

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**Avaliação do potencial de produção de 2,3-butanodiol utilizando
diferentes espécies de bactérias e fontes de carbono**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
PAULA PROVENZI

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**Avaliação do potencial de produção de 2,3-butanodiol utilizando
diferentes espécies de bactérias e fontes de carbono**

PAULA PROVENZI

Trabalho apresentado como um dos requisitos
para obtenção do Grau de Bacharel em
Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia
Molecular.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientador: Allan Valcareggi Morcelli

Porto Alegre, Dezembro de 2015

Este trabalho foi desenvolvido no BiotecLab, localizado no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFRGS pela formação proporcionada e a todos os professores pelo ensino de excelência.

Ao meu orientador Marco Antônio Záchia Ayub, pela confiança e oportunidade única e ao meu co-orientador Allan Valcareggi Morcelli, por todos os ensinamentos, auxílio, apoio e dedicação.

À minha família, pelo amor, incentivo e carinho incondicionais. Obrigada por estarem sempre presentes, apesar da distância.

Ao Daniel, pelo amor e companheirismo em todas as horas.

Aos meus colegas de curso, que tornaram essa caminhada mais leve e aos meus bons amigos, pela amizade e alegrias compartilhadas.

A todos que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional ao longo da graduação, também fica minha gratidão.

RESUMO

O álcool 2,3-butanodiol (2,3-BD) apresenta extensa aplicação industrial, podendo ser destinado tanto para processos industriais, tais como nas indústrias de polímeros, de tintas de impressão, de perfumes, de explosivos e de plastificantes, quanto para a obtenção de outros produtos químicos, tais como metil-etil-cetona, 1,3-butadieno e diacetil. A produção de 2,3-BD pode ocorrer por processos puramente químicos como por biossíntese microbiana. No entanto, o interesse pela obtenção desse álcool a partir da via biológica, a partir de fontes de carbono renováveis como matéria-prima, tem crescido muito devido aos problemas político-econômicos do uso do petróleo, bem como à necessidade de implementação de gestão mais sustentável de resíduos. Nesse contexto, a otimização da produção de 2,3-BD por bactérias se faz necessária. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de 2,3-BD a partir de glicerol, permeado de soro de queijo e de glicose como fontes de carbono utilizando três diferentes bactérias do gênero *Bacillus*: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Paenibacillus polymyxa*, além de otimizar parâmetros de processo como pH, temperatura, concentração de fonte de carbono inicial e concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo a fim de garantir as melhores condições de produção de 2,3-BD. Através de experimentos iniciais, constatou-se que a única linhagem produtora de 2,3-BD foi a de *Bacillus licheniformis* utilizando glicose como substrato. Através do planejamento composto central, foram otimizados alguns parâmetros do processo com o objetivo de obter a conversão máxima de substrato a 2,3-BD. Os valores ótimos obtidos foram de pH inicial de 7,85, temperatura de 36,8 °C e concentração inicial de glicose de 37,21 g·L⁻¹. Experimentos realizados em incubadora de agitação orbital comprovaram esses resultados, de modo que a conversão média de glicose a 2,3-BD foi de 0,25 g·g⁻¹, comparável ao valor teórico predito pelo modelo obtido de 0,261 g·g⁻¹. Cultivos em biorreatores em regime de batelada foram realizados a fim de testar as condições de limitação de oxigênio a 10 %, 20 % e 30 %, utilizando os parâmetros obtidos pelo planejamento composto central e mantendo o pH constante a 7,85 durante todo o processo. Essa estratégia mostrou-se pouco eficiente, porque os valores de $Y_{2,3-BD}$ obtidos foram de 0,06 g·g⁻¹, 0,07 g·g⁻¹ e 0,15 g·g⁻¹, respectivamente, inferiores ao valor obtido anteriormente, além de concentração final de 2,3-BD de 1,35 g·L⁻¹ e produtividade de 0,08 g·L⁻¹·h⁻¹ para 10 % de oxigênio, 1,37 g·L⁻¹ e 0,08 g·L⁻¹·h⁻¹ para 20 % oxigênio e 1,75 g·L⁻¹ e 0,13 g·L⁻¹·h⁻¹ para 30 % de oxigênio.

ABSTRACT

The alcohol 2,3-butanediol has an extensive industrial application, varying from its use in the polymer industry, printing inks, perfumes, explosives, plasticizers, and for the production of other chemical products, such as methyl-ethyl-keton, 1,3-butadiene, and diacetyl. The production of 2,3-BD can be carried out by chemical processes or by microbial biosynthesis. However, there is a growing interest in using the biological route from renewable carbon sources as feedstock, because of economic and political issues surrounding the oil industry, and the necessity of a more sustainable waste management implementation as well. In this context, the optimization of the 2,3 butanediol production is necessary. Therefore, the aim of this work was to evaluate the potential production of 2,3-butanediol using raw glycerol, whey permeate, or glucose as carbon sources, utilizing three different *Bacillus* bacteria: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Paenibacillus polymyxa*. It was necessary to optimize the pH, temperature, initial carbon source concentration, and the dissolved oxygen concentration in the culture medium, in order to ascertain the best 2,3-BD production conditions. The initial experiments showed that only *Bacillus licheniformis* was capable to produce 2,3-BD on glucose as substrate. Process parameters were optimized using central composite design of experiments, to optimize 2,3-BD yields. Highest results were achieved as initial pH of 7.85; temperature of 36.8 °C, and initial glucose concentration of 37.21 g·L⁻¹. Validation using shake flask experiments confirmed these results, with an average 2,3-BD yield of 0.25 g·g⁻¹, which was considered comparable to the theoretical value predicted by the model, of 0.261 g·g⁻¹. Batch bioreactor cultivations were carried out in order to test oxygen limited conditions of 10 %, 20 % and 30 % dissolved oxygen (DO), using the conditions previously obtained and keeping a constant pH of 7.85 during the entire process. This strategy was not efficient, because 2,3-BD yields were 0.06 g·g⁻¹, 0.07 g·g⁻¹ and 0.15 g·g⁻¹, respectively, representing much lower values than those previously obtained. Furthermore, the final concentration and volumetric productivity of 2,3-BD were 1.35 g·L⁻¹ and 0.08 g·L⁻¹·h⁻¹ for 10 % DO, 1.37 g·L⁻¹ and 0.08 g·L⁻¹·h⁻¹ for 20 % DO, and 1.75 g·L⁻¹ and 0.13 g·L⁻¹·h⁻¹ for 30 % DO.

LISTA DE ABREVIACÕES

2,3-BD – 2,3-butanodiol

1,3-PD – 1,3-propanodiol

α -ALS – α -acetolactato sintase

α -ALD - α -acetolactato desidrogenase

$\mu_{m\acute{a}x}$ -velocidade específica de crescimento máxima

BDH – butanodiol desidrogenase

Co⁺² – íon cobalto

D-(-) – isômero dextrógiro

DAR – diacetil redutase

FDA – *Food and Drug Administration*

GRAS – *Generally Recognized as Safe*

L-(-) – isômero levógiro

LDH – L-/D-lactato desidrogenase

pH – potencial hidrogeniônico

PUMAs – poliuretano-maleimidadas

O₂ – gás oxigênio

$Y_{2,3-BD}$ – conversão de substrato a 2,3-butanodiol

Y_{XS} – conversão de substrato a biomassa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Os isômeros do 2,3-butanodiol.....	3
Figura 2 - Produtos derivados do 2,3-butanodiol	5
Figura 3 – Via de fermentação ácido-mista para a produção de 2,3-butanodiol.....	8
Figura 4 - O efeito do fornecimento de oxigênio no rendimento de subprodutos da fermentação por <i>Paenibacillus polymyxa</i>	15
Figura 5 – Superfície de resposta para a conversão de glicose a 2,3-butanodiol em função da variação de pH, temperatura e da concentração de glicose	31
Figura 6 - Cinética de crescimento de biomassa a partir de uma concentração inicial de glicose de 37,21 g·L ⁻¹ em três condições de limitação de oxigênio.	33
Figura 7 - Avaliação da produção de 2,3-butanodiol em um intervalo de 12 horas, para diferentes condições de limitação de oxigênio.....	34
Figura 8 – Avaliação do consumo de glicose em um intervalo de 24 horas para diferentes condições de limitação de oxigênio.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de diferentes isômeros de 2,3-butanodiol a partir de diferentes espécies bacterianas (JI; HUANG; OUYANG, 2011).	12
Tabela 2 - Produção de 2,3-BD e de biomassa por diferentes microrganismos a partir de diferentes fontes de carbono.	27
Tabela 3 – Variáveis testadas e seus níveis no planejamento composto central.	28
Tabela 4 – Delineamento experimental e resultados do Planejamento Composto Central.	29
Tabela 5 – Análise estatística do planejamento composto central realizado (avaliada a intervalo de confiança de 10 %).	30
Tabela 6 - Valores críticos do modelo quadrático obtido (resposta prevista, $Y_{2,3-BD} = 0,263$).	31
Tabela 7 – Avaliação da presença do íon cobalto no meio de cultivo na produção de 2,3-butanodiol	32
Tabela 8 - Parâmetros de cinética de crescimento, consumo de glicose e produtividade para as condições de limitação de oxigênio a 10 %, 20 % e 30 %	37

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	2,3-Butanodiol.....	3
2.2	Histórico de produção.....	5
2.3	Rota metabólica e função biológica.....	7
2.4	Microrganismos produtores.....	9
2.5	<i>Bacillus licheniformis</i>	12
2.6	Condições de processo.....	14
2.6.1	Aeração.....	14
2.6.2	Potencial hidrogeniônico (pH).....	16
2.6.3	Temperatura.....	18
2.6.4	Concentração inicial de substrato.....	19
2.6.5	Cobalto.....	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1	Reagentes químicos e substratos.....	21
3.2	Microrganismos e meio de estoque.....	21
3.3	Preparo de inóculos.....	22
3.4	Produção de 2,3-butanodiol através de diferentes substratos.....	22
3.5	Otimização da produção de 2,3-butanodiol.....	23
3.6	Experimentos em Biorreator.....	24
3.7	Métodos Analíticos.....	24
3.8	Obtenção de parâmetros cinéticos.....	25
4.	RESULTADOS.....	26
4.1	Escolha do microrganismo e da fonte de carbono.....	26
4.2	Planejamento de Experimentos.....	27
4.2.1	Validação do planejamento composto central.....	31
4.3	Avaliação da presença de cobalto no meio e cultivo.....	32
4.4	Experimentos em Batelada.....	32
5.	DISCUSSÃO.....	38
6.	CONCLUSÃO.....	43
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

2,3-butanodiol é um álcool que apresenta três estereoisômeros: meso-2,3-BD, (2R,3R)-2,3-BD e (2S,3S)-2,3-BD. É um importante produto químico devido à sua extensiva aplicação industrial, uma vez que pode ser destinado tanto para processos industriais, como nas indústrias de polímeros, de tintas de impressão, de perfumes, de explosivos e de plastificantes, quanto para a produção de metil-etil-cetona, 1,3-butadieno e diacetil, utilizados como solventes de resinas e vernizes e como aditivos de combustíveis, na produção de borracha sintética e como aditivo alimentício, respectivamente.

O 2,3-BD pode ser produzido tanto por vias de produção química quanto biológica. No entanto, o interesse pela obtenção desse álcool a partir de conversão de biomassa utilizando fontes renováveis como matéria-prima, como resíduos agrícolas e industriais, tem aumentado, uma vez que as reservas de petróleo bruto estão se tornando cada vez mais escassas, bem como há a crescente preocupação com a implementação de uma gestão racional de resíduos.

Apesar de diversas leveduras poderem sintetizar 2,3-BD, os rendimentos são considerados baixos, de modo que apenas algumas bactérias apresentam potencial para a produção industrial na fermentação de 2,3-BD. Atualmente, as maiores produtoras são *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Paenibacillus polymyxa*. Entretanto, as duas primeiras são consideradas microrganismos pertencentes à classe de risco 2, ou seja, podem apresentar certa patogenicidade, que é um fator indesejável para a utilização dessas bactérias para a produção industrial de 2,3-BD.

Desse modo, pesquisas na área de obtenção de novos microrganismos produtores de 2,3-BD pertencentes à classe 1 se fazem necessárias. Mesmo havendo relatos desses microrganismos como produtores de 2,3-BD, o rendimento obtido pela maioria dessas espécies é muito baixo, de modo que seu emprego não é economicamente viável. No entanto, espécies do gênero *Bacillus*, por apresentarem bons rendimentos de produção de 2,3-BD e, em sua grande maioria, serem consideradas microrganismos de classe de risco 1, podem ser vistas como uma alternativa interessante para esse problema.

Desse modo, o objetivo do trabalho centra-se na avaliação da produção de 2,3-butanodiol a partir de diferentes espécies de *Bacillus* pertencentes à classe de risco 1, utilizando diferentes fontes de carbono.

Mais detalhadamente, os objetivos específicos são:

- Averiguar qual o melhor microrganismo produtor de 2,3-butanodiol dentre *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Paenibacillus polymyxa*, pertencentes à coleção do laboratório;
- Averiguar a possibilidade de utilização de fontes de carbono alternativas para a produção de 2,3-butanodiol, como glicerol e permeado de soro de leite em pó;
- Avaliar o efeito do pH do meio sobre a biomassa e sobre a produção de 2,3-butanodiol e de metabólitos secundários;
- Avaliar o efeito da temperatura sobre a biomassa e sobre a produção de 2,3-butanodiol e de metabólitos secundários;
- Avaliar o efeito da concentração inicial de substrato sobre a biomassa e sobre a produção de 2,3-butanodiol e de metabólitos secundários;
- Testar a influência do íon Co^{+2} sobre a produção de 2,3-butanodiol;
- Escalonar experimentos a biorreatores de 2 L.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 2,3-Butanodiol

2,3-butanodiol (2,3-BD), também conhecido como 2,3-butileno-glicol, dimetiletileno-glicol e butano-2,3-diol (nomenclatura IUPAC), é um álcool com peso molecular de 90,121 g.mol⁻¹ e fórmula molecular C₄H₁₀O₂. Apresenta-se como líquido incolor e inodoro ou em sua forma cristalina (SYU, 2001) e pode existir em três formas isoméricas: D(-)-, L(+)- e meso- (Figura 1). Os três isômeros apresentam altos pontos de ebulição que, embora difiram ligeiramente entre si, variando de 177 °C a 182 °C, são muito superiores ao da água, de modo que uma grande quantidade de água precise ser evaporada através da destilação para a recuperação do 2,3-BD produzido através de fermentação (VOLOCH et al., 1985). Também apresentam baixos pontos de congelamento (-60 °C), possibilitando a empregabilidade do isômero levógiro como anti-congelante (GARG e JAIN, 1995).

