-butanodiol em biorreator de bancada. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais**. Florianópolis, 2014.
- Sablayrolles, J. M.; Goma, G. (1984). Butanediol production by *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: effects of initial substrate concentration and aeration agitation. **Biotechnology and Bioengineering**. 26: 148-155.
- Saha, B. C.; Bothast, R. J. (1999). Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 52: 321-326.
- Schmidell, W.; Lima, A. U.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001). Agitação e aeração em biorreatores. **Biociencia Industrial**. Vol. 2 – Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blucher Ltda. pp. 277-308.
- Schumpe, A.; Quicker, G. (1982). Gas solubilities in microbial culture media. **Advances in Biochemical Engineering**. 24: 1-38.
- Silva, G. P.; Mack, M.; Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**. 27: 30-39.
- Silveira, M. M.; Molina, M. A. B.; 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. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 41: 329-334.
- Silveira, M. M. (1991). Estudo cinético da fermentação butileno-glicólica de sacarose por *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. **Tese de Doutorado**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- 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. **Journal of Bacteriology**. 31: 93-102
- Sun, L. H.; Wang, X. D.; Dai, J. Y.; Xiu, Z. L. (2009). Microbial production of 2,3-butanediol from *Jerusalem artichoke* tubers by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 82: 847-852.
- Syu, M. J. (2001). Biological production of 2,3-butanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 55: 10-18.
- Thompson, J. C.; He, B. B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**. 22(2): 261-265.
- Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. (2012). **Microbiologia**, 10 ed. Porto Alegre: Artmed. pp. 132-134.
- Vasconcelos, Y. (2012). Resíduos bem-vindos. **Pesquisa FAPESP**. 196: 58-63.

- Wong, C. L.; Yen, H. W.; Lin, C. L. Chang, J. S. (2014). Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. **Bioresource Technology**. 152: 169-176.
- Wu, K. J.; Lin, Y. H; Lo, Y. C.; Chen, C. Y.; Chen, C. Y.; Chen, W. M.; Chang, J. S. (2011). Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 42: 20-25.
- Zeng, A. -P.; Biebl, H.; Deckwer, W. -D. (1990). Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 33: 485-489.
- Yu, E. K. C.; Saddler, J. N. (1983). Fed-batch approach to production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**. 46: 630-635.

ANEXO

Avaliação preliminar do cultivo de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 em meio contendo glicerol bruto da indústria de biodiesel

Introdução

Os resultados alcançados na presente dissertação de mestrado permitiram constatar a viabilidade do uso de glicerol como substrato para o crescimento e a produção de 2,3-butanodiol/acetoína em processo fermentativo com a bactéria anaeróbia facultativa *Enterobacter aerogenes*. No estudo realizado, utilizou-se glicerol comercial, indicando-se, portanto, a necessidade da avaliação do composto residual proveniente da produção de biodiesel neste processo.

Desta forma, o objetivo dos ensaios descritos neste anexo foi realizar uma avaliação preliminar do uso do glicerol residual como substrato no processo, de forma comparativa com a substância purificada comercial, em ensaios conduzidos em frascos sob agitação.

Material e Métodos

E. aerogenes ATCC 13048, cultura adquirida ao Centro de Culturas Tropicais André Tosello (São Paulo-SP, Brasil), foi utilizada nos experimentos.

O meio de cultivo empregado foi o descrito por Pirt e Callow (1958), suplementado com glicerol comercial (VETEC) ou bruto, este último proveniente da produção de biodiesel (Petrobrás S.A), em concentrações iniciais (S_0) de 20, 40 e 60 g/L e pH inicial de 6,5. Os meios foram autoclavados a 1 atm por 15 minutos. A inoculação foi realizada com 5 mL de suspensão celular proveniente de cultivo prévio em 20 g/L de glicerol comercial ou bruto, a 37°C, por 24 horas.

Os cultivos foram conduzidos em agitador de bancada (Certomat U, B. Braun Biotech, Sartorius), em frascos Erlenmeyer de 500 mL com gargalo alongado, cobertos por manta de gaze e algodão hidrófobo, contendo 100 mL de meio. Os cultivos foram conduzidos sob agitação recíproca de 300 rpm, a 37°C. Para manter-se o pH em faixa compatível com a atividade microbiana, foram acrescentados aos meios, antes da inoculação, 5 g/L de CaCO_3 .

As concentrações celulares foram determinadas por gravimetria e por leitura da absorbância, a 520nm, de suspensões celulares previamente tratadas com HCl 2 mol/L, a fim de remover o CaCO_3 , e sua conversão em concentração (massa seca por volume) foi realizada utilizando uma curva de calibração. A concentração de glicerol comercial foi determinada pelo método descrito por Carra (2012) para sorbitol e adaptado para glicerol.

