UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

SAMARA CARDOSO ALVES

Avaliação da produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol por *Klebsiella oxytoca* em
diferentes condições de pH em frascos agitados

SAMARA CARDOSO ALVES

Avaliação da produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol por *Klebsiella oxytoca* em diferentes condições de pH em frascos agitados

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Biotecnologia Industrial

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata

.

Versão Corrigida

Lorena
2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Alves, Samara Cardoso

Avaliação da produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol por *klebsiella oxytoca* em diferentes condições de ph em frascos agitados / Samara Cardoso Alves; orientador Arnaldo Márcio Ramalho Prata - Versão Corrigida. - Lorena, 2021.
104 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2021

1. Controle do ph. 2. monitoramento automatizado. 3. glicerol residual. 4. 2,3 butanodiol . I. Título. II. Prata, Arnaldo Márcio Ramalho , orient.

Dedico...

*Principalmente a Deus, pois sem ele não
somos nada. Aos meus pais amados Ionilson e
Adalgiza pelo amor, dedicação e incentivo. Ao meu
querido afilhado Pedro Lucas, por ser minha*

Inspiração e alegria.

*Aos meus avós, Adonias e Juvenilia pelo
amor e exemplo de vida.*

À família e amigos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida, esperança, luz, por cada lição, por cada pessoa que colocou no meu caminho, por sempre está me guiando para os caminhos certos, permitindo viver este grande sonho.

Aos meus queridos pais, minha mãe **Adalgiza** e meu pai **Ionilson**, por todo amor, dedicação e por sempre acreditar em mim e viver este sonho comigo. Agradeço meu amado afilhado **Pedro Lucas**, por ser minha motivação durante toda essa jornada. Ao meu irmão **Pedro Paulo** por sempre me incentivar a seguir em frente e acreditar na minha capacidade. Agradeço a minha cunhada amiga **Andréia**, por sua torcida pelo meu sucesso e principalmente pela sua amizade.

Aos meus avós, **Adonias e Juvenília**, que apesar da distância, sempre me deram apoio, carinho, amor, são meus grandes exemplos de vida. A toda minha família, tios, tias e primos que mesmo a distância me deram todo apoio e se orgulham pela minha conquista.

A minha família de Lorena, **Patrícia, Josman, Matias, Pedro** por cada momentos juntos, cada risada, almoços no RU, por cada perrengue passado, orientação, vocês foram a minha alegria em Lorena, sou muito sortuda de ter vocês como amigos. O Grata a minha amiga Bárbara pela sua amizade. Mas gostaria de agradecer especialmente meus amigos **Verônica e Marcos**, vocês são seres de luz. Obrigada todo o apoio que me deram desde o início, por ter me acolhido quando mais precisei, nunca esquecerei de todo o carinho que me deram.

A todas as pessoas maravilhosas que passaram no meu caminho em Lorena, por todos nossos momentos de alegria compartilhados. Aos meus amigos conterrâneos da UFT, **Gabriel, Lenise e Tati**, por fazerem parte deste momento, pelos teres na praça e fazer lembrar a nossa região, me deram muito conforto. Ao **Diego** por fazer parte da minha história e sempre ter me dado apoio para concretizar este trabalho e pelos bons momentos vividos juntos em Lorena.

Agradeço à minhas companheiras de república, **Sany, Viviane, Cintia, Amanda**, ainda lembro-me do dia que cheguei à república Repness, morrendo de frio, achando tudo estranho na nova cidade e vocês me acolheram essa mato-grossense com muito amor e carinho.

Aos meus companheiros de laboratório, **Hanssen, Fábio e Carla**, por toda força que me deram nos momentos difíceis, ajuda e dicas.

Ao **Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata**, pela orientação, compromisso, dedicação e amizade. Obrigada pela confiança depositada no meu trabalho e em mim, seu compromisso e companheirismo foram essenciais para a concretização desse trabalho. Seus ensinamentos contribuíram imensamente para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao **Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo**, por sua estrutura educacional de alta qualidade, com

excelentes docentes e profissionais, que souberam transmitir seus conhecimentos e fornecer serviços importantes na Biotecnologia industrial, contribuindo assim, para o desenvolvimento educacional do nosso país.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial, meu muito obrigado;

RESUMO

ALVES, S. C. **Avaliação da produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol por *Klebsiella oxytoca* em diferentes condições de pH em frascos agitados.** 2021. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2021.

O 2,3-butanodiol é um álcool que demonstra ter um potencial para a aplicação como intermediário em vários processos químicos industriais. Esse composto é usado na síntese de 1,3-butadieno, intermediário da borracha sintética, e de diacetil, aplicado na indústria de alimentos e, ainda, como combustível para veículos automotivos. Por outro lado, também é intermediário na síntese de poliésteres biodegradáveis. A produção de 2,3-butanodiol por processos fermentativos pode ser justificada pela demanda deste composto no mercado, sobretudo em função de sua aplicabilidade como intermediário químico. A produção de 2,3-butanodiol (2,3-BD) por *Klebsiella oxytoca* utilizando o glicerol como fonte de carbono, demonstra ser uma vantagem sob o ponto de biotecnológico sustentável, por se tratar de um subproduto abundante obtido da produção de biodiesel. Entretanto, durante o cultivo de *K. oxytoca* em glicerol para a produção de 2,3-BD é preciso o controle de pH. Quando o processo é desenvolvido em frasco agitado, o controle do pH do meio torna-se complicado. Nesse sentido o objetivo do presente trabalho foi definir uma estratégia de variação controlada de pH durante o cultivo, de forma a proporcionar seu melhor desempenho possível para a produção de 2,3-BD em frascos Erlenmeyer agitados, empregando-se uma concentração inicial de substrato igual 40 g/L. Primeiramente foi realizada a montagem do sistema de controle automático de pH em frasco Erlenmeyer. O primeiro conjunto experimental consistiu em avaliar valores de pH inicial sem o controle de pH. No segundo conjunto foram avaliados valores de pH inicial com controle, mantendo o mesmo valor inicial até o final da fermentação. No terceiro conjunto foram realizados ensaios com um valor de pH inicial igual a 7. Neste caso o pH foi mantido constante a partir do instante que atingiu valores pré-determinados. Por fim, realizaram-se ensaios fermentativos em biorreator com a melhor estratégia de controle de pH. Com o primeiro conjunto experimental obteve-se a maior concentração do produto (2,71 g/L) empregando-se pH inicial igual a 5,5, enquanto valores de pH inicial mais altos favoreceram o crescimento celular, enquanto valores mais baixos favoreceram a formação de produto. O controle de pH da fermentação desde o início em 6,0 proporcionou melhores resultados para o rendimento e produtividade volumétrica de 2,3-BD, comparado aos demais valores (7,0; 6,5; 5,5 e 5,2), com uma produção de $3,64 \pm 0,00$ g/L. Empregando-se 60 g/L de substrato e controle do pH em 6,0 foram obtidos $10,96 \pm 0,02$ g/L de 2,3-BD em frasco agitado e $10,94 \pm 0,00$ g/L em biorreator. As fermentações realizadas em frascos, aplicando-se o sistema de controle automático de pH, não apresentaram diferença significativa em relação às fermentações em biorreator, apontando a eficácia do sistema em reproduzir as condições de um biorreator, em relação ao monitoramento e ao controle do pH.

Palavras-chave: Controle do pH. Monitoramento automatizado. Glicerol residual. 2,3-Butanodiol

ABSTRACT

ALVES, S. C. **Evaluation of the production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella oxytoca* under different pH conditions in stirred flasks.** 2021. 104 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2021.