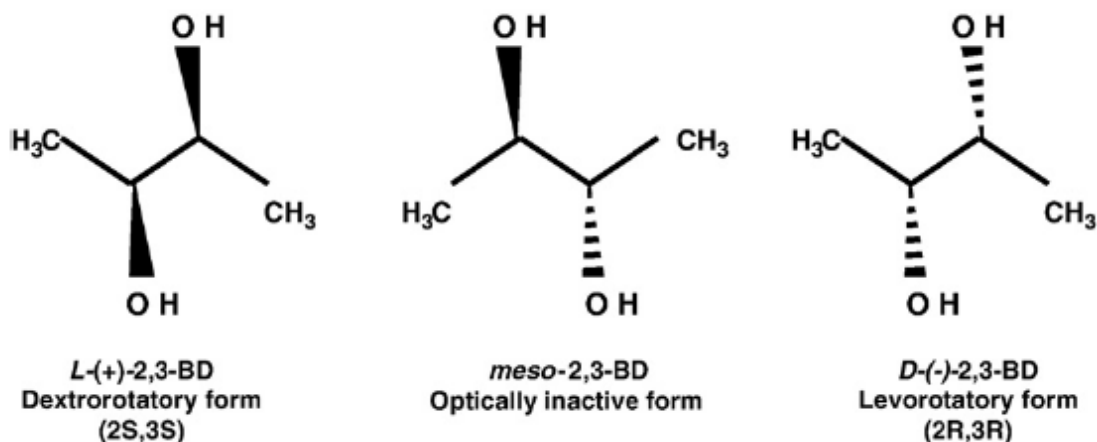


Figura 1 - Os isômeros do 2,3-butanodiol. (CELÍŃSKA e GRAJEK, 2009)

O calor de combustão do 2,3-butanodiol é de 27.200 kJ·kg⁻¹, comparado favoravelmente ao de outros combustíveis líquidos, como o metanol (22.100 kJ·kg⁻¹) e o etanol (29.100 kJ·kg⁻¹), de modo que pode ser considerado como um potencial aditivo de combustível (FLICKINGER, 1980). Misturas equimolares de etanol e 2,3-BD fornecem um calor de combustão combinado de 27.660 kJ·kg⁻¹, indicando que a presença de etanol

não prejudica a utilização de 2,3-BD para esse emprego (YU e SADDLER, 1982a). Ademais, possui alto índice de octano e, devido a isso, pode ser usado como reforço na gasolina ou como combustível para aviação (GARG e JAIN, 1995).

A desidrogenação catalítica do 2,3-butanodiol produz diacetil, um aditivo alimentício de alto valor agregado, utilizado como agente flavorizante na indústria de alimentos (GARG e JAIN, 1995) que confere sabor amanteigado (BARTOWSKY e HENSCHKE, 2004). O diacetil também é um agente bacteriostático, capaz de inibir o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* e outros microrganismos patogênicos de forma mais eficiente que o ácido benzoico (UNDERKOFER e HICKEY, 1954).

Outra importante aplicação do 2,3-BD é através da sua conversão a 1,3-butadieno, que é utilizado principalmente na produção de borracha sintética, mas também na de eletrodomésticos, calçados, plásticos, modificadores de asfalto, aditivos para óleos lubrificantes, tubos, componentes de construção e látex. Este produto, geralmente obtido através do petróleo, tem apresentado escassez de oferta, sendo de grande importância sua obtenção através de fontes alternativas (ROMIO, 2014). A desidratação do 2,3-butanodiol resulta em metil-etil-cetona, utilizada como solvente para resinas e vernizes e, por possuir calor de combustão superior ao do etanol, é usada como aditivo eficiente para combustíveis e para a produção de combustíveis de aviação de alta qualidade (VILLET, 1981; SYU, 2001). Além disso, a esterificação de 2,3-BD com ácido maleico produz poliuretano-maleimidas (PUMAs), que são empregadas em aplicações cardiovasculares (TANZI et al., 1999) e precursores de espumas de poliuretano para uso em medicamentos, cosméticos, loções, pomadas e antitranspirantes.

Também foi demonstrado que o 2,3-butanodiol tem potencial aplicação nas indústrias de polímeros, de tintas de impressão, de perfumes, de explosivos, de plastificantes e como transportadores de fármacos (GARG e JAIN, 1995). Ademais, 2,3-BD é um composto biodegradável, ganhando grande destaque do ponto de vista ecológico, podendo ser utilizado para a fabricação de produtos menos agressivos ao meio ambiente (BERBERT-MOLINA, 1995). No ano de 2001, a fabricação de 2,3-butanodiol cresceu a uma taxa de 4 a 7 % devido ao aumento da demanda por produtos obtidos a partir desse precursor (SYU, 2001). Atualmente, estima-se que os derivados de 2,3-BD movimentam um mercado global de aproximadamente 32 milhões de toneladas por ano, resultando em um montante de 43 bilhões de dólares (KÖPKE et al., 2011).

Os compostos químicos e seus processos de síntese a partir de 2,3-butanodiol estão descritos na Figura 2.

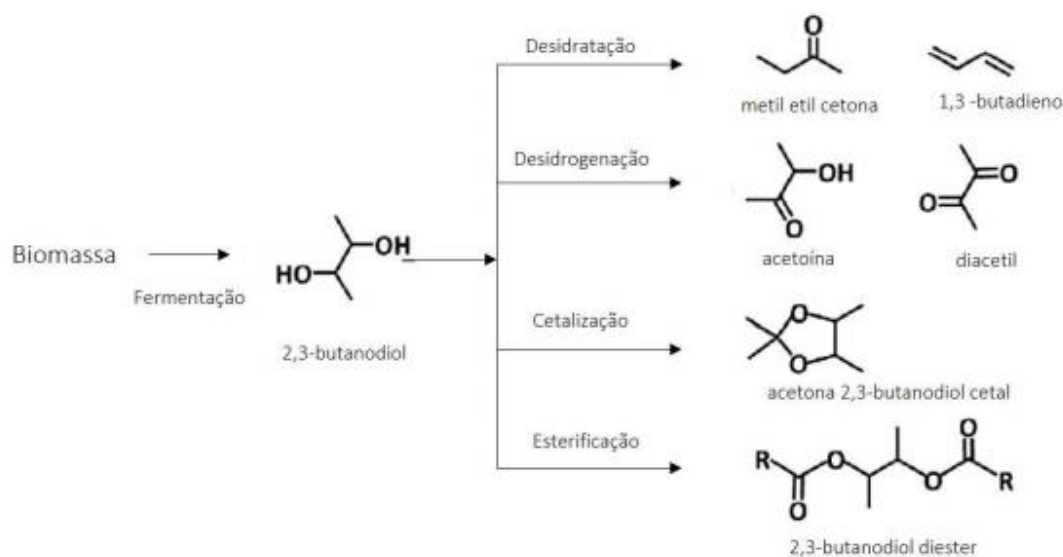


Figura 2 - Produtos derivados do 2,3-butanodiol (ROMIO, 2014)

2.2 Histórico de produção

Como as reservas de petróleo bruto estão se tornando cada vez mais escassas, o interesse por bio-refinarias que integram processos e equipamentos de conversão de biomassa para a produção de combustíveis, energia e outros produtos químicos a partir de fontes renováveis tem aumentado significativamente (KAMM e KAMM, 2004; RAGAUSKAS et al., 2006). Muitos produtos químicos, antes só produzidos por processos químicos, agora podem ser obtidos através de vias biológicas, utilizando recursos renováveis como matérias-primas (HATTI-KAUL; TO e GUSTAFSSON, 2007). O 2,3-butanodiol é um exemplo desses produtos, já que pode ser sintetizado através da via química, a partir do petróleo, ou através de vias biológicas.

Historicamente, tentativas de obtê-lo por síntese microbiana são relatadas desde o início do século passado. Em 1906, Harden e Walpole foram os precursores da síntese biológica de 2,3-BD utilizando *Aerobacter aerogenes* (atualmente denominada *Klebsiella pneumoniae*), seguidos por Harden e Norris em 1912 e por Donker, em 1926, que utilizou *Paenibacillus polymyxa* (anteriormente denominada *Bacillus polymyxa*) (KOSARIC, MAGEE e BLASZCZYK, 1992). Em 1933, Fullmer, Christensen e Kendall propuseram a produção industrial desse álcool. Todavia, o maior interesse na produção industrial de

2,3-BD através de rotas biológicas ocorreu na década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, já que a escassez de matéria-prima para a produção de borracha sintética, devido à crise do petróleo, motivou os Estados Unidos e o Canadá a desenvolverem uma planta-piloto para a transformação de 2,3-butanodiol em 1,3-butadieno utilizando *Klebsiella oxytoca* e *Paenibacillus polymyxa* (ROMIO, 2014; BLACKWOOD et al., 1949; LEDINGHAM e NEISH, 1954).

Com o término da guerra, perdeu-se o interesse no processo de síntese biológica de 2,3-BD, já que rotas de produção química a partir do petróleo tornaram-se novamente disponíveis e eram economicamente mais viáveis. Na década de 1970, com a crise do petróleo e as perspectivas de aumento a longo prazo dos preços do mesmo, reavivou-se o interesse na produção de 2,3-butanodiol a partir de biomassa, especialmente nos Estados Unidos (VOLOCH et al., 1985).

Assim, a relevância dos bioprocessos de produção de 2,3-BD tem aumentado notavelmente nos últimos anos, de forma que a produção microbiológica ajudará na diminuição da dependência do petróleo para a sua obtenção (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009; WU et al., 2008). Ademais, a fermentação do excesso de biomassa oriunda de resíduos agrícolas ou industriais para a obtenção de produtos químicos tem ganhado considerável atenção, devido às preocupações com a escassez de combustíveis tradicionais e com a gestão mais racional de resíduos (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). A China é um dos países que mais têm demonstrado interesse na produção microbiana de 2,3-BD, já que o uso de biomassa renovável para a produção de compostos de interesse industrial é um caminho promissor para o desenvolvimento de uma economia de baixo custo e mais sustentável (LI et al., 2010).

No entanto, um dos problemas da produção fermentativa de 2,3-BD decorre do elevado ponto de ebulição desse produto, de modo que uma grande quantidade de água deve ser evaporada por destilação na recuperação do 2,3-BD do caldo fermentado (VOLOCH et al., 1985). É por isso que métodos alternativos de recuperação de 2,3-BD devem ser desenvolvidos (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

2.3 Rota metabólica e função biológica

O 2,3-butanodiol é sintetizado biologicamente a partir do piruvato, em um processo de fermentação ácido-mista através de diversos compostos intermediários, incluindo α -acetolactato, acetoína e diacetil (CASPI, 2008). Os outros produtos finais dessa via são etanol, acetato, lactato, formato e succinato (SYU, 2001).

O piruvato proveniente da glicólise pode ser convertido tanto em lactato, em uma reação que requer NADH, a qual é catalisada por L-/D-lactato-desidrogenase (LDH), quanto em α -acetolactato, através de descarboxilação catalisada por α -acetolactato-sintase (α -ALS), que, em condições aeróbias, é rápida e irreversivelmente inativada, impedindo a síntese de 2,3-BD sob alto fornecimento de gás oxigênio (KOSARIC, MAGEE e BLASZCZYK, 1992). O α -acetolactato é majoritariamente produzido em condições de baixa disponibilidade de NADH. Além disso, sob condições anaeróbias, α -acetolactato pode ser convertido em acetoína pela enzima α -acetolactato descarboxilase (α -ALD) e em presença de oxigênio, α -acetolactato pode sofrer descarboxilação espontânea, originando o diacetil. Em seguida, diacetil redutase (DAR) converte o diacetil em acetoína e, por fim, butanodiol desidrogenase reduz a acetoína a 2,3-butanodiol (HENRIKSEN e NILSSON, 2001). A conversão metabólica de acetoína a 2,3-BD é reversível e ocorre através da enzima acetoína redutase.

É reportado que o acetato, a um pH baixo (isto é, em presença de ácido acético) é indutor das três enzimas da via de conversão de piruvato a 2,3-BD, desempenhando papel importante na formação desse álcool (BRYN, ULSTRUP e STORMER, 1973; STORMER, 1968). Todas as enzimas e compostos envolvidos na via de produção de 2,3-butanodiol são normalmente produzidos durante as fases de crescimento exponencial e a fase estacionária da fermentação, quando ocorre condição de limitação de oxigênio (MALLONEE e SPECKMAN, 1988).

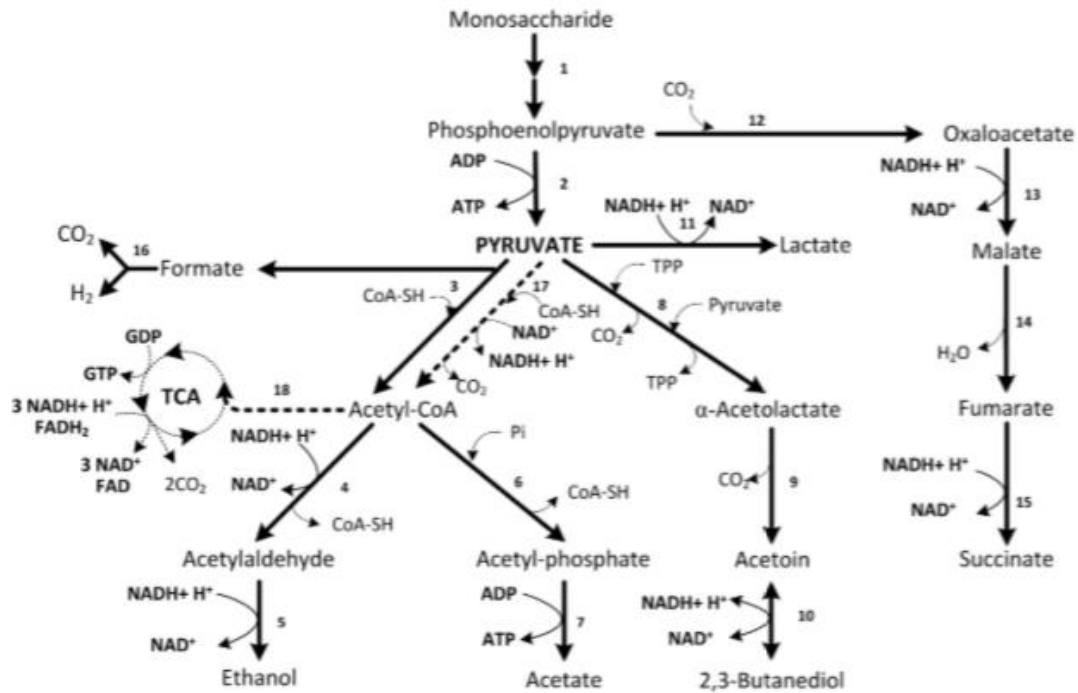


Figura 3 – Via de fermentação ácido-mista para a produção de 2,3-butanodiol. Linhas pontilhadas representam as vias que apenas estão ativas sob condições aeróbias. Sob condições anaeróbias ou de limitação de oxigênio, o piruvato é convertido a α -acetolactato que, em condições anaeróbias é convertido a acetoina. A conversão metabólica de acetoina a 2,3-butanodiol é reversível e catalisada pelas enzimas acetoina redutase e 2,3-butanodiol desidrogenase. TCA – ciclo do ácido tricarbóxico; 1 – Via Embden-Meyerhof (glicólise) e via das pentoses fosfato; 2 – piruvato quinase; 3 – piruvato formato liase; 4 – acetaldeído desidrogenase; 5 – etanol desidrogenase; 6 – fosfo transacetilase; 7 – acetato quinase; 8 - α -acetolactato sintase; 9 - α -acetolactato descarboxilase; 10 – acetoina redutase (2,3-butanodiol desidrogenase); 11 – lactato desidrogenase; 12 – fosfoenolpiruvato descarboxilase; 13 – malato desidrogenase; 14 – fumarase; 15 – succinato desidrogenase; 16 – complexo formato-hidrogênio-liase; 17 – complexo multi-enzimático piruvato desidrogenase e 18 – citroil sintetase (JI, HUANG e OUYANG, 2011)

A função metabólica do 2,3-butanodiol ainda não foi satisfatoriamente esclarecida. Porém, acredita-se que esteja envolvida na prevenção da acidificação intracelular através da alteração do metabolismo da produção de ácido para a formação de compostos neutros (BLOMQUIST et al., 1993). Foi demonstrado que a produção de 2,3-BD é induzida sob condições ácidas (NAKASHIMADA et al., 2000), o que pode indicar que, por 2,3-BD ser um metabólito de pH neutro, contribua para a diminuição da alta acidificação. A segunda possível função atribuída à rota metabólica do 2,3-BD é a regeneração do excesso do poder redutor associado à glicólise, de modo que, como ocorre em outros processos fermentativos, essa via participa da regulação da razão NADH/NAD⁺ na célula (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). Por fim, a síntese de 2,3-BD também pode ser considerada como uma estratégia de armazenamento de carbono e

energia (XIAO e XU, 2007), podendo ser reutilizado durante a fase estacionária quando a fonte de carbono e energia estiver sendo consumida.