As análises físico-químicas do glicerol residual foram realizadas nos Laboratórios de Tecnologia Ambiental (LATAM) e de Análises e Pesquisas Ambientais (LAPAM) da

Universidade de Caxias do Sul, através de metodologias estabelecidas no *Standard Methods* (2012).

As concentrações dos produtos da fermentação – 2,3-butanodiol, acetoína e etanol – e, ainda, de glicerol residual da produção de biodiesel, foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo Agilent Technology, modelo 9100, nas seguintes condições: coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, 9 μ m); fase móvel, H₂SO₄ 0,0005 mol/L; vazão da fase móvel, 0,6 mL/min; volume de injeção de amostra, 50 μ l; temperatura do forno, 60°C. Devido ao equilíbrio observado entre a formação de 2,3-butanodiol e acetoína, a análise dos resultados foi realizada em conjunto para as duas substâncias.

Resultados

Na Tabela I, são mostradas as características físico-químicas do glicerol residual da produção de biodiesel. Estes resultados não mostram, em princípio, níveis dos parâmetros avaliados que pudessem, eventualmente, provocar prejuízo sobre o metabolismo de *E. aerogenes*.

Tabela I – Características físico-químicas do glicerol residual proveniente da produção de biodiesel fornecido pela Petrobrás S.A.

Parâmetro analisado	
Cálcio total (mg/L)	112,55
Demanda química de oxigênio (mg/L)	1059398
Ferro total (mg/L)	0,868
Magnésio total (mg/L)	2,946
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	66,41 \pm 1,29
pH	5,51
Potássio (mg/L)	7,12
Sódio (mg/L)	24854
Sólidos suspensos totais (mg/L)	3123 \pm 1020
Sólidos suspensos voláteis (mg/L)	2901 \pm 944
Sólidos suspensos fixos (mg/L)	222 \pm 76

Na Figura I, são mostrados os perfis cinéticos para o crescimento microbiano e o pH em cultivos de *E. aerogenes* com o emprego de glicerol comercial e residual em diferentes concentrações.