2,3-Butanediol is an alcohol that has the potential to be used as an intermediate in various industrial chemical processes. This compound is used in the synthesis of 1,3-butadiene, an intermediate of synthetic rubber, and diacetyl, used in the food industry and also as fuel for automotive vehicles. On the other hand, it is also an intermediary in the synthesis of biodegradable polyesters. The production of 2,3-butanediol by fermentative processes can be justified by the demand for this compound in the market, mainly due to its applicability as a chemical intermediate. The production of 2,3-butanediol (2,3-BD) by *Klebsiella oxytoca* using glycerol as a carbon source, demonstrates to be an advantage in terms of sustainable biotechnology, as it is an abundant by-product of biodiesel production. However, during the cultivation of *K. oxytoca* in glycerol for the 2,3-butanediol production, pH control is necessary. When the process is carried out in a shaken flask, the pH control of the medium becomes complicated. In this sense, the objective of the present work was to define a controlled pH variation strategy during cultivation, in order to provide its best possible performance for the production of 2,3-butanediol in agitated Erlenmeyer flasks, using an initial substrate concentration equal 40 g/L. First, the automatic pH control system was assembled in an Erlenmeyer flask. The first experimental set consisted of evaluating initial pH values without pH control. In the second, initial pH values with control were evaluated, maintaining the same initial value until the end of fermentation. In the third set, tests were carried out with an initial pH value equal to 7.0. In this case, the pH was kept constant from the moment it reached predetermined values. Finally, fermentative tests were carried out in a bioreactor with the best pH control strategy. With the first experimental set, the highest product concentration ($2.71 \pm \text{g/L}$) was obtained using an initial pH equal to 5.5, while higher initial pH values favored cell growth, while lower values favored cell growth. product formation. The control of fermentation pH from the beginning at 6.0 provided better results for the yield and volumetric productivity of 2,3 butanediol, compared to the other values (7.0; 6.5; 5.5 and 5.2), with a production of $3.64 \pm 0.00 \text{ g/L}$. Using 60 g/L of substrate and pH control at 6.0, $10.96 \pm 0.02 \text{ g/L}$ of 2,3-butanediol were obtained in a shaken flask and $10.94 \pm 0.00 \text{ g/L}$ in a bioreactor. The fermentations carried out in flasks using the automatic pH control system did not show any significant difference in relation to fermentations in a bioreactor, pointing out the system's effectiveness in reproducing the conditions of a bioreactor, in relation to pH control.

Keywords: pH control. Automated monitoring. Residual glycerol. 2,3-Butanediol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação geral de transesterificação.	23
Figura 2 – Produtos obtidos a partir do glicerol produzido na biorrefinaria.	24
Figura 3 – Os isômeros do 2,3-butanodiol.	26
Figura 4 - Diferentes vias metabólicas do metabolismo de glicose e de xilose durante a fermentação pela bactéria do gênero <i>Klebsiella</i>	30
Figura 5 – Vias metabólicas da produção de 2,3-BD a partir da glicose. Duas vias opcionais de síntese de acetoína (I e II) são ilustradas. α -ALS: α -acetolactato sintase; α ALD: α -acetolactato descarboxilase; DAR: diacetil redutase. AR: acetoína redutase..	32
Figura 6 – Vias metabólicas realizadas por <i>Klebsiella oxytoca</i> utilizando glicerol como substrato.	34
Figura 7 - A. Medidor de pH, B. Bomba peristáltica.	40
Figura 8 – Desenho esquemático do sistema de controle automático de pH.	41
Figura 9 – Valores de pH do meio durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , sem controle de pH.	49
Figura 10 – Perfil de variação do pH inicial das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com temperatura de 37 °C e concentração inicial de glicerol como única fonte de carbono de 40 g/L, sem controle de pH sobre a concentração celular.	50
Figura 11 – Perfil de variação da concentração de glicerol em diferentes pH inicial das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com temperatura de 37 °C e concentração inicial de glicerol como única fonte de carbono de 40 g/L, sem controle de pH sobre a concentração de glicerol.	52
Figura 12 – Perfil de variação da concentração de 2,3-butanodiol em diferentes pH inicial das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com temperatura de 37 °C e concentração inicial de glicerol como única fonte de carbono de 40 g/L, sem controle de pH sobre a produção de 2,3-butanodiol.	53
Figura 13 – Perfil de variação do pH inicial 7 (a), 6,5 (b), 6,0 (c), 5,5 (d) das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , sem controle de pH sobre a concentração celular, consumo de glicerol, produção de 2,3-butanodiol.	54
Figura 14 – Velocidades específicas de crescimento de células, em função do tempo para diferentes pH iniciais 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , sem controle de pH.	57
Figura 15 – Velocidades específicas de consumo de substrato, em função do tempo para diferentes pH iniciais 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , sem controle de pH.	58

Figura 16 – Velocidades específicas de formação de produto, em função do tempo para diferentes pH iniciais 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , sem controle de pH.....	59
Figura 17 – Gráfico de efeito para análise dos efeitos dos diferentes pH iniciais da fermentação para Fator de conversão de substrato em células $Y_{x/s}$ (a), Produtividade volumétrica em células Q_x (b), Fator de conversão de substrato em produto $Y_{p/s}$ (c), Produtividade volumétrica em produto Q_p (d).....	64
Figura 18 – Perfil de variação do pH na fermentação com controle no pH 7,0; 6,5; 6,0 e 5,5.	65
Figura 19 – Perfil de variação do crescimento celular durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> com controle de pH em 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2 desde o início da fermentação. 67	
Figura 20 – Perfil de variação da concentração de glicerol durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> com controle de pH em 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2 desde o início da fermentação. 68	
Figura 21 – Perfil de variação da concentração de 2,3-butanodiol durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> com controle de pH em 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2 desde o início da fermentação.	69
Figura 22 – Perfil de variação do pH 7,0 (a), 6,5 (b), 6,0 (c), 5,5 (d) e 5,2 (e) das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com controle de pH sobre a concentração celular, consumo de glicerol, produção de 2,3-butanodiol.....	70
Figura 23 – Velocidades específicas de formação de células em função do tempo para diferentes pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2 das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com controle de pH.....	73
Figura 24 – Velocidades específicas de consumo de substrato em função do tempo para diferentes pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2 das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com controle de pH.....	74
Figura 25 – Velocidades específicas de formação de produto em função do tempo para diferentes pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2 das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com controle de pH.....	74
Figura 26 – Gráfico de efeito para análise dos efeitos dos diferentes pH controlado da fermentação para Fator de conversão de substrato em células $Y_{x/s}$ (a), Produtividade volumétrica em células Q_x (b), Fator de conversão de substrato em produto $Y_{p/s}$ (c), Produtividade volumétrica em produto Q_p (d).....	77
Figura 27 – Perfil de variação do pH inicial da fermentação igual a 7,0 sem controle e com controle de pH a partir de 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2.	80
Figura 28 – Perfil de variação do crescimento celular durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> com pH inicial da fermentação igual a 7,0, sem controle e com controle a partir de 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2.....	81
Figura 29 – Perfil de variação da concentração de glicerol durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> com pH inicial em 7,0 sem controle e com controle a partir dos valores 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2.	82