2.4 Microrganismos produtores

Diversas leveduras têm a capacidade de produzir dióis, mas com rendimentos extremamente baixos, de modo que, atualmente, as bactérias são os únicos microrganismos de importância industrial na fermentação do 2,3-butanodiol. Diversas espécies bacterianas têm a capacidade de produzir 2,3-BD, porém apenas algumas delas o fazem em quantidades significantes. Os principais gêneros relatados como produtores de 2,3-butanodiol incluem *Klebsiella* (JANSEN, FLICKINGER e TSAO, 1984; RAMACHANDRAN e GOMA, 1987; ROSSI, DE SOUZA e AYUB, 2013; SILVEIRA, SCHMIDELL e BERBERT, 1993), *Enterobacter* (PEREGO et al., 2000; BOTHAST e SAHA, 1999), *Serratia* (RAO et al., 2012) e *Bacillus* (LAUBE, GROLEAU e MARTIN, 1984).

No entanto, os trabalhos em que os melhores resultados aparecem são relatados para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Paenibacillus polymyxa*. Em adição, *Enterobacter aerogenes* vem sendo considerada como um microrganismo promissor para a produção de 2,3-butanodiol (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria anaeróbia facultativa que cresce rapidamente em meio simples (ANDERSON e WOOD, 1962) e pode utilizar um amplo espectro de substratos, incluindo glicose, manose, galactose, xilose, arabinose, celobiose e lactose, além de estar amplamente distribuída na natureza e ser estável para uma série de condições ambientais (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009; GARG e JAIN, 1995). *K. pneumoniae* é capaz de converter a maior parte do substrato a 2,3-BD sem a geração de muitos subprodutos, facilitando a recuperação do produto, além de produzir o dobro de quantidade de 2,3-BD e obter rendimentos significativamente mais elevados do que a bactéria *P. polymyxa* (LEDINGHAM e NEISH, 1954). Se o melhoramento genético desse microrganismo se tornar desejável, sua semelhança com *Escherichia coli* pode se revelar uma vantagem fortuita. *K. pneumoniae* GT1 é capaz de converter glicerol em 2,3-BD sob condições de microaerofilia e baixo pH às custas da produção de 1,3-propanodiol (BIEBL, ZENG e DECKWER, 1998). Também foi demonstrado que é capaz de converter todos os açúcares presentes em hidrolisados de celulose e hemicelulose em 2,3-BD (YU

e SADDLER, 1982a). No entanto, a patogenicidade da infecção oportunista causada por espécies encapsuladas de *Klebsiella* é um fator indesejável na aplicação dessa espécie para a produção de 2,3-BD em larga escala (CHANDEL, SINGH e VENKATESWAR, 2010).

Klebsiella oxytoca é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa que produz metabólitos de interesse industrial a partir de diversos substratos, como lactose (RAMACHARDAN et al., 1990), glicose (WONG et al., 2014), xilose (JI et al., 2009), sacarose (SILVEIRA, 1991) e glicerol (YEN et al., 2014). Independente do substrato, durante o processo fermentativo, *K. oxytoca* excreta 2,3-butanodiol, etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico e ácido succínico, além de gás carbônico e hidrogênio (BRISSE et al., 2006). Os melhores rendimentos para 2,3-butanodiol, em escala industrial, foram relatados em cultivos de *K. oxytoca* em regime descontínuo e descontínuo alimentado, podendo alcançar entre 80 % e 90 % de rendimento final do produto (PARK et al., 2013).

Paenibacillus polymyxa é uma bactéria gram positiva, anaeróbica facultativa, sendo uma das poucas espécies de *Bacillus* capaz de crescer em condições anaeróbicas, além do histórico interesse em sua utilização para produção de 2,3-BD por via fermentativa, já que é considerada uma espécie não-patogênica. Ela é capaz de produzir a forma isomérica (R,R)-2,3-butanodiol pura, empregada na indústria como anti-congelante. A maior produção de 2,3-BD por *P. polymyxa* foi obtida a partir de glicose e de sucrose como substratos (NAKASHIMADA et al., 2000).

É importante salientar que a maioria dos microrganismos empregados para a produção de 2,3-BD pertencem à classe de risco 2, portanto, podem ser considerados patogênicos, como é o caso, por exemplo, de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter aerogenes*. A fermentação em escala industrial requer obediência aos regulamentos de segurança, de forma que microrganismos pertencentes a essa classe de risco são indesejados. Assim, há uma necessidade urgente na obtenção de microrganismos pertencentes à classe de risco 1, isto é, não patogênicos. Há relatos destes microrganismos como produtores de 2,3-butanodiol, no entanto, a eficiência da produção de 2,3-BD pela maioria dessas espécies é extremamente baixa, de modo que o seu emprego não é economicamente viável (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). No entanto, espécies do gênero *Bacillus*, por apresentarem bons rendimentos de produção de 2,3-BD e, em sua grande maioria, serem consideradas microrganismos de classe de risco 1, como

é o caso de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Paenibacillus polymyxa*, por exemplo, podem ser vistas como uma alternativa promissora para esse problema.

Outro aspecto importante a ser considerado é a relação direta entre a espécie utilizada e o isômero de 2,3-butanodiol sintetizado. Diferentes microrganismos produzem diferentes isômeros, mas normalmente uma mistura de dois isômeros é formada (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). Espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter* são membros da família Enterobacteriaceae, de forma que, geralmente, produzem os isômeros dextrógiros e meso. As espécies de *Bacillus*, por outro lado, tendem a produzir as formas isoméricas levógira e meso. *Paenibacillus polymyxa* é uma das poucas espécies que apenas produz o isômero levógiro sob fermentação anaeróbica. Demais espécies estão relatadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Produção de diferentes isômeros de 2,3-butanodiol a partir de diferentes espécies bacterianas (JI; HUANG; OUYANG, 2011).

Espécie	Estereoisômeros formados	Substrato	Método	Concentração produzida (g·L ⁻¹)	Produtividade e (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Rendimento (g·g ⁻¹)	Referência
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Meso, L-(+)-	Glicose	Batelada alimentada	150,0	4,21	0,43	MA et al., (2009)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Meso, L-(+)-	Glicose	Batelada alimentada	130,0	1,64	0,48	JI et al., (2010)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Meso, L-(+)-	Glicose	Batelada alimentada	110,0	5,40	0,49	ZENG et al. (1991)
<i>Serratia marcescens</i>	Meso	Sucrose	Batelada alimentada	152,0	2,67	0,41	ZHANG et al., (2010)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	D-(-)	Frutose	Batelada	36,9	0,88	0,50	GAO et al., (2010)
<i>Bacillus licheniformis</i>	D-(-), Meso	Glicose	Incubadora de agitação orbital	8,7	0,47	0,12	NILEGAONKAR et al., (1992)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	D-(-), Meso	Glicose	Batelada	33,0	-	0,33	ALAM et al. (1990)
<i>Bacillus subtilis</i>	D-(-), Meso	Glicose	Batelada	2,5	0,33	0,38	MOES et al. (1985)

2.5 *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis é uma bactéria gram-positiva, em forma de bastonete, que está amplamente distribuída na natureza, mas é encontrada principalmente no solo e em penas de aves. É capaz de produzir esporos que apresentam resistência a condições ambientais adversas e que podem ser viáveis por longos períodos (WECKE et al., 2006). É uma bactéria classificada como classe de risco 1, ou seja, é não patogênica para humanos e plantas, e considerada como GRAS (“*Generally Recognized as Safe*”) pela

Food and Drug Administration (FDA) e, por conta disso, apresenta grande atrativo industrial (SCHALLMEY, SINGH e WARD, 2004).

Jurchescu et al. (2013) utilizaram culturas de *Bacillus licheniformis* DSM 8785 livres e imobilizadas para a produção de 2,3-BD. Em experimentos em batelada, com o microrganismo livre, a concentração máxima de 2,3-BD obtida foi de $72,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a partir de $180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose após 86 h. O rendimento foi de $0,42 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e a produtividade foi de $0,86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Em um processo de batelada alimentada, a produção de 2,3-BD aumentou para $144,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com produtividade de $1,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Ademais, em experimentos de batelada e de batelada alimentada com células imobilizadas na forma de LentiKats[®], em que as células imobilizadas apresentaram elevada atividade e estabilidade, a concentração de 2,3-BD produzida, bem como os rendimentos e produtividades foram semelhantes aos obtidos por células livres.

Li et al. (2013) empregaram uma linhagem termófila de *Bacillus licheniformis*, isolada a partir de amostras de solo em seus estudos. Os resultados de otimização das condições de operação indicaram que a maior produção de 2,3-BD foi obtida quando a temperatura foi $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a concentração inicial ótima de glicose foi entre $64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7, em experimentos com fermentação descontínua. As vantagens de se empregar uma linhagem bacteriana termófila, com temperatura ótima de fermentação de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, estão relacionadas com a diminuição dos potenciais riscos de contaminação, normalmente presentes em fermentações conduzidas em temperaturas de 30 a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e podendo, eventualmente, operar sem esterilização, o que diminui o custo do processo, além da maior eficiência de fermentação quando o substrato é composto por lignocelulose.

Li et al. (2014) utilizaram a linhagem *B. licheniformis* X10, também termofílica, para a produção de 2,3-BD a partir de xilose proveniente do hidrolisado de palha de milho em um processo de fermentação em batelada alimentada. A concentração inicial de xilose foi de $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e o pH do meio foi mantido em 7. Quando a concentração de xilose tornava-se inferior a $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, aproximadamente $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose eram adicionadas ao meio. O substrato foi consumido rapidamente nas 48 primeiras horas, com produção de 2,3-butanodiol de $57,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e produtividade de $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. No término da fermentação, $87,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,3-BD foi produzido a partir de $195 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose, com rendimento de $94,6 \%$ e produtividade de $1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Além disso, essa espécie apresentou alta tolerância aos inibidores de fermentação presentes no hidrolisado lignocelulósico.

Nilegaonkar et al. (1992) empregaram *Bacillus licheniformis* para a produção de 2,3-butanodiol a partir de glicose. Em cultivo aerado, a máxima concentração de 2,3-BD foi de 8,7 g·L⁻¹ após 72 h de cultivo, enquanto que sob atmosfera de nitrogênio a máxima produção foi de 3,2 g·L⁻¹, utilizando 20 g·L⁻¹ de glicose como fonte de carbono para ambas as temperaturas. Também foram avaliadas as dependências da produção de 2,3-BD com o pH e com a temperatura, de modo que a máxima produção desse álcool foi em pH 6,0 e 37 °C.

2.6 Condições de processo

2.6.1 Aeração

Muitas pesquisas vêm sendo feitas com o intuito de avaliar os efeitos das diferentes condições de processo sobre a produção de 2,3-butanodiol. Foi descoberto que o suprimento de oxigênio é um fator crítico que afeta o rendimento, a produtividade e a formação de subprodutos (QURESHI e CHERYAN, 1989; SILVEIRA, SCHMIDELL e BERBERT, 1993). Apesar de o 2,3-butanodiol ser um produto de metabolismo anaeróbio, foi demonstrado que a aeração aumentou a produção de 2,3-BD por *Klebsiella pneumoniae* (LEDINGHAM e NEISH, 1954). Entretanto, o aumento excessivo do suprimento de oxigênio favorece a formação de massa celular e gás carbônico em detrimento da produção de 2,3-BD (JANSEN et al., 1984). O 2,3-BD é formado, então, sob limitação de oxigênio e, conseqüentemente, sua produção é diminuída com o aumento da aeração do meio, embora o declínio do fornecimento de oxigênio possa diminuir também a taxa de conversão total, devido a concentrações celulares mais baixas (SABLAYROLLES e GOMA, 1984). Como essas informações se mostram contraditórias em relação à produção de 2,3-BD, deve-se estabelecer uma estratégia de controle de fornecimento de oxigênio adequada para garantir a produção eficiente desse álcool.

Essa contradição entre o fornecimento de oxigênio e produção de 2,3-BD foi explicada por Voloch et al. (1985). Primeiro, deve-se considerar que a maioria dos estudos realizados sobre a produção de 2,3-BD empregam bactérias das espécies *Klebsiella* e *Bacillus*, ambas anaeróbias facultativas, de modo que podem obter energia por duas vias diferentes: respiração e fermentação. Quando o fornecimento de O₂ é limitado, ambas as vias são expressas simultaneamente, de modo que o rendimento de

2,3-butanodiol depende das atividades relativas de cada via, podendo ser maximizado através da diminuição do suprimento de oxigênio, porque isso limita a respiração. No entanto, devido à diminuição do fornecimento de oxigênio, também ocorre a diminuição da biomassa celular e, por conseguinte, menos 2,3-BD é produzido. Este é o resultado de uma relação direta entre a produtividade volumétrica de 2,3-butanodiol e da concentração de biomassa. A proporção entre a oferta de gás oxigênio e o rendimento de 2,3-BD bem como de outros subprodutos pode ser analisada na Figura 4.