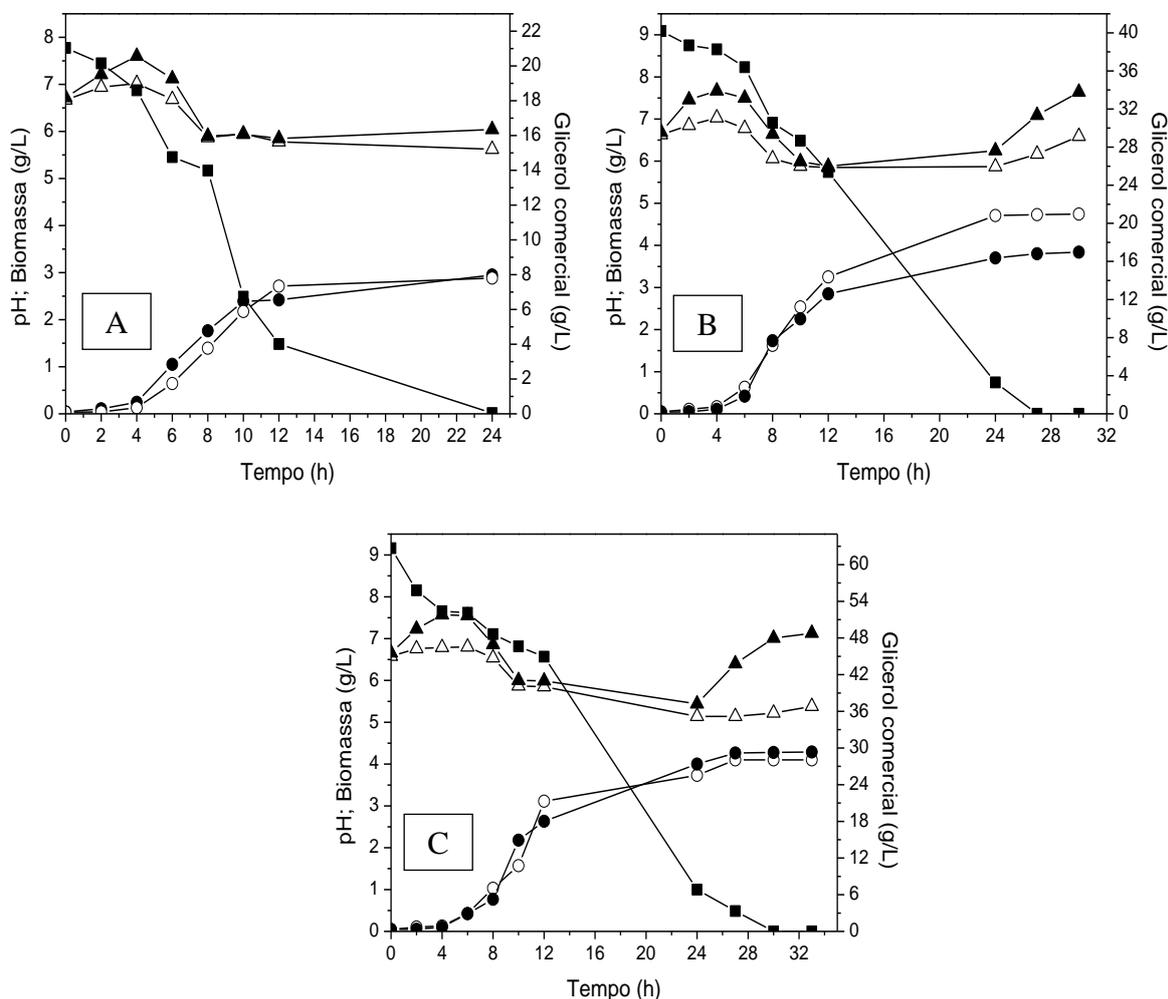


Figura I - Variações das concentrações de biomassa celular e de glicerol comercial e pH com o tempo, em cultivos de *Enterobacter aerogenes* em meio contendo diferentes concentrações de glicerol comercial e residual (A) 20 g/L; (B) 40 g/L; (C) 60 g/L, a 37°C, 300 rpm. (○) Biomassa cultivada glicerol residual; (●) biomassa cultivada glicerol comercial; (■) glicerol comercial; (Δ) pH em meio com glicerol residual; (▲) pH em meio com glicerol comercial.

Em geral, independentemente da concentração de substrato utilizada, foi observada uma fase de adaptação média de 3 a 4 h, que pode estar relacionada ao aumento nos valores de pH, em decorrência da adição de CaCO_3 no momento da inoculação, sendo este perfil observado com as três S_0 testadas.

Após a fase de adaptação, comportamento similar do pH foi verificado tanto nos cultivos em meio com glicerol residual quanto nos conduzidos com glicerol comercial: aumento gradual até pH 7,0-7,6, em 4 h, nos ensaios com S_0 de 20 e 40 g/L, e aumento até 6 h com 60 g/L de substrato. No final dos cultivos, constatou-se a elevação dos valores do pH, particularmente com o uso de 40 e 60 g/L de glicerol, em decorrência, provavelmente, do esgotamento de substrato e da neutralização de compostos ácidos pelo CaCO_3 .

Em cultivos com S_0 de 20 g/L, a fase exponencial de crescimento foi observada a partir de 4 h de cultivo, se estendendo até cerca de 10 h para fonte residual, sendo quantificada neste período, biomassa em torno de 2,4 g/L. Com o uso da fonte de carbono comercial, o crescimento exponencial se estendeu até 12 h, com a obtenção de biomassa de 2,7 g/L. Nos ensaios com S_0 de 40 e 60 g/L, foi observado intenso crescimento microbiano até 24 h, sendo quantificados, neste período, 4,7 e 3,7 g/L de biomassa para S_0 de 40 g/L e 3,7 e 4,0 g/L com S_0 de 60 g/L, respectivamente, para as fontes residual e comercial (Figuras IB e IC).

Quanto ao consumo de substrato, devido à presença de possíveis compostos interferentes na análise, a quantificação do consumo de glicerol residual pelo método colorimétrico não pôde ser realizada. A determinação de glicerol residual foi realizada em CLAE, nas amostras iniciais e finais de cada cultivo, sendo constatado consumo total do substrato ao término dos ensaios (dados não mostrados). Nos testes com glicerol comercial, com S_0 de 20 g/L, de acordo com o perfil (Figura IA), o consumo completo do substrato ocorreu, provavelmente, antes de 24 h de processo, quando foi realizada a amostragem, enquanto nas demais condições, o consumo total ocorreu em 27 e 30 h, respectivamente, para 40 e 60 g/L (Figura IB e IC). Por este motivo, possivelmente, foi verificado nas amostragens posteriores elevação nos valores de pH na fase estacionária, como consequência da diminuição de formação de metabólitos ácidos.

Na Tabela II, são apresentados os resultados para a concentração de biomassa final (X_f), fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e máxima velocidade específica de crescimento celular (μ_{xm}). Nos cultivos empregando glicerol residual, X_f superior, de 4,7 g/L, foi obtida no ensaio com S_0 de 40g/L. Com S_0 de 60 g/L de glicerol comercial, atingiram-se 4,3 g/L de biomassa. Valores decrescentes de μ_{xm} e $Y_{X/S}$ foram calculados com o aumento de S_0 , tanto para glicerol comercial quanto para residual. Para μ_{xm} , os resultados obtidos indicam a ocorrência de inibição do crescimento celular em concentrações crescentes de substrato, independentemente do emprego de glicerol comercial ou residual. Os resultados de $Y_{X/S}$

podem ser interpretados como decorrentes da mudança de metabolismo de respiratório para fermentativo.