Figura 30 – Perfil de variação da concentração de 2,3-butanodiol durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> com o pH inicial igual a 7,0 sem controle e com controle a partir de 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2.	83
Figura 31 – Perfil de variação da concentração celular, de concentração de glicerol, de 2,3-butanodiol e de pH durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com 60 g/L de glicerol como fonte de carbono, sob pH controlado em 6,0 em frascos Erlenmeyer a 37 °C.	86
Figura 32 – Perfil de variação da concentração celular, de glicerol, de 2,3-butanodiol e de pH durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com 60 g/L de glicerol como fonte de carbono, sob pH controlado em 6,0 em biorreator a 37 °C.	87
Figura 33 – Perfil de variação da concentração celular (a), de glicerol (b), de 2,3-butanodiol (c) durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com 60 g/L de glicerol como única fonte de carbono, sob pH controlado em 6,0.....	90
Figura 34 – Velocidades específicas de formação de células (a), velocidades de consumo de substrato (b) e formação de produto (c) em função do tempo durante o cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com 60 g/L de glicerol como única fonte de carbono, sob pH controlado em 6,0 em frasco e biorreator.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Processo de obtenção e aplicações de alguns derivados de 2,3-butanodiol. 29	
Tabela 2 – Composição do meio empregado para cultivo da bactéria <i>Klebsiella oxytoca</i>	42
Tabela 3 - Resultados e parâmetros fermentativos dos ensaios conduzidos sem o controle de pH, em diferentes pH iniciais das fermentações em cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> . .	60
Tabela 4 – Análise de Variância (ANOVA) para diferentes pH inicial da fermentação sem controle de pH em função dos parâmetros fermentativos $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_x , Q_p	62
Tabela 5 – Teste de Tukey para diferentes pH inicial da fermentação sem controle de pH em função dos parâmetros fermentativos $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_x	63
Tabela 6 – Análise de Variância (ANOVA) para diferentes pH da fermentação com controle de pH em função dos parâmetros fermentativos $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_x , Q_p	75
Tabela 7 – Teste de Tukey para diferentes pH da fermentação com controle de pH em função dos parâmetros fermentativos $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_x e Q_p	76
Tabela 8 – Dados da concentração celular, de concentração final de glicerol e de 2,3-butanodiol dos ensaios sem controle de pH e dos ensaios com o pH controlado.....	78
Tabela 9 – Dados do fator de conversão de substrato em células e em produto, produtividade volumétrica em células e produto, concentração final de células e 2,3-butanodiol dos ensaios com controle de pH desde o início da fermentação e dos ensaios com o pH inicial igual a 7,0, sem controle de pH e com controle depois.	84
Tabela 10 – Análise de Variância (ANOVA) para os dois sistemas (Frasco e Biorreator) em função da concentração final celular, de 2,3-butanodiol, de glicerol e dos para parâmetros fermentativos $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_x , Q_p	88
Tabela 11 – Tabela comparativa entre os dados da concentração final de células, de 2,3-butanodiol, da glicerol e dos parâmetros fermentativos: fator de conversão de substrato em células e em produto, produtividade volumétrica em células e produto do cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i> , com 60 g/L de glicerol inicial, controlando o pH da fermentação em 6,0 em frasco e biorreator	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-ALD	α -acetolactato descarboxilase
α-ALS	α -acetolactato sintase
2,3-BD	2,3-butanodiol
3-HPA	3-hidroxi-propionaldeído
ANOVA	Análise de variância
ANP	Agência Nacional de Petróleo
AR	acetoína redutase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CoA	Coenzima A
DAR	diacetil redutase
DHA	di-hidroxiacetona
DHAP	di-hidroxi-acetona fosfato
DP	Desvio padrão
EEL	Escola de Engenharia de Lorena
HCl	Ácido clorídrico
K_{La}	Transferência de O ₂
KOH	Hidróxido de potássio
OD	Oxigênio dissolvido
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Glicerol	22
2.2	2,3-butanodiol	25
2.3	Microrganismos produtores de 2,3-butanodiol	29
2.4	Bioquímica do metabolismo de glicerol por <i>Klebsiella oxytoca</i>	31
2.5	Condições operacionais que influenciam na produção fermentativa de 2,3-butanodiol por <i>Klebsiella oxytoca</i>	36
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Montagem do sistema de controle automático de pH em frasco Erlenmeyer ..	40
4.2	Matéria prima e Microrganismo	41
4.3	Meios de cultura	42
4.4	Inóculo	42
4.5	Ensaio de Fermentação	43
4.6	Sequência Experimental	43
4.7	Métodos Analíticos	45
4.7.1	Concentração celular	45
4.7.2	Concentração de substrato	45
4.7.3	Concentração de 2,3-butanodiol	46
4.8	Forma de análise dos resultados	46
4.8.1	Fator de conversão de glicerol em células ($Y_{x/s}$)	46
4.8.2	Fator de conversão substrato em produto ($Y_{p/s}$)	47
4.8.3	Produtividade volumétrica em células (Q_x)	47
4.8.4	Produtividade volumétrica em produto (Q_p)	47
4.8.5	Velocidades específicas	48
4.9	Análise estatística	48

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	Efeito do pH inicial do meio de em ensaios sem o controle de pH.....	49
5.1.1	Análise de Variância e Teste de Tukey para os parâmetros fermentativos de acordo com o pH inicial par os ensaios sem controle de pH.....	61
5.2	Avaliação do pH inicial do meio de fermentação com controle de pH	65
5.2.1	Análise de Variância e Teste de Tukey para os parâmetros fermentativos de acordo com o pH inicial para os ensaios com controle de pH.....	75
5.3	Avaliação das fermentações com controle de pH em comparação com as sem controle de pH.....	78
5.4	Influência do pH controlado em diferentes valores (6,5; 6,0; 5,5 e 5,2) tendo como valor de partida o pH 7,0	80
5.5	Avaliação dos ensaios em biorreator para analisar a estratégia de controle de pH	85
6	CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS.....	93
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de energia vem sendo intensificada e estudada de forma significativa em todo mundo. A crise mundial econômica, o elevado preço do petróleo e a pressão da sociedade para um desenvolvimento sustentável têm estimulado empresas por todo o mundo a empregar processos que produzam energia limpa a partir de recursos renováveis (BAICHA *et al.*, 2016; JIA; DAI; WANG, 2018; SONG *et al.*, 2019). Devido a esta preocupação ambiental e da alta demanda por combustíveis líquidos, a procura de alternativas para a produção de energia, abrangendo processos sustentáveis para diminuir a poluição ambiental e o aquecimento global, tem estimulado o mercado mundial dos biocombustíveis. O biodiesel e o bioetanol apresentam-se como alternativas mais viáveis como fontes não convencionais de energia (LIAO *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016). O biodiesel é um biocombustível, uma vez que este é obtido a partir de fontes renováveis e seu uso tem crescido ao longo dos anos (MENEGETTI *et al.*, 2013; GEBREMARIAM; MARCHETTI, 2018; MAHLIA *et al.*, 2020).

Na fabricação do biodiesel são produzidos cerca de 10% de glicerol, resultante do processo de transesterificação. Este glicerol residual poderia ser considerado um problema ambiental em razão da elevada produção estimada para os próximos anos (GNANSOUNOU *et al.*, 2016; MCNUTT *et al.*, 2017). No entanto, em diversos estudos foi demonstrado que o glicerol pode ser empregado como fonte de carbono em processos biotecnológicos de obtenção de intermediários da indústria química de maior valor agregado, como n-butanol, ácidos graxos poli-insaturados, biopolímeros, etanol e de hidrogênio (GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016; GAYATHRI; SRINIKETHAN, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2018; STRACKE *et al.*, 2018; JACKSON; RIPOLL, 2019; RIPOLL *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020). O glicerol é uma fonte de carbono facilmente assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbias e anaeróbias para a obtenção de energia metabólica. A sua conversão por microrganismos em produtos de maior valor agregado tem potencial para o aproveitamento desse resíduo. Desta forma é importante estudar vias de formação destes produtos, a fim de que o glicerol passe a ser uma matéria-prima bastante explorada na produção de compostos relevantes industrialmente (METSOVITI *et al.*, 2012; MITREA *et al.*, 2017; VASSILEV *et al.*, 2017; MORYA *et al.*, 2018).

Entre estes produtos, o 2,3-butanodiol é um álcool que demonstra ter um potencial para a aplicação como intermediário em vários processos químicos industriais. Esse composto é usado na síntese de 1,3-butadieno, intermediário da borracha sintética, e de diacetil, aplicado

na indústria de alimentos e, ainda, como combustível para veículos automotivos. Por outro lado, também é intermediário na síntese de poliésteres biodegradáveis. A produção de 2,3-butanodiol por processos fermentativos pode ser justificada pela demanda deste composto no mercado, sobretudo em função de sua aplicabilidade como intermediário químico (HU *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2018). Bactérias de diferentes gêneros são citadas na literatura como organismos capazes de produzir 2,3-butanodiol, sendo que *Klebsiella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Escherichia* ganham destaque na produção. No entanto, a espécie *Klebsiella oxytoca* apresentou melhores resultados na produção de 2,3-butanodiol, recebendo denominações distintas ao longo do tempo (YANG *et al.*, 2014; HAZEENA *et al.*, 2019; YANG; ZHANG., 2019).

Neste contexto, a fabricação do 2,3-butanodiol por um processo fermentativo, no qual se utilize uma matéria-prima de origem biológica como fonte de carbono, como o glicerol residual da produção de biodiesel, demonstra ser uma vantagem sob o ponto de vista tecnológico e do desenvolvimento sustentável. Entretanto, durante o cultivo de *K. oxytoca* em glicerol para a produção de 2,3-butanodiol é preciso estabelecer condições ideais para o processo fermentativo, como formulação do meio, concentração de inóculo e controle de pH. De acordo com o substrato utilizado, a faixa de pH ótimo varia, entre os valores 5 e 6, que é a faixa ideal para a atividade da enzima acetolactato descarboxilase, que realiza a descarboxilação do α -acetolactato em acetoína. A acetoína é reduzida a 2,3-butanodiol no passo metabólico subsequente. Valores de pH fora dessa faixa prejudicam a produção de 2,3-butanodiol (GARG; JAIN, 1995; CELÍŃSKA; GRAJEK, 2009; METSOVITI *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013; HAKIZIMANA *et al.*, 2020).