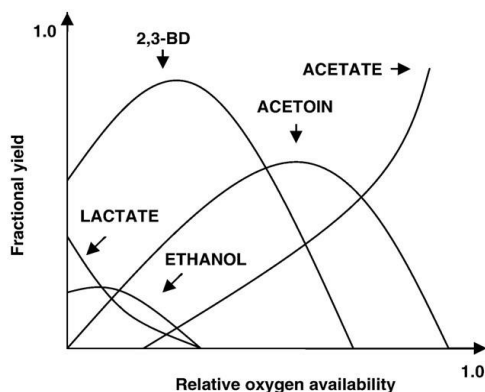


Figura 4 - O efeito do fornecimento de oxigênio no rendimento de subprodutos da fermentação por *Paenibacillus polymyxa*. (CELÍŃSKA e GRAJEK, 2009 adaptado de DE MAS et al., 1988)

Em geral, o alto fornecimento de gás oxigênio favorece a formação de gás carbônico e biomassa celular, às custas de 2,3-BD. A razão para a mudança no metabolismo de produção de biomassa para a produção de ácidos mistos é a manutenção do equilíbrio $NAD^+/NADH$. Em condições aeróbias, o $NADH$ proveniente da glicólise é regenerado através da respiração; sob condições anaeróbias, como a respiração não ocorre, a via de 2,3-BD e outras vias da fermentação servem para o mesmo propósito. Na ausência de oxigênio, o etanol e o 2,3-BD são geralmente produzidos em quantidades equimolares (VOLOCH et al., 1985), mas também há a formação de acetato, lactato e acetoína, de forma que apenas em aeração controlada, as formações de acetato e etanol podem ser evitadas e o substrato ser totalmente convertido em 2,3-BD (MADDOX, 1996; ZENG BIEBL e DECKWER, 1990), diminuindo possíveis efeitos de inibição da produção de 2,3-BD por subprodutos e facilitando a recuperação do mesmo.

Além disso, o efeito da aeração sob a produção de 2,3-BD também é importante por estar diretamente relacionado com a agitação do meio de cultivo. A agitação pode aumentar a eficiência da fermentação por possibilitar a exposição contínua de novos

substratos para a cultura e disseminação dos produtos finais do metabolismo (GARG e JAIN, 1995).

Outra correlação interessante em relação ao suprimento de oxigênio e produção de 2,3-BD refere-se a pureza óptica dos isômeros. Nakashimada, Kanai e Nishio, (1998) demonstraram que a pureza óptica do 2,3-BD produzido por *Paenibacillus polymyxa* diminuiu significativamente com o aumento da aeração durante o processo fermentativo. Com o aumento da disponibilidade de oxigênio, mais quantidade do isômero meso foi produzido. A taxa de transferência de oxigênio ótima foi avaliada em $6,7 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, mas a pureza óptica da forma isomérica (R,R)-2,3-BD decaiu de 98 % para 93 %, quando comparada com a produção sob condições anaeróbicas.

2.6.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH é um parâmetro fundamental na regulação do metabolismo das bactérias e esta influência é especialmente acentuada em processos envolvendo a formação de múltiplos sub-produtos. O pH do meio fermentativo afeta tanto a composição da biomassa quanto a natureza do metabolismo bacteriano (GARG e JAIN, 1995). Como regra geral, condições alcalinas favorecem a formação de ácidos orgânicos, com correspondente decréscimo no rendimento do 2,3-BD. Em contrapartida, em condições ácidas, a síntese de ácidos orgânicos é reduzida mais de 10 vezes, enquanto a síntese de dióis é aumentada de 3 a 7 vezes (GARG e JAIN, 1995).

A maioria dos processos de fermentação anaeróbica são acoplados com a formação de ácidos orgânicos. Assim, no decurso da fermentação, a cultura acidifica e a concentração da forma tóxica não dissociada dos ácidos aumenta até um patamar em que o crescimento de biomassa celular cessa e a cultura é inativada por seus próprios produtos (BIEBL et al., 1998). Alguns microrganismos desenvolveram certas estratégias de defesa, como mudar o metabolismo para a síntese de compostos menos tóxicos, tais como álcoois e glicóis (VAN HOUDT, AERTSEN e MICHIELS, 2007). Esse fenômeno foi elucidado por Maddox (1996), que descobriu que a indução da via de produção de 2,3-BD é causada pelo acúmulo de produtos ácidos no meio de fermentação, que alteram o pH interno do microrganismo. O gradiente de pH transmembranar resultante provoca o acúmulo de acetato, que é o indutor de enzimas envolvidas na síntese de 2,3-BD. O acetato pode atuar como ativador da atividade enzimática e, nesse caso, age como indutor de três enzimas

da via de conversão do piruvato em 2,3-BD. Em altas concentrações de acetato ocorre a máxima produção de 2,3-BD e NAD e isso acontece em pH em torno de 5,8. Também foi proposto que o acetato, em sua forma ionizada, aumenta a catálise do piruvato através da indução da produção da enzima α -acetatolactato-sintase. (STORMER, 1968). Assim, a redução do pH da cultura provoca um aumento no gradiente de pH e a produção de 2,3-butanodiol ocorre antes que o pH externo seja demasiado ácido e a cultura seja inativada.

Geralmente, na faixa de pH ótimo, a eficiência metabólica do microrganismo será máxima. Esse valor é dependente do substrato e do microrganismo envolvido, variando normalmente entre 5,0 e 6,0 (PIRT, 1975; CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). Nessa faixa, a enzima acetolactato-descarboxilase atua em seu pH ótimo e controla a fermentação (KIM et al., 2013). Em condições extremas, com pH abaixo de 4 ou superior a 8, a síntese de 2,3-BD é desfavorável, já que a atividade de uma ou mais enzimas é reduzida e outras vias metabólicas são utilizadas pelo microrganismo para obter energia (ROMIO, 2014).

Em muitos casos, esse efeito é nitidamente percebido. Durante o crescimento exponencial de *C. acetobutylicum*, ácidos acético e butírico são produzidos. Na fase estacionária, após intensa acidificação do meio, acetona, butanol e etanol são sintetizados (LÓPEZ-CONTRERAS et al., 2000). Esse fenômeno também foi observado em espécies de *Klebsiella*, em que em pH neutro produzem ácido acético e etanol, mas em pH inferior a 6,0, 2,3-BD é sintetizado (BIEBL et al. 1998). Em *K. pneumoniae*, em pH aproximadamente 5,5, em torno de 10 % do substrato (glicerol) foi destinado a produção de 2,3-BD e 44 % de 1,3-propanodiol, o que é coerente, uma vez que 1,3-PD é produto característico da fermentação de glicerol (MENZEL, ZENG e DECKWER, 1997).

Ademais, também já foi definida a relação entre substrato e pH ideal. Para muitos substratos, dentre eles hidrolisado de madeira, a faixa de pH ótimo varia entre 6,0 e 6,2 (GROVER, GARG e VERMA, 1990). Raspoet et al. (1991) relataram que a produção máxima de 2,3-BD a partir de glicose por *Bacillus licheniformis* deu-se em pH aproximadamente 6,0. Em contrapartida, a faixa de pH de 5,0 a 5,2 mostrou-se a melhor para a produção desse álcool quando xilose foi utilizada como fonte de carbono (TSAO, 1978). Jansen et al. (1984) observaram crescimento bacteriano e rendimento de 2,3-BD máximos em pH 5,2 sob condições aeróbicas e 10 % de xilose como fonte de carbono, mas o crescimento cessou em pH inferior a 4,2.

Voloch et al. (1985) determinaram que a faixa de pH ótimo para a produção de 2,3-BD por *K. oxytoca* é de 5,0 a 6,0. Para *E. aerogenes*, o pH ideal é 6,0 (CONVERTI, PEREGO e DEL BORGHI, 2003). Perego et al. (2000) utilizaram cultivos de *Enterobacter aerogenes* e avaliaram faixas de pH de 4,0 a 8,0, destacando que o intervalo de pH favorável para o crescimento bacteriano foi de 5,5 a 6,5. Variações de pH fora dessa faixa modificaram os sítios ativos das enzimas acetil-lactato descarboxilase e da acetil-lactato sintase.

2.6.3 Temperatura

A eficiência do processo está estritamente relacionada com a temperatura devido à forte dependência da atividade enzimática e da manutenção celular com esse parâmetro (GARG e JAIN, 1995). Geralmente, a faixa de temperatura de 30 °C a 35 °C deverá ser ótima para a produção de 2,3-butanodiol através da fermentação bacteriana, uma vez que esta é a faixa de rendimento máximo de biomassa; passando da condição aeróbia para a de microaerofilia nesta faixa de temperatura, produtos fermentativos, ao invés de biomassa, serão obtidos (PERLMAN, 1944). Como a produção de 2,3-BD ocorre geralmente associada ao crescimento, a condição para a produção máxima de produto tem que ser aproximadamente a mesma que a do rendimento máximo de biomassa (GARG e JAIN, 1995). Acima da temperatura ideal, a degradação celular provavelmente torna-se dominante em relação ao crescimento; em contrapartida, abaixo da temperatura ideal, a regulação e a taxa de metabolismo podem falhar (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

Converti, Perego e Del Borghi (2003) estudaram o efeito da temperatura na produção de 2,3-BD por *Bacillus licheniformis*. Os autores aumentaram progressivamente a temperatura de 34 °C até 40 °C e notaram que até 37 °C houve um aumento na concentração final de 2,3-butanodiol, bem como na produtividade volumétrica média e máxima. Em temperaturas maiores, observou-se a queda na produção de 2,3-BD e na produtividade.

Pirt e Callow (1958) demonstraram que a temperatura ótima de formação do produto 2,3-BD e do crescimento de *Klebsiella pneumoniae* diferem. Em um trabalho com processo contínuo e sacarose como substrato, demonstraram que o intervalo de 35 °C a 37 °C é o mais adequado para a formação desse álcool, mas a melhor temperatura para crescimento bacteriano é de 30 °C. Biebl et al. (1998) descobriram que, em culturas

de *K. pneumoniae*, diminuindo a temperatura de 35 °C para 30 °C, houve a redução da produção de etanol em favor da formação de 2,3-BD. No entanto, a maioria dos trabalhos que envolvem a produção de 2,3-BD por *K. pneumoniae* são realizados a 37 °C (SILVEIRA et al., 1998; PRATA, 1997; MENZEL et al., 1996).

Para *Klebsiella oxytoca*, a faixa de temperatura de 30 a 38 °C é considerada como favorável para o crescimento bacteriano e produção de 2,3-BD (ANVARI e MOTLAGH, 2011). Jansen e Tsao (1983) concluíram que a temperatura ótima para o crescimento e síntese de 2,3-BD por *K. oxytoca* é de 37 °C. Em fermentação descontínua com *Enterobacter aerogenes*, a temperatura de 39 °C foi considerada como ideal (CONVERTI et al., 2003). Para *P. polymyxa*, em fermentação descontínua ou fermentação descontínua com agitação, a temperatura foi fixada em 30 °C (NAKASHIMADA et al. 2000). No entanto, como cada microrganismo apresenta uma temperatura ideal diferente, esse valor deve ser estabelecido individualmente para cada microrganismo e substrato utilizado (CELÍNSKA e GRAJEK, 2009).

2.6.4 Concentração inicial de substrato

Na maioria dos processos de produção de 2,3-butanodiol, as concentrações iniciais de açúcares variaram na faixa de 5 % a 10 % em massa (GARG e JAIN, 1995). Essa baixa concentração pode ser causada pelo fato de que, com o aumento da concentração de matéria-prima, ocorre o aumento da concentração de substâncias tóxicas presentes nos substratos, o que é particularmente evidenciado em hidrolisados de madeira (LONG e PATRICK, 1963). Em meios sintéticos suplementados com açúcares puros, como a glicose, não há compostos inibitórios presentes no substrato, de modo que concentrações iniciais de glicose de até 200 g·L⁻¹ podem ser fermentadas e o aumento da concentração inicial geralmente resulta em melhores rendimentos de 2,3-BD (CELÍNSKA e GRAJEK, 2009).

No entanto, é sugerido que a influência do tipo de substrato e de sua concentração inicial na produção de 2,3-BD seja dependente da espécie. A concentração inicial de glicose e xilose que gera os maiores valores de produtividade é de 100 g·L⁻¹, em processos aerados e sistema descontínuo utilizando *Klebsiella oxytoca* (JANSEN et al. 1984). Silveira (1991) encontrou o mesmo valor, trabalhando com sacarose como substrato em sistema descontínuo, empregando *K. pneumoniae*. Em condições de aeração finita, uma

alta concentração de açúcar, excedendo $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, foi relatada como inibitória para a produção de 2,3-BD (YU; SADDLER, 1983). Resultados obtidos com *E. aerogenes* indicaram que a concentração inicial de glicose quase não influencia a produção molar de 2,3-BD (CONVERTI e PEREGO, 2002). De Mas et al. (1988), trabalhando com *P. polymyxa*, descobriram que a inibição do crescimento bacteriano ocorreu em concentrações de substrato superiores a $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Biebl et al. (1988) relataram que o excesso de glicerol na cultura de *K. pneumoniae* não melhorou a produtividade de 2,3-BD, sendo que esta cresceu em cultura contínua com $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicerol. Long e Patrick (1963) reportaram que *K. pneumoniae* foi capaz de utilizar açúcares em concentrações de 5 % a 15 % em meios complexos de fermentação, contendo vários tipos de materiais residuais. A concentração inicial de substrato foi de 5 % a 10 % quando foram utilizados hidrolisados de madeira e de resíduos agrícolas. Berbert-Molina (1995) também avaliou a influência da concentração de substrato em relação à produção de 2,3-BD utilizando *K. pneumoniae*, variando a concentração inicial de $24,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ até $181 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os resultados indicaram que, conforme se aumenta a concentração do substrato, obtêm-se valores mais elevados de 2,3-BD, de modo que a máxima produção deste álcool ocorreu com $181 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, embora o maior valor de produtividade foi obtido com $105 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.6.5 Cobalto

Outro aspecto importante refere-se ao conteúdo do meio de cultivo, que exerce grande influência na produtividade microbiana. Petrov e Petrova (2009) testaram numerosas variações de elementos-traço no meio de cultivo para a produção de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol por *Klebsiella pneumoniae* utilizando glicerol residual como substrato. O íon cobalto (Co^{+2}) foi avaliado como a substância mais importante. Após a exclusão de Co^{+2} do meio de cultivo, a produtividade de 2,3-BD foi acrescida em 32 % às custas de um decréscimo na produção de 1,3-propanodiol. Isso é justificado pelo fato de que a enzima 1,3-propanol desidrogenase é uma enzima dependente da vitamina B12, exigindo Co^{+2} como co-fator para a sua ação. Em contrapartida, a enzima que converte acetoína em 2,3-butanodiol, acetoína redutase, tem como co-fator NAD^+ , não sofrendo com a exclusão do íon cobalto do meio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes químicos e substratos

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho apresentavam grau de pureza analítico ou de cromatografia e foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

O glicerol residual foi fornecido por uma unidade fabril de produção de biodiesel localizada no município de Canoas, no Rio Grande do Sul. A composição consiste (em percentual mássico): 82,97 % de glicerol, 10,62 % de umidade, 5,72 % de NaCl, 0,75 % de monoacilgliceróis (MONGs), além de concentrações-traço de cinzas e metanol residual do processo de fabricação. A produção de biodiesel nessa instalação é obtida através da transesterificação de óleo de soja por rota exclusivamente metílica.