Tabela II - Resultados gerais, relativos ao crescimento microbiano, obtidos em cultivos de *Enterobacter aerogenes* em meio contendo diferentes concentrações de glicerol comercial e residual (37°C, pH 6,5, 300 rpm, 100 mL de meio).

Fonte de carbono	S ₀ (g/L)	X _f (g/L)	μ _{xm} (h ⁻¹)	Y _(x/s) (g/g)
Glicerol residual	21,6	2,9	0,80	0,134
	40,1	4,7	0,61	0,117
	60,7	4,1	0,54	0,067
Glicerol comercial	18,5	2,9	0,83	0,154
	35,2	3,8	0,76	0,107
	61,6	4,3	0,49	0,069

S₀ - concentração inicial de glicerol residual e comercial; X_f - concentração celular final; μ_{xm} - máxima velocidade específica de crescimento; Y_{X/S} - fator de conversão de glicerol em células.

Na Tabela III, são apresentados os resultados gerais relativos à produção de 2,3-butanodiol e etanol. Como pode ser observado, houve aumento na concentração de produtos com o incremento em S₀, tanto residual como comercial. Como demonstrado anteriormente (Figura I e Tabela II), apesar do efeito inibitório em maiores S₀ (40 e 60 g/L), a formação destes produtos foi favorecida em condições de limitação de oxigênio, ocorridas nos cultivos com valores superiores de S₀. Sob a limitação de O₂, como há menor geração de energia na forma de ATP, o crescimento diminui, levando, então, à produção de 2,3-butanodiol, com o objetivo de reoxidar o NADH produzido na conversão de glicerol em piruvato e obter energia metabólica para manutenção celular.

Em termos de fator de conversão em 2,3-butanodiol/acetoina (Y_{P/S butanodiol}), resultados superiores foram obtidos com S₀ de 40 e 60 g/L, respectivamente, com glicerol residual e comercial. Por outro lado, o fator de conversão em etanol (Y_{P/S etanol}) foi superior com S₀ de 60 e 40 g/L, respectivamente para glicerol residual e comercial (Tabela III). Em geral, valores superiores de rendimento foram obtidos nos ensaios com glicerol residual, tanto para 2,3-butanodiol/acetoina quanto para etanol.

Tabela III - Resultados gerais, relativos à formação de produtos, obtidos em cultivos de *Enterobacter aerogenes* em meio contendo diferentes concentrações de glicerol comercial e residual (37°C, pH 6,5, 300 rpm, 100 mL de meio).

Fonte de carbono	S ₀ (g/L)	Butanodiol (g/L)	Y _{P/S} butanodiol (g/g)	ρ _{butanodiol} (%)	Etanol (g/L)	Y _{P/S} etanol (g/g)	ρ _{etanol} (%)
Glicerol residual	21,6	8,8	0,407	83	ND	ND	ND
	40,0	19,2	0,463	95	3,2	0,056	11
	60,7	28,1	0,479	98	6,3	0,135	27
Glicerol comercial	18,4	8,0	0,433	88	1,3	0,059	12
	35,2	14,8	0,420	86	2,0	0,091	18
	61,6	26,3	0,427	87	3,0	0,048	10

S₀ - concentração inicial de glicerol; Y_{P/S} - fator de conversão de glicerol em produtos (butanodiol/acetoina e etanol); ρ - rendimento em 2,3-butanodiol/acetoina em relação ao máximo teórico (0,489 g/g glicerol) e rendimento em etanol em relação ao máximo teórico (0,50g/g glicerol); ND - não detectado ou apenas traços.

Conclusões

Os resultados aqui apresentados indicam o potencial de utilização do glicerol residual proveniente da produção de biodiesel em processos fermentativos para a produção de 2,3-butanodiol/acetoina por *E. aerogenes*. Porém, há a necessidade de que sejam realizados novos estudos com concentrações elevadas de glicerol residual (acima de 60 g/L), a fim de verificar eventuais efeitos inibidores de outras substâncias presentes neste material. Adicionalmente, são necessários novos estudos com glicerol residual em biorreator de bancada, no qual as condições operacionais podem ser mais eficientemente controladas e os resultados mais confiáveis.

Referências bibliográficas

- Carra, S. (2012). Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Caxias do Sul, 2012.
- Pirt, S. J.; Callow, D. S. (1958). Production of 2,3-butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a single stage process. **Journal of Applied Bacteriology**. 21: 188-205.
- Standart Methods for Examination of Water and Wastewater, 22 nd Edittion, APHA, 2012.