Quando o processo é desenvolvido em frasco agitado, o controle do pH do meio torna-se complicado. Isso acontece devido à acumulação de ácido acético durante o processo, causando diminuição do pH, e à baixa capacidade das soluções tampões para manter essa variável estável. Autores como Metsoviti *et al.* (2012), Romio (2014), Wojtusik *et al.* (2015), Kumar *et al.* (2016) e Mitrea e Vodnar (2019) avaliaram a produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol usando a espécie *Klebsiella ssp.* e observaram uma redução drástica do pH durante o crescimento celular. Esta acidificação do meio pode provocar limitação do crescimento celular e, conseqüentemente, inibir a formação do produto da fermentação.

Petrov e Petrova (2009) estudaram a produção de 2,3-butanodiol em ensaios sem controle de pH e com diferentes valores de pH inicial. Observaram que a formação do produto

é resultado de um mecanismo adaptativo de autocontrole do pH, com respostas a quedas espontâneas de pH ao longo da fermentação. Petrov e Petrova (2010) reportaram que variações forçadas de pH tiveram diferentes efeitos no processo de formação de 2,3-butanodiol. Portanto, a variação do pH durante o processo fermentativo pode provocar mudanças no desenvolvimento da biomassa, no consumo de substrato e na geração do produto.

Desta forma, vê-se a necessidade de estudar o efeito da variação do pH na produção de 2,3-butanodiol utilizando a bactéria *Klebsiella oxytoca* e o glicerol residual da produção de biodiesel como substrato, a fim de encontrar a estratégia de variação de pH mais adequada. Os estudos para atingir esse objetivo podem ser realizados em frascos Erlenmeyer, pois, dessa maneira, permite-se a condução de um número maior de experimentos com menor uso de reagentes, quando comparados com os estudos em reatores maiores. A automatização do controle do pH nos frascos Erlenmeyer pode facilitar o estudo desse processo, como também de outros processos que necessitam o controle de pH e, conseqüentemente, auxiliar na definição da melhor estratégia.

Neste contexto, no presente trabalho o objetivo foi definir uma estratégia de variação controlada de pH durante o cultivo da bactéria *Klebsiella oxytoca* de forma a proporcionar seu melhor desempenho possível para a produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol residual da fabricação de biodiesel em frascos Erlenmeyer agitados, e comparar com a produção em biorreator de bancada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Glicerol

O glicerol é um composto orgânico, com sinônimos de 1,2,3-propanodiol, glicerina, glicil-álcool, 1,2,3-trihidroxipropano ou álcool glicol. Sua fórmula química é $C_3H_5(OH)_3$, possui massa molar de 92,09 g/mol e densidade de 1,262 kg/m³ a 25 °C, sendo caracterizado como um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico, solúvel em água e álcool e insolúvel em éter e clorofórmio (DE PAULA *et al.*, 2017; MOTA *et al.*, 2017). O glicerol bruto é um subproduto resultante da produção do biodiesel por meio da reação de transesterificação (MCNUTT *et al.*, 2017). Após a reação, ocorre a decantação do glicerol, devido ao biodiesel ser menos denso, permitindo a separação do glicerol e a retirada do biodiesel. As características químicas, nutricionais e físicas da glicerina bruta obtida dependerão do tipo de ácido graxo, gordura animal ou óleo vegetal e do tipo de catálise empregada na produção do biodiesel (ARDI *et al.*, 2015; CORNEJO *et al.*, 2017).

Na produção de biodiesel pela reação de transesterificação com a utilização de óleos vegetais, cerca de 10% do volume total resultante da reação é glicerol bruto. Este excedente da cadeia do biodiesel tem causado preocupações, uma vez que o glicerol não possui legislação específica para seu descarte, sendo armazenado, levando ao acúmulo nas usinas de produção de biodiesel, produzindo grandes estoques de glicerol bruto, o qual ainda não possui um destino definido (SUN *et al.*, 2016; ALGOUFI *et al.*, 2017).

O glicerol, na forma pura, pode ser aplicado em cosméticos, produtos alimentícios, químicos e farmacêuticos. O glicerol é ultimamente um dos componentes mais utilizados na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, xaropes, emolientes para cremes e pomadas, anestésicos, antibióticos e antissépticos. O glicerol tem sido usado como emoliente e umectante em pastas de dente e cremes de pele devido não ser tóxico, não causar irritação, não ter cheiro nem sabor. Entretanto, essas aplicações ainda não conseguem utilizar toda a glicerina bruta residual. Sendo assim, torna-se necessário a busca por novas maneiras de aproveitar totalmente este resíduo, agregando valor à cadeia produtiva de biodiesel, como também diminuindo os riscos ambientais (BART *et al.*, 2010; HEJNA *et al.*, 2017; BECKER *et al.*, 2019).

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) o biodiesel é um combustível renovável produzido a partir de um processo químico denominado transesterificação. Através desse processo, os triglicerídeos de óleos e gordura

animal reagem com um álcool primário, que pode ser o etanol ou metanol, na presença de um catalisador biológico, ácido ou básico. Ao término da reação é gerado o éster etílico ou metílico, segundo o álcool utilizado, e a glicerina. O éster formado da reação de transesterificação poderá ser comercializado como biodiesel somente após passar por processos de purificação a fim de se adequar a especificação vigente de qualidade, sendo aplicado especialmente em motores de ignição por compressão (ANP, 2020). A reação da transesterificação está ilustrada na Figura 1.

Figura 1 – Reação geral de transesterificação.

Fonte: Meneghetti *et al.* (2013).

A reação de transesterificação é dividida em três etapas sucessivas e reversíveis, gerando no final da reação os ésteres almeçados, monoacilglicerídeos e diacilglicerídeos como produtos intermediários. A princípio a molécula de triacilglicerídeo é convertida em diacilglicerídeo, em seguida em monoacilglicerídeo e por fim em glicerol (MENEGETTI *et al.*, 2013; DANTAS *et al.*, 2016).

O setor industrial da produção de biodiesel, que utiliza uma biomassa como principal matéria prima, tem despertado interesse no seu uso não apenas para a produção de energia, mas de maneira mais ampla, aplicando o conceito de biorrefinaria. O aproveitamento desse conceito é uma grande possibilidade de desenvolvimento e expansão de mercado. A glicerina é um subproduto da fabricação do biodiesel que poderia ser utilizado, no conceito de biorrefinaria de glicerol, como matéria-prima para a produção de produtos de valor agregado por rotas químicas, bioquímicas ou termoquímicas, conforme mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Produtos obtidos a partir do glicerol produzido na biorrefinaria.

Fonte: Schultz *et al.* (2014)

Segundo um levantamento realizado pela ANP entre os anos de 2018 e 2019, no Brasil houve um aumento de 12,25% de glicerol bruto gerado na produção de biodiesel, sendo que em 2019 gerou-se um volume de 494.617 m³ deste subproduto. Esse glicerol formado é caracterizado como impuro e de baixo valor econômico, contendo ainda, água, sais, ésteres, óleo residual, álcoois e catalisador de transesterificação (ALGOUFI *et al.*, 2017; HEJNA *et al.*, 2017). Assim, para aplicação na indústria, o glicerol residual precisa passar por um processo de purificação, que envolve filtração, destilação a vácuo e descoloração, tornando seu uso pouco viável (CHO *et al.*, 2018; PITT *et al.*, 2019).

De acordo com Vikromvarasiri *et al.* (2016), a viabilidade econômica da purificação do glicerol bruto, tende a ficar comprometida, devido ao baixo preço do glicerol comercial. Uma forma de lidar com o glicerol bruto, de maneira sustentável, é o desenvolvimento de processos para convertê-lo em compostos de maior valor agregado. Uma alternativa é utilizar esse glicerol residual como fonte de carbono em processos fermentativos. Assim os

microrganismos podem consumir o glicerol como fonte de carbono devido ser um componente estrutural de muitos lipídios, substituindo carboidratos como amido, sacarose e glicose, a fim de produzir metabólitos por via biológica, como 2,3-butanodiol, etanol e hidrogênio (MITREA *et al.*, 2017; KUMAR; PARK., 2018; RUSSMAYER *et al.*, 2019).