O permeado de soro de leite em pó foi adquirido da empresa Sooro, localizada no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná. O produto apresentava, em percentual mássico, 92,43 % de lactose, 0,88 % de umidade, 1,77 % de proteína, 4,92 % de sais minerais e 1,2 % de ácido láctico. A fim de evitar degradação do substrato, este permaneceu estocado em *freezer*, a $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 Microrganismos e meio de estoque

Os microrganismos utilizados nesse trabalho foram obtidos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pertencente à Fundação Oswaldo Cruz.

As linhagens utilizadas neste trabalho foram *Paenibacillus polymyxa* (INCQS 00443, lote 0408443), *Bacillus subtilis* (INCQS 00328, lote 0895328) e *Bacillus licheniformis* (INCQS 00418, lote 1200418).

Estoques destas bactérias são mantidos no acervo de culturas microbiológicas do laboratório BiotecLab (UFRGS, Porto Alegre - RS) em meio Luria-Bertani (LB) em 50 % de glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Preparo de inóculos

Placas com células viáveis foram produzidas a partir do banco de células através do crescimento das amostras estocadas em meio de cultivo previamente otimizado (ROSSI et al., 2013) a 37 °C e 150 rpm em incubadora de agitação orbital até densidade ótica (DO) igual a 1 a 600 nm, procedendo-se então o plaqueamento em meio ágar LB. O meio de cultivo para os microrganismos foi composto por 5 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g·L⁻¹ de peptona, 7 g·L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 7 g·L⁻¹ K₂HPO₄, 1 mL de uma solução de elementos traço (contendo 0,1 g·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 0,06 g·L⁻¹ H₃BO₃, 0,0037 g·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 0,2 g·L⁻¹ CoCl₂·6H₂O, 0,025 g·L⁻¹ NiCl₂·6H₂O, 0,035 g·L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O, 0,14 g·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, e 0,9 mL HCl 37 %), e 50 g·L⁻¹ de glicose.

Inóculos foram preparados através da transferência de uma alçada de colônias das placas geradas a partir do banco de células (armazenadas a 4 °C e refeitas a cada 4 semanas a fim de assegurar a viabilidade celular) para Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultivo citado acima, permitindo crescimento por 12 h, em incubadora de agitação orbital. Subcultivos eram então realizados a partir deste, permitindo crescimento até DO igual a 1 a 600 nm.

O crescimento celular foi acompanhado através de leituras de densidade óptica a 600 nm com espectrofotômetro (Amersham Biosciences, modelo Ultrospec 3100 pro) utilizando como controle o meio de cultivo previamente descrito sem a presença de células. As leituras foram realizadas em um comprimento de onda de 600 nm.

3.4 Produção de 2,3-butanodiol através de diferentes substratos

Para os experimentos em que o objetivo foi testar qual o melhor substrato para a produção de 2,3-BD, foram preparados meios de cultivo com os mesmos componentes que o utilizado para o preparo de inóculo, variando apenas a fonte de carbono, de modo que foram utilizados 60,26 g·L⁻¹ de glicerol residual e 54,09 g·L⁻¹ de permeado de soro de leite em pó, em que os valores foram corrigidos em relação ao grau de pureza do glicerol e da lactose presentes no substrato, respectivamente, a fim de alcançar uma concentração de substrato de 50 g·L⁻¹ em todos os casos. As três espécies de bactérias foram testadas nos três diferentes substratos, de modo que uma alçada de colônias das placas geradas a partir do banco de células foram transferidas a Erlenmeyers de 500 mL

contendo 200 mL do meio de cultivo, permitindo crescimento por 12 h, em incubadora de agitação orbital.

3.5 Otimização da produção de 2,3-butanodiol

Um delineamento composto central (DOE) de três variáveis foi realizado a fim de obter as condições ótimas para conversão de glicose a 2,3-butanodiol. As variáveis analisadas foram temperatura, concentração de glicose e pH iniciais. O delineamento constituiu-se de oito pontos fatoriais, seis pontos axiais (dois pontos axiais no eixo da variável) e uma triplicata do ponto central. A equação polinomial de segunda ordem para as variáveis é dada:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

em que Y é a variável de resposta, β_0 a constante, β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes para o efeito linear, quadrático e de interação entre variáveis, respectivamente e X_i e X_j o nível codificado das variáveis x_i e x_j , respectivamente. A equação quadrática acima foi utilizada para plotar as superfícies de todas as variáveis.

O delineamento experimental foi realizado através do *software* Statistica 10 (Statsoft Inc., USA).

Meios de cultivos foram preparados com as concentrações de glicose e pH indicados pelo planejamento composto central, em que o pH foi ajustado com ácido fosfórico 1 M e hidróxido de sódio 1 M e seu valor foi averiguado com a utilização de pHmetro. Posteriormente, inóculos foram transferidos a esses meios de cultivo, em Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultivo citado, permitindo crescimento por 12 h, em incubadora de agitação orbital, em que a temperatura foi ajustada de acordo com o valor sugerido pelo planejamento composto central (Tabela 3).

O delineamento experimental e a análise dos resultados foram realizados utilizando o *software* Statistica 10 (Statsoft, USA). A significância dos coeficientes de regressão e as probabilidades associadas, $p(t)$, foram determinadas utilizando teste t-Student; a significância da equação de modelo de segunda ordem foi determinada utilizando teste F de Fischer. A análise estatística do modelo foi feita sob a forma de análise de variância (ANOVA). A variância explicada pelo modelo foi dada pelo

coeficiente de determinação múltipla, R^2 e o modelo quadrático foi representado por superfície de resposta (3D). A influência do íon cobalto na produção de 2,3-butanodiol foi avaliada através dos testes de Fischer e t-Student. Os dados do planejamento composto central foram analisados a um nível de significância de 10 %, ao passo que a análise da influência do íon cobalto foi avaliada a um nível de significância de 5 %.

3.6 Experimentos em Biorreator

Experimentos em batelada foram realizados em fermentadores do tipo tanque-agitado de 2 L de volume útil (modelo Biostat B da B. Braun Biotech International, Alemanha) completamente equipados com controle de pH, temperatura, agitação (duas turbinas contendo seis lâminas chatas), aeração e fluxo. As condições de aerobiose foram asseguradas através do borbulhamento de ar filtrado no meio de cultivo durante toda a operação do fermentador. As condições de operação foram de 36,8 °C, agitação variável para auxiliar na obtenção da aeração desejada e o pH foi mantido no valor de 7,85 utilizando-se NaOH 10M e H₃PO₄ 1M como soluções de base e ácido, respectivamente.

O meio de cultivo de fermentação é o mesmo descrito no item 3.3 para o crescimento dos inóculos, variando apenas a concentração de glicose para 37,21 g·L⁻¹, valor otimizado conforme o planejamento de experimentos. Os fermentadores foram inoculados a uma fração volumétrica de 10 % com um cultivo de 12 h de crescimento. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

3.7 Métodos Analíticos

A composição do meio de cultivo foi analisada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) através de equipamento da marca Shimadzu equipado com detector de índice de refração (RID-10A). A coluna utilizada foi Aminex HPX-87H (300×7,8 mm, Bio-Rad, EUA) e como fase móvel uma solução H₂SO₄ 0,005 mol·L⁻¹ alimentada a 0,8 mL·min⁻¹. A temperatura da coluna foi controlada a 65 °C. As amostras de cultivo foram preparadas para cromatografia por centrifugação a 3000 × g por 15 min a fim de precipitar as células em suspensão, procedendo-se com filtração da porção sobrenadante utilizando membranas de acetato de celulose (tamanho de poro de 0,22 µm; Sartorius, Alemanha). Para todas as análises por HPLC, padrões de 2,3-BD e glicose com

grau de pureza de cromatografia (superior a 99,5 %) foram utilizados.

A concentração de biomassa ao longo do processo fermentativo foi determinada através do método gravimétrico de peso seco, o qual foi sempre realizado em duplicatas. Para as análises do planejamento de experimentos, no entanto, um método gravimétrico rápido foi utilizado. Essas amostras eram centrifugadas como previamente descrito e, então, a biomassa sedimentada era espalhada em filtros de papel (Whatman, ref. 1001-090), sendo tal conjunto rapidamente seco pela utilização de um analisador de umidade (Ohaus MB-35), o qual emprega lâmpada halógena como fonte de calor.

3.8 Obtenção de parâmetros cinéticos

A velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi determinada através da regressão linear dos dados obtidos ao plotar-se a variação da concentração da biomassa (em escala logarítmica natural) contra o tempo. Tal valor correspondeu ao coeficiente angular da reta obtida.

A conversão de substrato a biomassa ($Y_{x/s}$) foi obtida através da regressão linear ao plotar-se a variação de concentração de biomassa contra o consumo de glicose. Tal valor correspondeu ao coeficiente angular da reta obtida.

Os valores de conversão de substrato a produtos ao longo dos experimentos foram obtidos pela divisão da concentração acumulada do produto pelo valor calculado do consumo de substrato em um dado período de tempo.

Os valores de produtividades volumétricas foram obtidos ponderando a concentração total de produto formado pelo tempo necessário para obtê-lo.

4. RESULTADOS

4.1 Escolha do microrganismo e da fonte de carbono

Bactérias heterotróficas necessitam de uma fonte de carbono orgânica para o crescimento e metabolismo celular, sendo que a mais comum são os carboidratos, particularmente, D-glicose. Entretanto, qualquer composto natural e muitos sintéticos podem ser utilizados por microrganismos, de modo que essa versatilidade é de grande importância, permitindo o emprego de microrganismos numa extensa série de transformações úteis ao homem (BORZANI, et al., 2001). Assim, foram conduzidos experimentos para avaliar a possibilidade de diferentes espécies de *Bacillus* utilizarem, além da glicose, fontes de carbono alternativas provenientes de resíduos industriais, como o glicerol de baixo grau de pureza, oriundo da produção de biodiesel, e permeado de soro de queijo para a produção de 2,3-butanodiol. Os resultados estão exibidos na Tabela 2.

As espécies *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus polymyxa* foram incapazes de consumir satisfatoriamente qualquer uma das fontes de carbono utilizadas e de produzir 2,3-butanodiol. Apenas a espécie *Bacillus licheniformis* foi capaz de produzir 2,3-BD a partir de glicose, entretanto, em concentrações baixas. Desse modo, a otimização das condições de processo foi necessária.

Tabela 2 - Produção de 2,3-BD e de biomassa por diferentes microrganismos a partir de diferentes fontes de carbono.

Microrganismo	Fonte de carbono	Consumo da fonte de carbono (g·L ⁻¹)	Produção de 2,3-BD (g·L ⁻¹)	Formação de biomassa (g·L ⁻¹)
<i>Bacillus subtilis</i>	Glicose	18,21 ± 1,21	-	1,6 ± 0,2
	Glicerol	24,86 ± 2,36	-	2,1 ± 0,7
	Permeado de soro de queijo	0,0	-	2,0 ± 0,2
<i>Bacillus licheniformis</i>	Glicose	26,34 ± 0,39	2,53 ± 0,16	1,7 ± 0,2
	Glicerol	20,60 ± 3,92	-	1,5 ± 0,1
	Permeado de soro de leite em pó	0,0	-	1,8 ± 0,3
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Glicose	19,22 ± 11,85	-	1,2 ± 0,1
	Glicerol	21,08 ± 7,69	-	1,2 ± 0,1
	Permeado de soro de leite em pó	0,0	-	1,7 ± 0,3

4.2 Planejamento de Experimentos

O planejamento composto central foi realizado a fim de obter valores de pH inicial, temperatura e concentração inicial de fonte de carbono (glicose) que conduzissem a resultados otimizados de produção de 2,3-butanodiol para posterior realização de experimentos em batelada. Um delineamento composto central de três variáveis foi realizado e as variáveis e seus valores codificados e não-codificados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Variáveis testadas e seus níveis no planejamento composto central.

Variáveis	Nome	Variáveis codificadas				
		-1,68	-1	0	1	1,68
pH	X ₁	3,63	5	7	9	10,36
Temperatura (°C)	X ₂	31,95	34	37	39	42,04
Concentração inicial de glicose (g·L⁻¹)	X ₃	4,77	15	30	45	55,22

A Tabela 4 apresenta os 17 tratamentos obtidos para as três variáveis, cada uma a cinco níveis. O delineamento constituiu-se de oito pontos fatoriais, seis pontos axiais (dois pontos axiais no eixo da variável) e uma triplicata do ponto central.

Tabela 4 – Delineamento experimental e resultados do Planejamento Composto Central.

Tratamento	pH (X ₁)	Temperatura	Concentração	Y _{2,3-BD} (g·g ⁻¹)
		(°C) (X ₂)	inicial de glicose (g·L ⁻¹) (X ₃)	
1	-1,00	-1,00	-1,00	0,050
2	-1,00	-1,00	1,00	0,000
3	-1,00	1,00	-1,00	0,252
4	-1,00	1,00	1,00	0,000
5	1,00	-1,00	-1,00	0,195
6	1,00	-1,00	1,00	0,280
7	1,00	1,00	-1,00	0,159
8	1,00	1,00	1,00	0,257
9	-1,68	0,00	0,00	0,000
10	1,68	0,00	0,00	0,098
11	0,00	-1,68	0,00	0,287
12	0,00	1,68	0,00	0,198
13	0,00	0,00	-1,68	0,216
14	0,00	0,00	1,68	0,539
15	0,00	0,00	0,00	0,372
16	0,00	0,00	0,00	0,278
17	0,00	0,00	0,00	0,270

A análise estatística dos dados obtidos no planejamento composto central (Tabela 55) levou à exclusão do efeito linear da temperatura (X₂), uma vez que apresentou valor de p calculado consideravelmente superior ao intervalo de confiança de 10 %. A tabela ANOVA resultante é apresentada abaixo.

Tabela 5 – Análise estatística do planejamento composto central realizado (avaliada a intervalo de confiança de 90 %). Os valores de X_1 referem-se ao pH, de X_2 referem-se à temperatura e de X_3 à concentração inicial de glicose.

Variável	Efeito	<i>p</i>
Efeitos Lineares		
X_1	0,1023	0,0134
X_3	0,0477	0,1792
Efeitos Quadráticos		
X_1	-0,1546	0,0025
X_2	-0,0433	0,2523
X_3	-0,0760	0,0658
Interações		
X_1X_2	-0,0081	0,8529
X_1X_3	0,0610	0,1876
X_2X_3	0,0122	0,7804

Segundo a Tabela 5, mostraram-se significativas as contribuições linear e quadrática do pH e a contribuição quadrática da concentração inicial de glicose. Dessa forma, obteve-se a equação representativa do modelo obtido para a conversão de glicose a 2,3-butanodiol:

$$Y = 0,246 + 0,102 * X_1 - 0,08 * X_3^2 - 0,154 * X_1^2 \quad (2)$$

O modelo apresentou coeficiente de regressão múltipla $R^2 = 0,81$ e sua significância foi comprovada pelo teste F-Fischer ($F_{\text{calculado}} = 4,256 > F_{\text{tabelado}} = 3,438$). A Figura 5 apresenta superfície de resposta para a conversão de glicose a 2,3-butanodiol em função das variáveis pH, temperatura e concentração inicial de glicose.

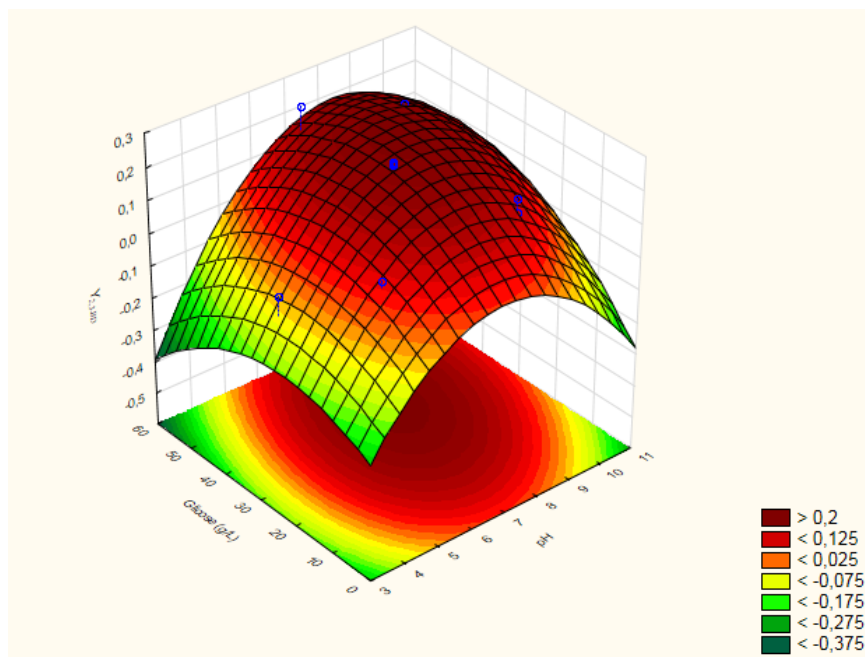


Figura 5 – Superfície de resposta para a conversão de glicose a 2,3-butanodiol em função da variação de pH, temperatura e da concentração de glicose

Através do modelo quadrático foram obtidos os valores críticos de temperatura, pH e concentração de glicose exibidos na Tabela 6. Para tais valores, a conversão de glicose a 2,3-butanodiol prevista pelo modelo foi de $0,263 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Tabela 6 - Valores críticos do modelo quadrático obtido (resposta prevista, $Y_{2,3-BD} = 0,263$).

Variável	Valor codificado	Valor real
pH	0,425	7,85
Temperatura	-0,07	36,85
Glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,480	37,21

4.2.1 Validação do planejamento composto central

Foi realizado um experimento de validação do modelo obtido de forma análoga aos experimentos realizados no planejamento composto central. Tal experimento constituiu-se de cultivo em triplicata do microrganismo testado nas condições ótimas obtidas pelo modelo quadrático. Observou-se uma conversão média de glicose a 2,3-BD ($Y_{2,3-BD}$) de 0,25, com desvio padrão de 0,05. Em comparação ao valor previsto pelo

modelo para tal variável nas condições ótimas, de $Y_{2,3-BD} = 0,263$, a diferença observada consiste em um erro de 4,94 %. Desta forma, considera-se o modelo satisfatório.

4.3 Avaliação da presença de cobalto no meio e cultivo

Foi avaliada a influência do íon cobalto (Co^{+2}) na produção de 2,3-butanodiol. Os experimentos foram conduzidos nas condições ótimas obtidas pelo planejamento composto central, em condições análogas às anteriores, ou seja, foi permitido crescimento em incubadora de agitação orbital, com tempo de crescimento de 12 horas, em Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultivo citado, sendo que a única diferença entre a amostra 1 e a amostra 2, apresentadas na Tabela 7, é a ausência e presença do íon Co^{+2} no meio de cultivo, respectivamente.

Tabela 7 – Avaliação da presença do íon cobalto no meio de cultivo na produção de 2,3-butanodiol

	Produção de 2,3-BD (g.L⁻¹)	Consumo de glicose (g.L⁻¹)	$Y_{2,3-BD}$
Amostra 1 (sem Co^{+2})	9,05 ± 1,89	36,86 ± 0,11	0,250 ± 0,059
Amostra 2 (com Co^{+2})	10,51 ± 0,48	37,44 ± 1,15	0,286 ± 0,013

Através de análise estatística, com o teste de Fischer ($F_{calculado} = 20,37 > F_{tabelado} = 19,0$) e com o teste t-Student ($t_{calculado} = 1,02245 < t_{tabelado} = 2,1318$), comprova-se que não há diferença estatística significativa entre as duas amostras.

Mesmo não havendo diferença estatística significativa entre as amostras, decidiu-se realizar os trabalhos seguintes em batelada em meio de cultivo sem cobalto.

4.4 Experimentos em Batelada

Os experimentos em biorreator foram conduzidos com o intuito de avaliar o efeito da aeração na produção de 2,3-butanodiol. Desse modo, foram testadas três condições de

limitação de saturação de oxigênio dissolvido, a 10 %, 20 % e 30 %, em que os valores de aeração foram mantidos constantes durante as 24 horas de realização do experimento através da variação da agitação do meio de cultivo.

A partir da análise da curva de crescimento do *Bacillus licheniformis*, percebeu-se que o crescimento bacteriano estagnou e passou a haver morte celular a partir da décima primeira hora de cultivo. Desse modo, optou-se por coletar a amostra de hora em hora, a partir do instante de inoculação até 12 h de processo e, por fim, após 24 h.

A cinética de crescimento de biomassa para as três condições de limitação de oxigênio está apresentada na Figura 6.

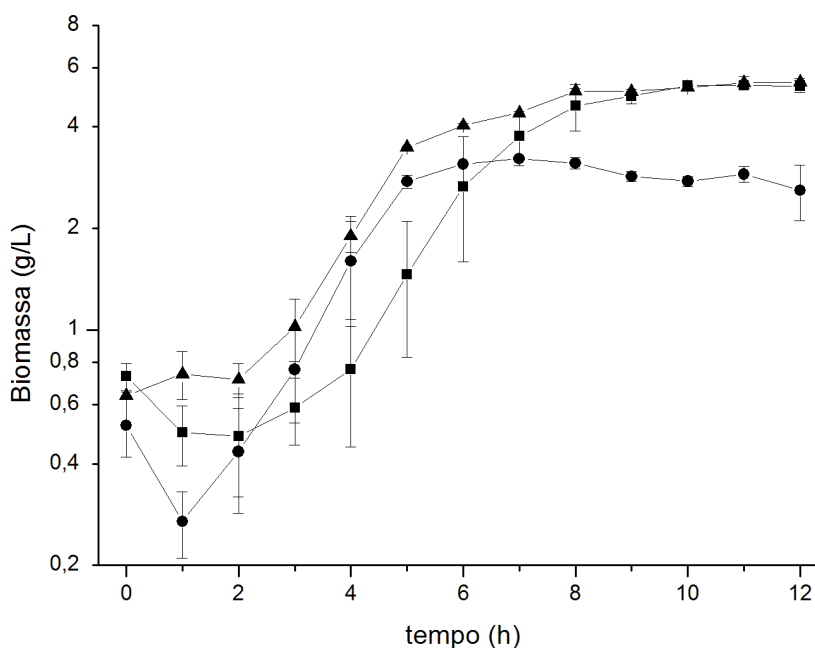


Figura 6 - Cinética de crescimento de biomassa a partir de uma concentração inicial de glicose de $37,21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em três condições de limitação de oxigênio. (-■-) 10 % de oxigênio, (-●-) 20 % de oxigênio e (-▲-) 30 % de oxigênio.

A curva de crescimento de biomassa apresenta o mesmo comportamento para as três condições de limitação de oxigênio testadas, seguindo a tendência da curva de crescimento bacteriano, em que a fase de adaptação ao meio de cultivo tem duração de aproximadamente 2 horas, seguido pelo crescimento exponencial, com duração de 6 horas e, por fim, a fase de estagnação.

Também foi avaliada a cinética de produção de 2,3-BD por *Bacillus licheniformis* para as três condições de limitação de oxigênio testadas. Os dados estão apresentados na Figura 7.

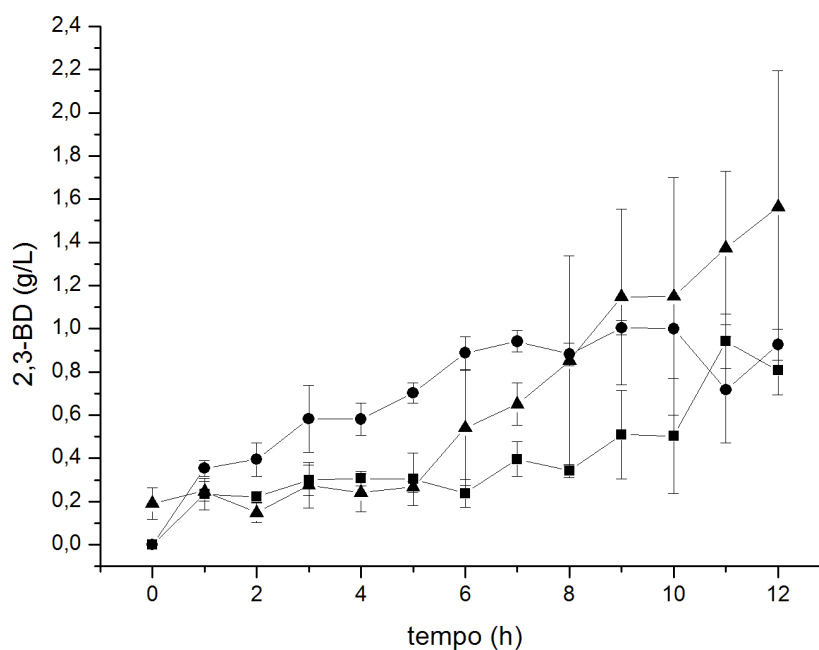


Figura 7 - Avaliação da produção de 2,3-butanodiol em um intervalo de 12 horas, para diferentes condições de limitação de oxigênio. (-■-) 10 % de oxigênio, (-●-) 20 % de oxigênio e (-▲-) 30 % de oxigênio.

A produção de 2,3-BD acompanha a cinética de crescimento bacteriano, em que a máxima conversão do álcool ocorre na fase de crescimento exponencial. Entretanto, não há diferença significativa entre as produções de 2,3-BD nas três condições de limitação de oxigênio dissolvido testadas.

Por fim, foram avaliadas as cinéticas de consumo de glicose ao longo do tempo para as três condições de limitação de oxigênio. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

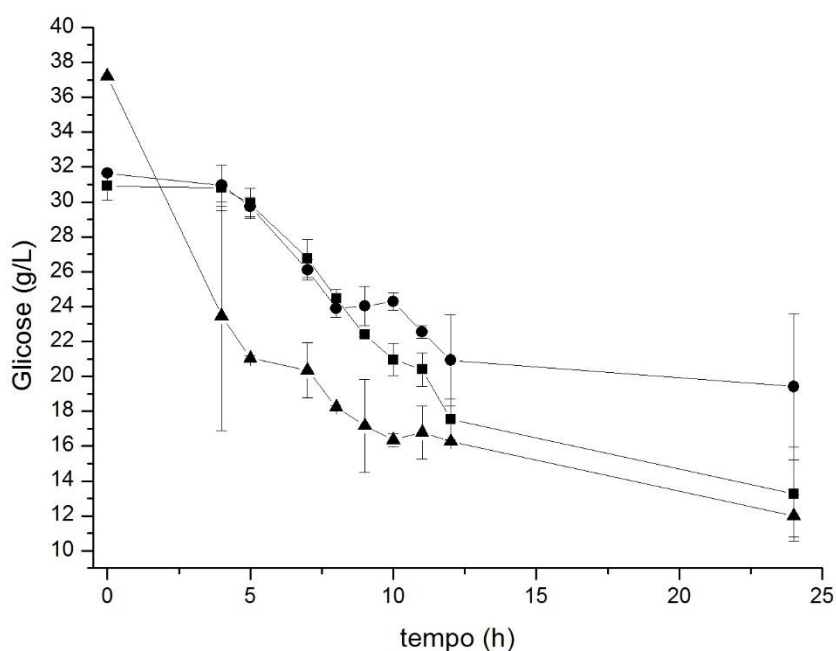


Figura 8 – Avaliação do consumo de glicose em um intervalo de 24 horas para diferentes condições de limitação de oxigênio. (■-) 10 % de oxigênio, (●-) 20 % de oxigênio e (▲-) 30 % de oxigênio.

A concentração de glicose no meio decaiu ao longo do tempo, indicando o consumo da mesma. O comportamento da curva foi o mesmo para as três condições testadas, entretanto, houve maior consumo de glicose na condição de limitação de oxigênio a 30 %, provavelmente por haver mais formação de biomassa em condições com maior suprimento de gás oxigênio.

Para a condição de limitação de oxigênio a 10 %, os parâmetros cinéticos, de consumo de substrato e conversão a produto e biomassa foram analisados. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi calculada e seu valor é de $0,60 \text{ h}^{-1}$. Partindo de uma concentração inicial de glicose de $37,21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, obteve-se um consumo final de substrato de $23,96 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, além de uma concentração de 2,3-BD de $1,35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Desse modo, a conversão de substrato a produto foi de $0,06 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. Ademais, a concentração final de biomassa foi de $5,55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, de modo que a conversão de substrato a biomassa foi de $0,23 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. Por fim, a produtividade de 2,3-butanodiol foi avaliada e seu valor foi de $0,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, considerando como tempo de operação total 12 horas, condizente com o intervalo onde houve produção de 2,3-BD.