Como exemplos de microrganismos que podem ser citados por serem capazes de crescer usando o glicerol como fonte de carbono e energia tem-se *Citrobacter freundii* (YANG *et al.*, 2011; DROŹDŹYŃSKA *et al.*, 2014; METSOVITI *et al.*, 2013), *Clostridium pasteurianum* (BIEBL, 2001; JOHNSON *et al.*, 2016; SARCHAMI *et al.*, 2016), *Klebsiella oxytoca* (METSOVITI *et al.*, 2012; PETROV ; PETROVA, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; TAO *et al.*, 2019), *Clostridium butyricum* (TRCHOUNIAN *et al.*, 2017; PACHAPUR *et al.*, 2015; GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2004), *Enterobacter agglomerans* (LEE *et al.*, 2012; NWACHUKWU *et al.*, 2012; THAPA, *et al.*, 2014). No entanto, microrganismos que possuem um crescimento lento e que exigem condições anaeróbias estritas como é o caso do *Clostridium*, em decorrência dessas limitações seu uso pode se tornar inviável, devido à baixa produtividade de 2,3-butanodiol. Pela perspectiva biotecnológica as bactérias do gênero *Klebsiella* se sobressaem aos demais microrganismos citados por conseguirem crescer tanto sob condições anaeróbias como aeróbias, utilizando somente o glicerol como fonte de carbono (RATLEDGE *et al.*, 2006; BRANDUARDI *et al.*, 2014; KUMAR; PARK., 2018). A bactéria *Klebsiella oxytoca* é capaz de produzir 2,3-butanodiol a partir de glicerol como fonte de carbono na sua via metabólica, sendo que este produto possui diversas aplicações, que serão mostradas a seguir (METSOVITI *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013; CHO *et al.*, 2015).

2.2 2,3-butanodiol

2,3-butanodiol (2,3-BD) é um álcool que tem outros nomes químicos como dimetiletileno-glicol, 2,3-butileno-glicol e butano-2,3-diol. O 2,3-butanodiol possui hidroxilação nos carbonos C-2 e C-3, massa molecular de 90,121 g/mol e fórmula molecular $C_4H_{10}O_2$. 2,3-BD mostra-se inodoro e incolor na sua forma líquida e cristalina, com ponto de ebulição de 177 °C, bastante superior ao da água, necessitando de processo de evaporação de um elevado volume de água por destilação para sua recuperação, quando produzido por fermentação (GARG; JAIN, 1995; SYU, 2001; NIH, 2019). O 2,3-BD pode apresentar-se em três formas isoméricas: D-(-)-, L-(+)- e meso-, como ilustrado na Figura 3 (CELÍŃSKA; GRAJEK, 2009).

butanodiol é obtido a partir de trans-2-butenos via óxido de trans-2,3-butenos. A mistura recêmica de R, R- e S, é produzida de forma análoga a partir de cis-2-butenos via óxido de cis-2,3-butenos (GRÄFJE *et al.*, 2019).

Desde o início do século passado há relatos sobre tentativas de produzir 2,3-butanodiol por via biológica. Harden e Galope, em 1906, foram os precursores em obter 2,3-butanodiol por microrganismo, utilizando *Aerobacter aerogenes*, que é conhecida atualmente como *Klebsiella pneumoniae* (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009). Depois foi Harden e Norris, em 1912, e Donker, no ano de 1926, que empregou *Paenibacillus polymyxa*. No ano de 1940 houve um grande interesse na produção industrial de 2,3-BD por vias biológicas, no período da Segunda Guerra Mundial, devido à insuficiência de matéria-prima para a fabricação de borracha sintética, acarretada pela crise do petróleo, o que impulsionou o Canadá e os Estados Unidos a criarem uma planta piloto para a conversão do 2,3-butanodiol produzido por *Klebsiella oxytoca* e *Paenibacillus polymyxa* em 1,3-butadieno (ROMIO, 2014; KOSARIC *et al.*, 1992). O interesse pela síntese biológica de 2,3-BD perdeu-se com o fim da guerra, uma vez que o modo de produção por via química a partir do petróleo voltou a estar disponível novamente. Além do mais, era a forma economicamente mais rentável. Com o aumento do preço do petróleo e o fato deste não ser uma matéria-prima renovável, voltou-se novamente a atenção para a produção microbiológica de 2,3-BD, de forma a contribuir a acabar com a dependência do petróleo para produção de 2,3-butanodiol (VELOCH *et al.*, 1985; SABRA *et al.*, 2011; KOUTINAS *et al.*, 2016).

Atualmente o 2,3-butanodiol é aplicado em outros processos, sendo considerado como potencial aditivo de combustível, devido seu calor de combustão ($27.200 \text{ kJ.kg}^{-1}$) ser comparavelmente favorável a outros combustíveis líquidos, como por exemplo metanol ($22.100 \text{ kJ.kg}^{-1}$) e etanol ($29.100 \text{ kJ.kg}^{-1}$). A realização de misturas equimolares entre 2,3-butanodiol e etanol resulta um calor de combustão conjugado de $27.660 \text{ kJ.kg}^{-1}$, mostrando que a presença de etanol não prejudica o uso de 2,3-butanodiol para esse fim. Além disso, possui um elevado índice de octano, que pode ser empregado como combustível para aviação e reforço na gasolina. O processo de desidrogenação catalítica do 2,3-butanodiol gera diacetil, um aditivo alimentício, bastante valorizado, usado como agente flavorizante na indústria de alimentos, atribuindo sabor amanteigado. O diacetil é capaz de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, como *Mycobacterium tuberculosis* (SABRA *et al.*, 2011; YEN *et al.*, 2014; SERATALE; JUNG; OH, 2016; DRABO *et al.*, 2017).

Também é importante citar a aplicação do 2,3-butanodiol na produção de 1,3-butadieno, composto aplicado na fabricação de borracha sintética, assim como em calçados, eletrodomésticos, modificadores de asfalto, plásticos para óleos lubrificantes, componentes de construção, tubos e látex. O 1,3-butadieno é normalmente obtido por meio do petróleo, e tem apresentado escassez de oferta, indicando a relevância de sua obtenção a partir de fontes alternativas. Ademais, a esterificação de 2,3-BD com ácido maleico gera poliuretano-maleimidas, utilizadas em aplicações cardiovasculares e precursores de espumas de poliuretano para aplicação em medicamentos, antitranspirantes, loções, cosméticos e pomadas (DUAN; YAMADA; SATO, 2016; SONG, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019). O processo de desidratação do 2,3-butanodiol deriva metil-etil-cetona, aplicada como solvente para vernizes e resinas. Outra potencial aplicação de 2,3-butanodiol é nas indústrias de polímeros, de perfumes, de explosivos, de tintas de impressão, de plastificantes (TRAN; CHAMBERS, 1987; BIAŁKOWSKA, 2016). Outro ponto relevante sobre de 2,3-BD é o fato de se tratar de um composto biodegradável, o que é uma grande vantagem do ponto de vista ambiental, possibilitando a geração de produtos menos invasivos ao meio ambiente. A demanda por 2,3-butanodiol aumenta a cada ano. O mercado global de 2,3-BDO é de cerca de 32 milhões de toneladas por ano para gerar seus principais produtos. Espera-se que o mercado atinja um valor de U\$ 300 milhões até o final de 2030. Desta forma a produção de 2,3-butanodiol utilizando microrganismos tem aumentado aceleradamente com uma taxa de 4% a 7% ao ano para suprir a indústria química (JANTAMA *et al.*, 2015; DRABO *et al.*, 2017; TMR, 2020). A Tabela 1 mostra algumas aplicações dos derivados de 2,3-butanodiol.

Tabela 1 – Processo de obtenção e aplicações de alguns derivados de 2,3-butanodiol.

COMPOSTO	PROCESSO	FINALIDADE	REFERÊNCIA
Metil-etil-cetona	Desidratação catalisada por ácido	Solvente industrial e aditivo para combustível	YOON; SONG; LEE, (2017)
Éter treta-metílico	Reação com acetona	Mistura à gasolina	VOLOCH <i>et al.</i> (1987)
Diacetil	Desidrogenação catalítica	Aditivo para alimentos	LIU <i>et al.</i> (2016)
1,3-butadieno	a-Desidrogenação catalítica de 2-buteno b-Esterificação com ácido acético e pirólise diacetato formado	Borracha sintética	SUN <i>et al.</i> (2020)
Diésteres do butanodiol	Esterificação	Plastificantes de polímeros termoplásticos	KOUTINAS <i>et al.</i> (2016)

Fonte: Adaptado de Garcia (2006).

2.3 Microrganismos produtores de 2,3-butanodiol

A maior parte dos microrganismos produtores de 2,3-butanodiol realizam processos mistos de fermentação ácida para gerar 2,3-BD, ao lado de diversos subprodutos, como ilustrado na Figura 4. Com base nas condições de fermentação e na espécie do microrganismo os produtos finais podem variar. A maior parte dos microrganismos produtores de 2,3-BD obtém energia das vias de respiração e fermentação, uma vez que são anaeróbios facultativos. Se o processo de fermentação ocorrer na presença de oxigênio no meio, de forma aeróbia, a via de produção de acetato é favorecida, enquanto a biossíntese de lactato é dominante se uma condição de anaerobiose permanecer constante. Para favorecer a produção de 2,3-butanodiol, acetoína e etanol, os níveis de oxigênio devem ser intermediários (GURAGAIN; VADLANI, 2017; HAN *et al.*, 2013).

Figura 4 - Diferentes vias metabólicas do metabolismo de glicose e de xilose durante a fermentação pela bactéria do gênero *Klebsiella*.

Fonte: Adaptado de Guragain e Vadlani (2017).

Vários microrganismos são capazes de produzir 2,3-butanodiol, no entanto poucos conseguem acumular 2,3-BD em grandes quantidades. Espécies de bactéria do gênero *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Serratia* destacam-se por serem capazes de produzir uma quantidade relevante de 2,3-butanodiol. As espécies *Klebsiella oxytoca*, *Paenibacillus polymyxa* e *K. pneumoniae* têm tido o maior desempenho com uma produção eficiente de 2,3-butanodiol. Do mesmo modo as bactérias *Serratia marcescens* e *Enterobacter aerogenes* têm sido microrganismos eficientes para produzir 2,3-BD (JI *et al.*, 2011; HAZEENA *et al.*, 2019; YANG; ZHANG., 2019).

Contudo, as espécies *Klebsiella spp.* são referidas na literatura por fornecerem os resultados mais promissores no processo de produção de 2,3-BD, caracterizadas pela facilidade de cultivo e crescimento relativamente rápido em meios carentes de nutrientes (JI *et al.*, 2011; ROMIO, 2014; BIAŁKOWSKA., 2016). A espécie *Klebsiella oxytoca* era anteriormente citada como *Aerobacter aerogenes* (STORMER, 1975) e *Klebsiella pneumoniae* (GARG; JAIN, 1995) mesmo não aparentando ser patogênica. Só depois, por

meio de estudos de Biologia Molecular, soube-se das diferenças entre espécies de *Klebsiella pneumoniae* e atualmente as linhagens são classificadas como *Klebsiella oxytoca* (BRISSE; GRIMONT; GRIMONT, 2006).

Klebsiella oxytoca é uma bactéria Gram-negativa, possui forma de bastonete, é anaeróbia facultativa, não esporula, tem um diâmetro entre 0,3 e 1,5 μm e comprimento de 0,6 a 6,0 μm . A espécie começou a ser estudada em 1906, devido sua capacidade de realizar síntese de 2,3-butanodiol por via bioquímica (GARG; JAIN, 1995; LEONE *et al.*, 2007; TRIVEDI *et al.*, 2015). Durante o processo de fermentação, *K. oxytoca*, independente do substrato, produz 2,3-butanodiol, ácido acético, etanol, ácido láctico, ácido fórmico e hidrogênio, além de gás carbônico (ZHANG *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2012; POSADA *et al.*, 2012; CHENG *et al.*, 2013). *Klebsiella oxytoca* consegue se destacar entre os demais microrganismos por ser capaz de produzir 2,3-BD de forma eficiente, utilizando matérias-primas variadas, abrangendo glicose e xilose (GURAGAIN; VADLANI, 2017). Exemplos de outros substratos são a lactose (CHAMPLUVIER; DECALLONNE; ROUXHET, 1989), a sacarose (SILVEIRA, 1991) e o glicerol (PETROV; PETROVA, 2010; POSADA *et al.*, 2012; ROMIO, 2015).

2.4 Bioquímica do metabolismo de glicerol por *Klebsiella oxytoca*

No processo de fermentação o 2,3-butanodiol é produzido partindo do piruvato, por meio de um grupo de compostos intermediários, como α -acetolactato, diacetil e acetoína, conforme ilustrado na Figura 5. Dependendo das condições aplicadas, a síntese de outros produtos como etanol, formato, lactato, acetato e succinato pode ocorrer. O metabolismo de *Klebsiella oxytoca* é dividido em oito diferentes subsistemas bioquímicos, que são: metabolismo de aminoácidos, energético, cofatores, carboidratos, vitaminas, lipídios, nucleotídeos e transportadores, sendo que o metabolismo de aminoácidos, vitaminas, cofatores e carboidratos abrangem mais da metade do número total das reações bioquímicas (CELINSKA; GRAJEK, 2009; PARK *et al.*, 2013).

Figura 5 – Vias metabólicas da produção de 2,3-BD a partir da glicose. Duas vias opcionais de síntese de acetoína (I e II) são ilustradas. α -ALS: α -acetolactato sintase; α -ALD: α -acetolactato descarboxilase; DAR: diacetil redutase. AR: acetoína redutase.

Fonte: Adaptado de Celinska e Grajek (2009).

A fermentação do glicerol tem sido estudada especialmente em microrganismos procarióticos pertencentes principalmente aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Clostridium* (METSOVITI *et al.*, 2012). Metsoviti *et al.* (2012), que realizaram uma ampla triagem de microrganismos procarióticos aptos a assimilar o glicerol bruto derivado da produção do biodiesel, em condições de anaerobiose e aerobiose, verificaram que um dos microrganismos com melhores resultados foi a cepa de *Klebsiella oxytoca* FMCC-197, que se revelou capaz de converter o glicerol residual em compostos de valor agregado, como o 2,3-butanodiol. Como mencionado anteriormente (Microrganismos produtores de 2,3-butanodiol), no processo de oxidação da glicose por *Klebsiella oxytoca* ocorre à formação de duas moléculas de piruvato, produzindo uma molécula de 2,3-BD em via anaeróbia. As vias de oxidação do glicerol são similares às da glicose, quando este é empregado como fonte de carbono (XIU *et al.*, 2007; CLOMBURG, GONZALE, 2013; POLADYAN *et al.*,

2013). Na via de síntese do 2,3-butanodiol estão envolvidas três enzimas: a α -acetolactato sintase catabólica, a qual catalisa a conversão de piruvato em α -acetolactato; a α -acetolactato descarboxilase, responsável por converter α -acetolactato em acetoína e, por último, a acetoína redutase, que catalisa a conversão de acetoína em 2,3-BD (ZHANG *et al.*, 2012; CHO *et al.*, 2015). Para uma melhor compreensão de como ocorre a síntese de 2,3-butanodiol foi elaborada a Figura 6, elucidando-se as vias bioquímicas da metabolização do glicerol pela bactéria *Klebsiella oxytoca*. citoplasmática por transporte passivo.

Inicialmente, para a metabolização do glicerol, este tem que atravessar a membrana citoplasmática por transporte passivo. O glicerol pode ser então assimilado por meio das vias metabólicas de *Klebsiella oxytoca*, produzindo os redutores NADH₂ (Da SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; MAERVOET *et al.*, 2010).

No processo de metabolização do glicerol por *Klebsiella oxytoca*, que é um microrganismo anaeróbio facultativo, estão envolvidas duas vias paralelas e acopladas, as vias oxidativa e redutora. Por meio da via oxidativa o glicerol é desidrogenado em di-hidroxiacetona (DHA) e em seguida em di-hidroxi-acetona fosfato (DHAP), tendo 2,3-butanodiol, etanol, dióxido de carbono, hidrogênio, bem como os ácidos acético, lático e succínico como produtos finais (WESTBROOK *et al.*, 2018). Em aerobiose, o glicerol é oxidado a piruvato, que é convertido em acetil-CoA, entrando no ciclo do ácido cítrico, passando pela fosforilação oxidativa a fim de produzir adenosina trifosfato (ATP). Esta via é ativada na presença de oxigênio no meio, sendo extremamente energética, proporcionando um alto crescimento celular. Outra forma de produzir ATP é convertendo acetil-CoA em acetato. Quando o oxigênio do meio é limitado, ocorre a ativação de outras vias para a manutenção celular e geração de energia, a partir das coenzimas NADH₂ e NAD⁺, que são fundamentais para a regulação em processos enzimáticos a partir de reações de oxirredução, modificando a formação dos produtos. A concentração de NADH₂ aumenta durante o crescimento celular, devido as vias de geração de ATP. Para a manutenção celular ocorre a oxidação dos compostos que foram reduzidos para gerar energia e, assim, obtém-se os produtos finais. Como dito anteriormente, em anaerobiose ou em condições restritas de oxigênio as vias de geração de 2,3-butanodiol, formato, lactato, 1,3-propanodiol, etanol e hidrogênio são ativadas, e novamente o regulador chave de ativação e inativação dessas vias é o NADH₂, dependendo da necessidade de regeneração de NADH₂, uma vez que este é tóxico para a célula (SABRA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2009; RUSSMAYER *et al.*, 2019).