Para a condição de limitação de oxigênio a 20 %, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi $0,67 \text{ h}^{-1}$. Utilizando a mesma concentração de glicose que na condição anterior, seu consumo final foi de $18,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com concentrações finais de 2,3-BD de $1,37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de biomassa de $3,76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Desse modo, os valores de $Y_{2,3\text{-BD}}$ e de Y_{XS} foram de $0,07 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $0,21 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Finalmente, a produtividade foi calculada e seu valor é de $0,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, considerando como tempo de operação total 12 horas.

Por fim, esses mesmos parâmetros foram avaliados para a condição de limitação de oxigênio a 30 %, de modo que o valor obtido para a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,54 \text{ h}^{-1}$, para o consumo final de glicose, partindo da mesma concentração inicial de substrato já definida, foi de $25,21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, para a concentração final de 2,3-BD foi de $1,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e para a concentração final de biomassa foi de $5,42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Desse modo, o valor de conversão de substrato a 2,3-BD foi $0,15 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e conversão de substrato a biomassa foi $0,46 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. A produtividade também foi calculada e seu valor é $0,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, também considerando como tempo de operação total 12 horas.

Estes dados estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros de cinética de crescimento, consumo de glicose e produtividade para as condições de limitação de oxigênio a 10 %, 20 % e 30 %.

	10 %	20 %	30 %
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,60 \pm 0,04	0,67 \pm 0,06	0,54 \pm 0,05
Consumo de glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	23,96 \pm 2,71	18,15 \pm 3,85	25,21 \pm 1,22
Concentração de 2,3-BD ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1,35 \pm 0,15	1,37 \pm 0,33	1,75 \pm 0,44
$Y_{2,3\text{-BD}}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,06 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,15 \pm 0,05
Concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	5,55 \pm 0,71	3,76 \pm 0,50	5,42 \pm 0,15
$Y_{x/s}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,23 \pm 0,00	0,21 \pm 0,02	0,46 \pm 0,05
Produtividade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,13 \pm 0,05

5. DISCUSSÃO

A produção de 2,3-butanodiol é dependente da linhagem bacteriana utilizada. Assim, apesar de serem testadas três espécies bacterianas relatadas na literatura como produtoras de 2,3-BD a partir de diferentes substratos, apenas a linhagem de *Bacillus licheniformis* mostrou-se produtora desse álcool a partir de glicose. A ausência de produção de 2,3-BD pelas bactérias das espécies *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus polymyxa* pode estar relacionada com a ausência das vias de conversão de glicerol, glicose e permeado de soro de leite em pó a 2,3-BD, ou seja, são incapazes de converter os substratos utilizados ao produto de interesse.

A conversão de glicose a produto inicial, em condições não otimizadas, ou seja, com 50 g·L⁻¹ de concentração de glicose inicial, pH 7,0 e temperatura 37 °C, em incubadora de agitação orbital por 12 horas foi de 0,10 g·g⁻¹. Para a maior produção de 2,3-BD por *Bacillus licheniformis* foi necessária a avaliação e otimização de alguns parâmetros e condições de processo, como pH, temperatura e concentração de glicose iniciais, além da concentração de oxigênio no meio.

As condições de microaerofilia são dependentes da espécie utilizada. A fim de avaliar essas condições, foram realizados experimentos em biorreator sob condições de limitação de oxigênio a 10%, 20 % e 30 %. A conversão média de substrato a 2,3-BD testada em incubadora de agitação orbital, em que condições de microaerofilia são reproduzidas, foi de 0,25 g·g⁻¹, ao passo que nas condições testadas de limitação de oxigênio a 10 %, 20 % e 30 % foram de 0,06 g·g⁻¹, 0,07 g·g⁻¹ e 0,15 g·g⁻¹, respectivamente. Desse modo, a estratégia de limitação de oxigênio para cultivo em batelada não foi eficiente. Apesar de 2,3-BD ser um produto de metabolismo anaeróbico, a microaerofilia aumenta a produção desse álcool. Entretanto, quando a disponibilidade de oxigênio excede a demanda, os únicos produtos formados serão biomassa e gás carbônico. Montwani et al. (1993) notaram a redução da concentração máxima de 2,3-BD em períodos de agitação superiores a 20 h, devido a maior produção de subprodutos causada pela disponibilidade superior de oxigênio.

Moes et al. (1985), utilizando *Bacillus subtilis*, descobriram um aumento na produção de acetoína quando o nível de oxigênio dissolvido foi superior a 100 ppb e a produção de 2,3-BD foi dominante quando o nível de oxigênio foi inferior a esse valor. Como a conversão de acetoína a 2,3-BD é reversível, a otimização da concentração de

oxigênio no meio é fundamental para a produção de 2,3-butanodiol. Converti et al. (2003) relataram um aumento da porcentagem de glicose dirigida à formação de biomassa de 4,5 % para 59,4 % quando a quantidade de oxigênio dissolvido aumentou para 0,72 mmol, ao passo que em condições anaeróbias 35 % da fonte de carbono foi destinada para a produção de 2,3-BD. Em condições de microaerofilia, com 46,1 mmol de O₂, a produção de 2,3-BD foi máxima e seu valor foi de 0,69 mmol. Beronio e Tsao (1993), utilizando *Klebsiella oxytoca* em fermentação descontínua, determinaram que a produção de 2,3-BD, m, quando a taxa de transferência de oxigênio foi controlada, foi 18 % mais elevada em comparação aos valores obtidos em condições não controladas de oxigênio.

Através dos resultados do planejamento composto central, o valor ótimo para a temperatura obtido é 36,8 °C. De forma geral, a faixa de temperatura ótima para a fermentação bacteriana e crescimento de biomassa é de 30 a 35 °C (Perlman et al. 1944). Considerando que a produção máxima de 2,3-butanodiol é um fenômeno dependente do crescimento bacteriano, o resultado obtido é condizente com a literatura, já que o valor ótimo para crescimento da maioria das bactérias, entre elas *Bacillus licheniformis*, situa-se em torno de 37 °C. Nilegaonkar et al. (1992) relataram que o valor ótimo de temperatura para conversão de glicose a 2,3-butanodiol por *Bacillus licheniformis* foi 37 °C. Perego, Converti e De Borghi (2003) testaram uma faixa de temperatura de 34 a 40 °C para *B. licheniformis* utilizando diferentes fontes de carbono, como glicose, hidrolisado de amido de milho e sacarose e constataram que a temperatura ideal para produção de 2,3-butanodiol também foi de 37 °C.

Outro parâmetro fundamental para a regulação do metabolismo bacteriano é o pH e seu valor ótimo inicial foi determinado como 7,85. Nos experimentos em biorreator com fermentação descontínua optou-se por manter esse valor constante a 7,85. Essa estratégia mostrou-se pouco eficiente, porque a produção de 2,3-BD foi inferior aos valores já relatados na literatura e aos valores obtidos em incubadora de agitação orbital, sem controle de pH. É descrito que condições alcalinas favorecem a formação de ácidos orgânicos às custas de 2,3-butanodiol, ao passo que em condições ácidas a formação desse álcool é suplementada. Entretanto, deve-se considerar que o pH ótimo para a produção de 2,3-BD está relacionado com o substrato e com o microrganismo utilizados.

Considerando que a produção de 2,3-BD possa ser uma estratégia de defesa de alguns microrganismos para elevar o pH do meio sob condições ácidas que podem comprometer o crescimento bacteriano, Biebl et al. (1998), empregando *Klebsiella*

pneumoniae e glicerol como substrato, compararam duas condições de pH fixos, com valores de 5,0 e 7,0 e concluíram que em menor pH há maior produção de 2,3-butanodiol. Entretanto, a maior concentração de 2,3-BD foi obtida quando o pH não foi controlado, variando continuamente para valor 7,0 quando o pH da cultura atingia 5,5. Long e Patrick (1961), Grover et al. (1990) Raspoet et al. (1991) e Nilegaonkar et al. (1992) obtiveram a máxima produção de 2,3-butanodiol a partir de glicose por *Bacillus licheniformis* em pH 6,0.

Desse modo, a fim de obter maior produção de 2,3-butanodiol em biorreator com fermentação descontínua, uma estratégia mais adequada seria permitir a acidificação do meio até um valor limite e posteriormente retornar ao valor inicial de 7,85, permitindo que o microrganismo fosse exposto à condição de pH para máxima produção do produto de interesse, mas garantindo a viabilidade e crescimento celulares através do retorno à condição de pH não prejudicial ao microrganismo. Ao avaliar o pH de 7,85 como valor ótimo de pH inicial, pode-se considerar esse resultado coerente, uma vez que fornece uma ampla faixa de pH para o crescimento e obtenção de maior biomassa. Com o crescimento bacteriano e conseqüente acidificação do meio, valores de pH mais baixos serão atingidos, possibilitando maior produção de 2,3-BD.

Analisando a condição mínima de pH de 4,77 não houve produção de 2,3-butanodiol provavelmente decorrente do não-crescimento de biomassa nessas condições. Jansen et al. (1984), ao testar a condição mínima de pH de 4,2 obtiveram o mesmo resultado para *Klebsiella oxytoca*, ou seja, há um limite mínimo de pH para que haja crescimento bacteriano e produção de 2,3-BD.

Também foi analisado o valor ideal de concentração inicial de glicose como substrato para a produção de 2,3-butanodiol, uma vez que sua definição é importante para evitar possíveis efeitos de inibição por excesso de substrato e gastos desnecessários com substrato que não será convertido a produto. Ao se utilizar um substrato puro, como glicose comercial, os efeitos de inibição são minimizados, ao passo que ao se utilizar substratos residuais de indústria, como glicerol ou hidrolisados celulósicos, essa preocupação ganha maior importância, devido a presença de possíveis substâncias tóxicas. Magee and Kosaric (1987), ao revisar dados de diferentes autores, salientaram que o rendimento final de 2,3-butanodiol é fortemente dependente do tipo do meio, sua preparação e a concentração inicial da fonte de carbono. Nilegaonkar et al. (1992)

reportaram, para *Bacillus licheniformis*, a seguinte ordem decrescente preferencial de fonte de carbono: glicose, frutose, celobiose, sacarose, amido e manose.

Através do planejamento composto central, o valor ótimo de concentração inicial de glicose foi de 37,21 g·L⁻¹. Sob condições de limitação de oxigênio, Yu e Saddler (1983) observaram uma inibição significativa na formação de dióis e consumo de açúcar quando os níveis de carboidrato excederam 50 g·L⁻¹. Essa tendência foi particularmente evidente utilizando xilose como fonte de carbono, mas também foi notada em estudos com D-glicose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e D-celobiose. Perego, Converti e Del Borghi (2003) testaram soluções de hidrolisado de amido com concentração inicial de glicose que variou na faixa de 20 a 70 g·L⁻¹, obtendo produtividade máxima de 0,58 g·L⁻¹·h⁻¹ para concentração de 30 g·L⁻¹ de substrato inicial, ocorrendo excesso de saturação de substrato além desse valor. Raspoet et al. (1991) relataram a formação de diversos subprodutos em várias linhagens de *B. licheniformis* sob condição de elevada disponibilidade de fonte de energia, de modo que a formação de acetoína para posterior conversão a 2,3-butanodiol é diminuída em favorecimento da formação de acetato, etanol, formato, glicerol e lactato. Nilegaonkar et al. (1992) relataram a produção de 47 g de 2,3-butanodiol a partir de 100 g de glicose após 72 h de crescimento em meio contendo peptona/extrato de carne. Jurchescu et al. (2013) obtiveram o melhor valor de produtividade em cultivo em batelada de 0,99 g·L⁻¹·h⁻¹ utilizando uma concentração de glicose inicial de 120 g·L⁻¹. Em valores superiores a esse, o valor de produtividade diminuiu e a conversão de substrato a produto foi praticamente a mesma, variando de 0,40 a 0,42 g·g⁻¹ empregando concentrações iniciais de glicose de 80 a 200 g·L⁻¹.

Outro fator avaliado foi a influência da presença do íon cobalto no meio de cultivo. Entretanto, a diferença entre a produção de 2,3-BD em meio com e sem esse íon não foi significativa, de modo que Co⁺² não exerce influência na produção desse álcool. Em microrganismos que também são capazes de produzir 1,3-propanodiol, o que não é o caso da linhagem de *Bacillus licheniformis* testada, essa influência pode ser significativa através da inativação da enzima 1,3-propanol desidrogenase, dependente de Co⁺² como co-fator. Assim, sem a produção de 1,3-PD, a conversão de substrato pode ser direcionada para a produção de 2,3-BD.

Utilizando cultivo em batelada com limitação de oxigênio, com pH regulado constantemente a 7,85, temperatura de 36,8 °C, concentração inicial de substrato de 37,21 g·L⁻¹ e tempo de processo de 12 horas, a conversão média de glicose a 2,3-BD foi de 0,07

$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, com produtividade média de $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para as condições de limitação de oxigênio a 10 e 20 % e conversão média de glicose a 2,3-BD de $0,15 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ com produtividade de $0,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para limitação de oxigênio a 30 %. Jurchescu et al. (2013), empregando *Bacillus licheniformis* livres em cultivo em batelada, com temperatura de processo de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH inicial 6,6 obtiveram valores de conversão de glicose a 2,3-BD de $0,42 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e de produtividade de $0,86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a partir de $180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose após 86 h de processo, ao passo que em cultivo em batelada alimentada os valores de $Y_{2,3-BD}$ e de produtividade foram $0,40 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $1,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. Li et al. (2013) empregaram uma linhagem termófila de *B. licheniformis* em cultivo em batelada alimentada com dois estágios de agitação: nas primeiras 10 horas, a agitação foi de 400 rpm ao passo que nas horas posteriores foi de 200 rpm. A temperatura utilizada foi de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 7,0. A conversão máxima foi de $0,47 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ e a produtividade foi de $2,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a partir de $246 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose, em um processo de 48 horas. Nilegaonkar et al. (1992) obtiveram conversão máxima de $0,47 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ em fermentação descontínua após 72 horas de processo a partir de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose com pH 7,0 e temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ao comparar a conversão de substrato a produto e a produtividade obtidas através das condições testadas com os valores da literatura, a estratégia adotada não foi adequada, tornando o processo pouco eficiente. Assim, alguns pontos devem ser reavaliados, como o controle constante do pH a 7,85 e as condições de limitação de oxigênio, de modo que devem ser adotados valores que garantam um ambiente de microaerofilia.

6. CONCLUSÃO

A partir dos substratos e dos microrganismos testados, a única linhagem que mostrou ser capaz de produzir 2,3-BD foi a de *Bacillus licheniformis* apenas a partir de glicose como fonte de carbono.

A fim de otimizar a produção de 2,3-BD por *Bacillus licheniformis* alguns parâmetros do processo, já relatados na literatura como principais fatores de influência na síntese microbiana de 2,3-BD, foram estudados. Desse modo, o valor ótimo de pH inicial foi constatado de 7,85, temperatura de 36,8 °C e concentração inicial de glicose de 37,21 g·L⁻¹.