Figura 6 – Vias metabólicas realizadas por *Klebsiella oxytoca* utilizando glicerol como substrato.

Fonte: Adaptado de Da Silva, Mack e Contiero (2009), Romio (2015), Russmayer *et al.* (2019).

No processo de metabolização do glicerol por *Klebsiella oxytoca*, que é um microrganismo anaeróbio facultativo, estão envolvidas duas vias paralelas e acopladas, as vias oxidativa e redutora. Por meio da via oxidativa o glicerol é desidrogenado em di-hidroxiacetona (DHA) e em seguida em di-hidroxi-acetona fosfato (DHAP), tendo 2,3-butanodiol, etanol, dióxido de carbono, hidrogênio, bem como os ácidos acético, lático e succínico como produtos finais (WESTBROOK *et al.*, 2018). Em aerobiose, o glicerol é oxidado a piruvato, que é convertido em acetil-CoA, entrando no ciclo do ácido cítrico, passando pela fosforilação oxidativa a fim de produzir adenosina trifosfato (ATP). Esta via é ativada na presença de oxigênio no meio, sendo extremamente energética, proporcionando um alto crescimento celular. Outra forma de produzir ATP é convertendo acetil-CoA em acetato. Quando o oxigênio do meio é limitado, ocorre a ativação de outras vias para a manutenção celular e geração de energia, a partir das coenzimas NADH₂ e NAD⁺, que são fundamentais para a regulação em processos enzimáticos a partir de reações de oxirredução, modificando a formação dos produtos. A concentração de NADH₂ aumenta durante o crescimento celular, devido as vias de geração de ATP. Para a manutenção celular ocorre a oxidação dos compostos que foram reduzidos para gerar energia e, assim, obtém-se os produtos finais. Como dito anteriormente, em anaerobiose ou em condições restritas de oxigênio as vias de geração de 2,3-butanodiol, formato, lactato, 1,3-propanodiol, etanol e hidrogênio são ativadas, e novamente o regulador chave de ativação e inativação dessas vias é o NADH₂, dependendo da necessidade de regeneração de NADH₂, uma vez que este é tóxico para a célula (SABRA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2009; RUSSMAYER *et al.*, 2019).

Na via redutora, a enzima glicerol desidratase remove uma molécula de água do glicerol, formando 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA). Este é reduzido a 1,3-propanodiol, o qual não pode ser metabolizado e, conseqüentemente, é liberado para o meio (WESTBROOK *et al.*, 2018). Assim, para a produção de 1,3-propanodiol é necessária a ação de duas enzimas: Glicerol desidratase e 1,3-propanodiol desidrogenase em pH neutro (VILLEGAS *et al.*, 2007; GOLIAS *et al.*, 2002). A via do lactato também acontece em pH neutro, com pouca regeneração de NADH₂. Outra via existente tem como produto final o etanol, resultado da geração de acetil-CoA a partir de piruvato, que posteriormente é convertido em etanol, por ação das enzimas aldeído desidrogenase e álcool desidrogenase, tendo como faixa ideal o pH neutro. Na via de produção do hidrogênio este é formado pela oxidação do piruvato em formato, com atuação da enzima hidrogenase, liberando hidrogênio (H₂) e gás carbônico (CO₂). Quando as vias de produção de 2,3-butanodiol e etanol são

ativadas, as reações de produção de hidrogênio se tornam desfavorecidas (METSOVITI *et al.*, 2012; TRAN, YET-POLE, LIN; 2013; WU *et al.*, 2014).

Na via de produção de 2,3-butanodiol, este é gerado a partir de duas moléculas de piruvato. Primeiramente o piruvato pode ser transformado em lactato numa reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase, que requer NADH₂. Entretanto, se o NADH₂ estiver sob baixa disponibilidade o processo de descarboxilação do piruvato em α -acetolactato, através da enzima acetolactato sintase, é favorecido. Desta forma, sob condições anaeróbias, o α -acetolactato é convertido em acetoína pela ação da acetolactato descarboxilase, liberando CO₂. Entretanto, na presença de oxigênio, o α -acetolactato pode ser convertido de forma espontânea em diacetil, por descarboxilação. Depois de diacetil a acetoína pela ação da enzima diacetil redutase. Por fim, acetoína pode ser reduzida a 2,3-butanodiol, pela ação da enzima acetoína redutase, regenerando o NADH₂. O fator estequiométrico de conversão de glicerol em 2,3-butanodiol/acetoína é de 0,489 g/g (2 mols de glicerol para 1 mol de 2,3-butanodiol). Independente do modelo cinético seguido, a conversão de acetoína em 2,3-butanodiol é uma reação irreversível. Estudos relataram que o acetato em meio ácido, ou seja, o ácido acético é um bom indutor das enzimas que cumprem uma função na produção de 2,3-butanodiol partindo do piruvato (BRYN *et al.*, 1973). Os compostos e as enzimas envolvidas na via do 2,3-BD são geralmente formados ao longo das fases log e estacionária do crescimento, sob condições limitadas de oxigênio. Sendo assim, o piruvato pode ser considerado chave principal para essa via, que ocorre com o pH entre 5 e 6, podendo ser controlada inibindo a enzima piruvato desidrogenase, impedindo a conversão do piruvato a acetil-CoA e ativando a enzima acetolactato sintase para formar o α -acetolactato (CELINSKA; GRAJEK, 2009; PARK, SONG, LEE; 2013; YANG *et al.*, 2015; GURAGAIN; VADLANI., 2017).

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

Apesar da bactéria *Klebsiella oxytoca* apresentar um alto potencial de conversão de glicerol em 2,3-butanodiol, parâmetros operacionais como temperatura, oxigênio dissolvido, concentrações de substrato e de produtos, regime de operação utilizado e especialmente o pH, influenciam a formação de 2,3-butanodiol. O pH é um fator essencial para regular o metabolismo dos microrganismos, influenciando as vias metabólicas e a produção de biomassa. A maior parte das bactérias que produzem 2,3-butanodiol são conhecidas como

anaeróbias facultativas. Como explicado, podem produzir energia por meio de duas formas diferentes: fermentação e respiração. Desta forma o rendimento de 2,3-BD pode ser melhorado somente controlando-se as atividades relativas das diferentes vias. Logo, um suprimento controlado de forma ideal de oxigênio é um fator importante para comandar a distribuição do produto e o fluxo de carbono (CONVERTI; PEREGO; DEL, 2003; PETROV; PETROVA, 2010; ANVARI; SAFARI, 2011).

A formação de 2,3-butanodiol é induzida sob a limitação de oxigênio, diminuindo com o aumento da aeração. Na fase exponencial de crescimento celular ocorre o maior consumo de oxigênio, podendo chegar à concentração zero, dependendo da intensidade do suprimento de O₂. A partir deste momento *Klebsiella oxytoca* inicia o processo fermentativo para a regeneração de ATP, o que aumenta a produção de 2,3-butanodiol, devido à limitação de oxigênio, influenciando na produção de energia através da fosforilação oxidativa. A temperatura na faixa de 30 °C a 38 °C é considerada ótima para a produção de 2,3-butanodiol por bactérias, visto que esta é a faixa de rendimento máximo de biomassa. Mudando da condição aeróbia para a de microaerofilia nesta faixa de temperatura, a produção de biomassa não foi mais favorecida, mas, sim, a formação de produtos de fermentação. A condição para atingir a produção máxima de produto deve ser próxima a de rendimento máximo de biomassa, uma vez que a produção de 2,3-butanodiol comumente acontece associada ao crescimento celular (JANSEN; FLICKINGER, 1984; FONSECA *et al.*, 2008; CELÍNSKA; GRAJEK, 2009; SONG *et al.*, 2019).

A faixa de pH ideal para a formação de 2,3-butanodiol varia conforme o substrato empregado e o microrganismo, com valores variando entre 5 e 6. Considera-se que as condições alcalinas são adequadas para a produção de ácidos orgânicos e em valores de pH ácidos há o favorecimento da produção de 2,3-butanodiol. A enzima acetolactato descarboxilase, que catalisa a reação de descarboxilação do α -acetolactato em acetoína, possui um pH ótimo entre 5 e 6. Em razão disto, quando o pH está abaixo de 4, com um meio em condições ácidas, ocorre uma diminuição na produção de 2,3-butanodiol (GARG; JAIN, 1995; CELÍNSKA; GRAJEK, 2009; HAKIZIMANA *et al.*, 2020).