Outro fator averiguado foi a influência na produção de 2,3-BD pela presença do íon cobalto no meio de cultivo. Entretanto, a diferença na produção de 2,3-BD em meios de cultivo com e sem Co⁺² não foi significativa, de modo que esse fator não influencia na produção do álcool de interesse por *Bacillus licheniformis*.

Além disso, a fim de obter concentrações de oxigênio que potencializassem a produção de 2,3-BD, condições de limitação de oxigênio dissolvido no meio de cultivo a 10 %, 20 % e 30 % foram testadas. Entretanto, todas essas concentrações mostraram-se superiores à necessária para obter-se microaerofilia, de modo que essa estratégia foi ineficiente e a produção de 2,3-BD foi diminuída, provavelmente porque o excesso da disponibilidade de oxigênio desviou a conversão do substrato para biomassa e gás carbônico.

Para futuros trabalhos visando a produção de 2,3-BD, sugere-se um controle mais fino do pH, de modo que se permita a acidificação natural do meio de cultivo em experimento em biorreator e após atingir o valor de produção máxima de 2,3-BD permitir o retorno do valor de pH à condição inicial, evitando que a acidificação excessiva comprometa a cultura bacteriana. Além disso, testar concentrações menores de oxigênio dissolvido no meio, visando a obtenção de microaerofilia. Por fim, pode-se testar o cultivo em biorreator em regime de batelada alimentada e verificar a eficiência desse processo em relação à fermentação descontínua.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, S.; CAPIT, F.; WEIGAND, W. A. e HONG, J. Kinetics of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: effect of initial substrate concentration and aeration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 47, p. 71-84, 1990.
- ANDERSON, R. L. e WOOD, W. A. Pathway of L-xylose and L-lyxose degradation in *Aerobacter aerogenes*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 296-303, 1962.
- ANVARI, M. e MOTLAGH, M. R. S. Enhancement of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* PTCC 1402. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-7, 2011.
- BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. The “buttery” attribute of wine - Diacetyl - Desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 235–252, 2004.
- BERBERT-MOLINA, M. A. Avaliação de caldo de cana-de-açúcar para obtenção de 2,3-butanodiol. **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo, 1995.
- BIEBL, H.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 24–29, 1998.
- BLACKWOOD, A. C.; WHEAT, J. A.; LESLIE, J. D.; LEDINGHAM G. A. e SIMPSON, F. T. Production and properties of 2,3-butanediol. Pilot plant studies on the fermentation of wheat by *Aerobacillus polymyxa*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 27, p. 199-210, 1949.
- BLOMQUIST, K. et al. Characterization of the Genes of the 2, 3-Butanediol Operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. v. 175, n. 5, p. 1392–1404, 1993.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA U. A. e AQUARONE, E. **Biotechnologia industrial**: volume 1. Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.
- BOTHAST, B. C. S. R. J. Production of 2, 3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. **North**, p. 321–326, 1999.
- BRISSE, S.; GRIMONT, F. e GRIMONT, P. A. D. The genus *Klebsiella*. **Prokaryotes**, p. 159-196, 2006.
- BRYN, K.; ULSTRUP, J. C.; STORMER, F. C. Effect of acetate upon the formation of acetoin in *Klebsiella* and *Enterobacter* and its possible practical application in a rapid voges-proskauer test. **Applied microbiology**, v. 25, n. 3, p. 511–512, 1973.
- CASPI, R. Acetoin biosynthesis I; Acetoin biosynthesis II; Butanediol biosynthesis. **Metacyc encyclopedia of metabolic pathways**, 2008. Disponível em: <http://metacyc.org/>. Acessado em 11 de março de 2015.

CELIŃSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 715–725, 2009.

CHANDEL, A. K., SINGH O. V. e VENKATESWAR, R. L. Biotechnological applications of hemi-cellulosic derived sugars: state-of-the-art. **Sustainable biotechnology**, p. 63-81, 2010.

CONVERTI, A.; PEREGO, P. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 2-3, p. 303–309, 2002.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: Carbon and reduction degree balances in batch cultivations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 3, p. 370–377, 5 maio 2003.

DE MAS, C. D.; JANSEN N. B. e TSAO, G. T. Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 791-800, 1988.

FLICKINGER, C. Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into fuel liquids: how far have we come? **Biotechnology Bioengineering**, v. 22, p.27-49, 1980.

FULLMER, E.; CHRISTENSEN, L. M.; KENDALL, A. R. Production of 2,3-Butylene Glycol by fermentation. v. 1740, n. 1930, p. 5–7, 1933.

GAO, J. et al. Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce R,R-2,3-butanediol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 18, p. 7076–7082, 2010.

GARG, S. K.; JAIN, A. FERMENTATIVE PRODUCTION OF 2 , 3-BUTANEDIOL : A REVIEW. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 103–109, 1995.

GROVER, B.; GARG, S.; VERMA, J. Production of 2, 3-butanediol from wood hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 328–332, 1990.

HÄSSLE, T. et al. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 237–244, 2012.

HATTI-KAUL, R.; TO, U.; GUSTAFSSON, L. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. v. 25, n. 3, 2007.

HENRIKSEN, C. M.; NILSSON, D. Redirection of pyruvate catabolism in *Lactococcus lactis* by selection of mutants with additional growth requirements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5-6, p. 767–775, 2001.

- JANSEN, N. B.; FLICKINNGER, M. C. e TSAO G. T. Production of 2,3-butanediol from d-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 362-369, 1984.
- JI, X.; HUANG, H.; OUYANG, P. Microbial 2,3-butanediol production : A state-of-the-art review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 351–364, 2011.
- JI, X. J. et al. Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5214–5218, 2009.
- JI, X. J. et al. Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1751–1758, 2010.
- JURCHESCU, I. M. et al. Enhanced 2,3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6715–6723, 2013.
- KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 137–45, abr. 2004.
- KIM, S. J. et al. Production of 2,3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 274–281, 2013.
- KÖPKE, M. et al. 2,3-Butanediol Production By Acetogenic Bacteria, an Alternative Route To Chemical Synthesis, Using Industrial Waste Gas. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5467–5475, 2011.
- KOSARIC, N.; MAGEE, R. J.; BLASZCZYK, R. Redox potential measurement for monitoring glucose and xylose conversion by *K. pneumoniae*. **Chemical and biochemical engineering quarterly**, v. 6, n. 3, p. 145–151, 1992.
- LAUBE, V. M.; GROLEAU, D.; MARTIN, S. M. 2,3-Butanediol production from xylose and other hemicellulosic components by *Bacillus polymyxa*. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 4, p. 257–262, 1984.
- LEDINGHAM, G. A. e NEISH, A. C. Fermentative production of 2,3-butanediol. **Chemical publishing**, p. 27-93, 1954.
- LI, Z. J.; KAN, S. L.; QIAO, H. Q.; JIANG, M. e LU, D. Q. Past, present and future industrial biotechnology in China. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 122, p. 1-42, 2010.
- LI, L. et al. A newly isolated *Bacillus licheniformis* strain thermophilically produces 2,3-butanediol, a platform and fuel bio-chemical. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 123, 2013.

- LI, L. et al. Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 256–261, 2014.
- LONG, S. K. e PATRICK, R. Production of 2,3-butylene-glycol from citrus wastes. I. The *Aerobacter aerogenes* fermentation. **Applied Microbiology**, v. 9, p. 244-249, 1961.
- LÓPEZ-CONTRERAS, A. M. et al. Utilisation of saccharides in extruded domestic organic waste by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for production of acetone, butanol and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 162–167, 2000.
- MA, C. et al. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 49–57, 2009.
- MADDOX, I. S. Microbial production of 2,3-butanediol. **Biotechnology**, v. 6, p. 269-291, 1996.
- MALLONEE, D. H.; SPECKMAN, R. A. Development of a Mutant Strain of *Bacillus polymyxa* Showing Enhanced Production of 2,3-Butanediol. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 1, p. 168–171, 1988.
- MENZEL, K.; ZENG, A. P.; BIEBL, H. e DECKWER, W. D. Kinetic, dynamic and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: I. The phenomena and characterization of oscillation and hysteresis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 549-560, 1996.
- MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 2, p. 82–86, 1997.
- MOES, J.; GRIOT, M.; KELLER, J.; HEINZLE, E.; DUNN, I. J. e BOURNE, J. R. A microbial culture with oxygen-sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. **Biotechnology bioengineering**, v. 27, p. 482-489, 1985.
- NAKASHIMADA, Y. et al. *Paenibacillus polymyxa*. v. 90, n. 6, p. 661–664, 2000.
- NAKASHIMADA, Y.; KANAI, K.; NISHIO, N. Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2, 3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 12, p. 1133–1138, 1998.
- NILEGAONKAR, S. et al. Production of 2, 3-butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 378–381, 1992.
- PARK, J. M. et al. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of *Klebsiella oxytoca* for 2,3-butanediol production. **Microbial cell factories**, v. 12, n. 1, p. 20, 2013.

PEREGO, P. et al. 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes* : selection of the optimal conditions and application to food industry residues. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 613-620, 2000.

PEREGO, P; CONVERTI, A. e DEL BORGHI, M. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 125-131, 2003.

PERLMAN, D. Production of 2,3-butylene glycol from wood hydrolysates. **Industry and Engineering Chemistry Research**, v. 36, p. 803-804, 1944.

PETROV, Kaloyan; PETROVA, Penka. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 4, p. 659–665, 2009.

PIRT, S. J. e CALLOW, D. S. Exocellular product formation by microorganisms in continuous culture. I. Production of 2,3-butanediol by *Aerobacter aerogenes* in a single stage culture. **Journal Applied Microbiology**, v. 21, p. 188-205, 1958.

PRATA, A. M. R. Obtenção de 2,3-butanodiol a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto em regime descontínuo alimentado. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, 1997.

QURESHI, N.; CHERYAN, M. Effects of aeration on 2,3-butanediol production from glucose by *Klebsiella oxytoca*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, n. 6, p. 415–418, 1989.

RAGAUSKAS, A. J.; DAVISON; BRIAN H.; LIOTTA, C. L.; JONATHAN, R.; TEMPLER, R. H. e TSCHAPLINSKI, T. J. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, v. 311, 2006.

RAMACHANDRAN, K. B.; GOMA, G. Effect of oxygen supply and dilution rate on the production of 2,3-butanediol in continuous bioreactor by *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 2, p. 107–111, 1987.

RAMACHARDAN K. B., HASHIM M. A. e FERNANDEZ A. A. Kinetic study of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 70, p. 235-240, 1990.

RAO, B. et al. Characterization and regulation of the 2,3-butanediol pathway in *Serratia marcescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 2147–2159, 2012.

RASPOET. D.; POT, B.; DE DEYN, D.; DE VOS, P.; KESSTERS, K. e DE LEY, J. Differentiation between 2,3-butanediol producing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus polymyxa* strains by fermentation product profiles and whole-cell protein electrophoretic patterns. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 14, p. 1-7, 1991.

ROMIO, T. Produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol por *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Tese de mestrado**, Universidade de Caxias do Sul, 2014.

ROSSI, D. M. et al. Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Renewable Energy**, v. 55, p. 404–409, doi:10.1016/j.renene.2012.12.048, 2013.

ROSSI, D. M.; DE SOUZA, E. A.; AYUB, M. A. Z. Biodiesel residual glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae*: Pool of metabolites under anaerobiosis and oxygen limitation as a function of feeding rates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 6, p. 1952–1964, 2013.

SABLAYROLLES, J. M. e GOMA, G. Butanediol production by *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: effects of initial substrate concentration and aeration agitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 148-155, 1984.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian journal of microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1–17, 2004.

SILVEIRA, M. M. Estudo cinético da fermentação butílico glicólica de sacarose por *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. **Tese de doutorado**. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1991.

SILVEIRA, M. M.; SCHMIDELL, W.; BERBERT, M. A. Effect of the air supply on the production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. **Journal of Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 93–102, 1993.

SILVEIRA, M.; BERBERT-MOILINA, M. A.; PRATA, A.M.R. e SCHMIDELL, W. Production of 2,3-butanediol from sucrose by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199 in batch and fed-batch reactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 1998.

STORMER, F. C. Evidence for induction of the 2,3-butanediol-forming enzymes in *Aerobacter aerogenes*. **FEBS Letters**, v. 2, n. 1, p. 36–38, 1968.

SYU, M. J. Biological production of 2,3-butanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 10–18, 2001.

TANZI -, M. C. et al. Polyurethane-maleamides for cardiovascular applications: synthesis and properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine (USA)**, v. 10, n. 12, p. 711–714, 1999.

TSAO, G. T. Conversion of biomass from agriculture into useful products. Final report, 1978.

UNDERKOFER L. A. e HICKEY R. J. Industrial fermentations. **Chemical Publishing Company**, v. 2, p. 27-94, 1954.

VAN HOUTT, R.; AERTSEN, A.; MICHIELS, C. W. Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila* AH-1N. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 4, p. 379–385, 2007.

- VILLET, R. Biotechnology for producing chemicals from biomass. Fermentation chemicals from biomass. **Solar energy research institute**, v. 2, p. 621-754, 1981.
- VOLOCH, M. et al. 2,3-butanediol. In: BLANCH, H.; DREW, S.; WANG, D. (Eds.). **Comprehensive biotechnology; the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. [S.l.]: Oxford: Pergamon/Elsevier, 1985. p. 933–44.
- WECKE, T. et al. Cell envelope stress response in *Bacillus licheniformis*: Integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 21, p. 7500–7511, 2006.
- WONG, C. L. et al. Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 169–176, 2014.
- WU, K. et al. Bioresource Technology Simultaneous production of 2, 3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7966–7970, 2008.
- XIAO, Z.; XU, P. Acetoin metabolism in bacteria. **Critical reviews in microbiology**, v. 33, n. 2, p. 127–140, 2007.
- YEN, H. W. et al. The pH effects on the distribution of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol produced simultaneously by using an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 3, p. 425–431, 2014.
- YU, E. K.; SADDLER, J. N. by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate Fed-Batch Approach to Production of 2, 3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* Grown on High Substrate Concentrations. v. 46, n. 3, p. 630–635, 1983.
- YU, E. K. C.; SADDLER, J. N. Power solvent production by *Klebsiella pneumoniae* grown on sugars present in wood hemicellulose. **Biotechnology Letters**, v. 4, p. 121–126, 1982.
- ZENG, A.-P.; BIEBL, H.; DECKWER, W.-D. Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 485–489, 1990.
- ZENG, A. P.; BIEBL, H. e DECKWER, W. D. Production of 2,3-butanediol in a membrane bioreactor with cell recycle. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 463-468, 1991.
- ZHANG, L. et al. Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 857–862, 2010.