Conforme relatado por Kim *et al.* (2013) a atividade enzimática das enzimas envolvidas na via metabólica de formação de 2,3-BD é reduzida em condições extremas de pH (abaixo de 4 e acima de 8). Quando o microrganismo se encontra nessas condições extremas de pH (acima de 8 e abaixo de 4) utiliza outras vias metabólicas para obtenção de energia. O processo fermentativo global é afetado quando o pH está ácido, inibindo o crescimento (PEREGO *et al.*, 2000).

Petrov e Petrova (2009), estudando a produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol como única fonte de carbono pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* G31, avaliaram a formação de produto, realizando alterações espontâneas de pH, bem como desenvolvendo fermentações sem o controle de pH, com diferentes valores de pH inicial. Os autores concluíram que a formação de 2,3-butanodiol é resultado de um mecanismo adaptativo de autocontrole do pH, com respostas a quedas espontâneas de pH ao longo da fermentação. Em um trabalho posterior, Petrov e Petrova (2010), objetivando melhorar a produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol com *Klebsiella pneumoniae*, investigaram os parâmetros aeração e pH durante o processo de fermentação descontínua, observando, pela realização de flutuações forçadas do pH, que este parâmetro é um fator determinante nos processos de conversão microbiana. Guo et al. (2017) avaliaram a capacidade de várias cepas de produzir 2,3-butanodiol a partir do soro de leite em pó e identificaram que as cepas *Klebsiella pneumoniae* CICC 10781 e *K. oxytoca* CICC 21518 foram selecionadas. Os pesquisadores observaram melhor produção de 2,3-BDO aplicando uma estratégia de manter o pH em 6,5 nas primeiras 8 horas e depois modificados para 6,0 até o final da fermentação. Mitrea e Vodnar (2019) investigaram o potencial da bactéria *Klebsiella pneumoniae* DSMZ 2026 em produzir 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol durante a fermentação sob níveis de pH controlados e não controlados em biorreator, utilizando o glicerol como única fonte de carbono. Foi verificado que a biossíntese dos metabólitos também foi influenciada pela alteração do pH, detectando maior produção das biomoléculas quando se manteve o pH em valor constante.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi definir uma estratégia de variação controlada de pH durante o cultivo da bactéria *Klebsiella oxytoca* de forma a proporcionar seu melhor desempenho possível para a produção de 2,3-butanodiol em frascos Erlenmeyer agitados.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito do pH do meio sobre a formação de biomassa e sobre a produção de 2,3-butanodiol, sem controle de pH;
- ✓ Avaliar o efeito do pH do meio sobre a formação de biomassa e sobre a produção de 2,3-butanodiol, mantendo o valor inicial durante todo o processo;
- ✓ Avaliar o efeito do pH do meio sobre a formação de biomassa e sobre a produção de 2,3-butanodiol, controlando-se o pH em diferentes valores, a partir de um mesmo valor inicial;
- ✓ Avaliar o crescimento e a produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *Klebsiella oxytoca* controlando-se o pH de acordo com a melhor condição obtida em frasco em fermentador de bancada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentação III do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL-USP).

4.1 Montagem do sistema de controle automático de pH em frasco Erlenmeyer

Como as fermentações iriam ocorrer em um Erlenmeyer de 1000 mL e para conseguir controlar o pH no frasco uma tampa de Nylon foi especialmente desenvolvida para cobrir o Erlenmeyer de 1000 mL, onde nesta tampa foi possível encaixar o eletrodo, coletor de amostra e a mangueira por onde a solução básica era adicionada (CAVALCANTE; PRATA, 2018). Para o monitoramento e controle do pH foi utilizado um controlador digital de pH (Precise Instruments, modelo pH-301), mostrado na Figura 7-A. O controlador de pH e o pHmetro (MS TECNOPON) foram conectados ao eletrodo através de um divisor de sinal. Uma bomba peristáltica (Figura 7-B) foi conectada ao relé do controlador digital, a fim de ser acionada para adicionar base no meio de fermentação quando houvesse a queda do valor de pH desejado. A Figura 8 ilustra o sistema de controle automático montado de acordo com Perussi e Prata (2019).

Figura 7 - A. Medidor de pH, B. Bomba peristáltica.

Fonte: Autoria própria.

Figura 8 – Desenho esquemático do sistema de controle automático de pH.

Fonte: Perussi e Prata (2019).

4.2 Matéria prima e Microrganismo

O glicerol residual empregado foi proveniente da fabricação de biodiesel, obtido através da reação de transesterificação de óleos vegetais com metanol ou etanol, na presença de um catalisador ácido (ácido clorídrico) ou básico (hidróxido de sódio), fornecido pela empresa Bianchini – S/A, de Canoas – RS, possuindo uma densidade de $1,38 \text{ g/cm}^3$. Em todos os ensaios de fermentação foi utilizada a linhagem *Klebsiella oxytoca* NRRL B-199, fornecida pelo Northern Regional Research Laboratory, EUA e catalogada na American Type Culture Collection (ATCC), EUA, sob o código ATCC 8724. A cultura estoque foi gentilmente cedida pela Dr^a Eloane Malvessi, do Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul. As culturas de *Klebsiella oxytoca* foram mantidas sob refrigeração a 4°C em tubos de ensaios com meio ágar nutriente, contendo os nutrientes do meio sintético definidos por Frazer e McCaskey (1989), cuja composição está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do meio empregado para cultivo da bactéria *Klebsiella oxytoca*.

Composição	Concentração (g/L)
Fosfato dibásico de amônio ((NH ₄) ₂ HPO ₄)	4,0
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	1,0
Cloreto de sódio (NaCl)	1,0
Fosfato dibásico de sódio (Na ₂ PO ₄)	1,0
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,2
Extrato de levedura	1,5
Ágar	20
Glicose	20

Fonte: Adaptado de Frazer e McCaskey (1989).

4.3 Meios de cultura

O meio para preparo de inóculo e para os ensaios fermentativos continha a seguinte composição (g/L): Fosfato dibásico de amônio (4,0), Fosfato monobásico de potássio (1,0), Cloreto de Sódio (1,0), Fosfato dibásico de sódio (1,0), Sulfato de magnésio (0,2), Extrato de levedura (1,5). Para todas as fermentações o meio de inóculo foi suplementado com 10 g/L de glicerol residual. O pH do meio de inóculo foi ajustado para 7,0, com solução de hidróxido de potássio (KOH) 5 mol/L ou ácido clorídrico (HCl) 2 mol/L, para quando necessário. O meio para os ensaios fermentativos continha 40 g/L de glicerol. Para todos os ensaios, os meios foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos.

4.4 Inóculo

O meio para o inóculo foi preparado conforme descrito no item 4.5. O cultivo foi conduzido em 2 frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio e inoculados com cinco alçadas da cultura previamente preparada e incubado a 37 °C, sob agitação recíproca de 90 rpm (incubadora *shaker* SL222, SOLAB-Científica) por um período de 10 horas. Após o cultivo, 15% (v/v) do volume do meio de fermentação era centrifugado a 2000 x g por 20 minutos e as células eram ressuspensas no próprio meio de fermentação a fim de se obter a suspensão utilizada como inóculo para o primeiro conjunto experimental (item 4.6). No entanto, para os demais conjuntos, foi calculado o volume necessário de inóculo para se obter a concentração celular inicial de 1 g/L.

4.5 Ensaios de Fermentação

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 1000 mL com o sistema de controle automático de pH, utilizando o controlador de pH da Precise Instrumentos, como descrito no item 4.1. O volume do meio de fermentação foi 200 mL. Os frascos foram inoculados conforme descrito no item 4.4. Em seguida os frascos foram incubados em uma incubadora de movimento circular (INNOVA 4000, New Brunswick Sci. Co.) a 37 °C e 200 rpm de agitação.

Os experimentos foram realizados em duplicatas e o tempo de cultivo variou para cada caso dos conjuntos experimentais. Seguindo a sequência experimental (item 4.6), o tempo de cultivo do primeiro conjunto experimental aquele correspondente à estabilização do pH do meio. Entretanto, para os demais conjuntos experimentais, o tempo de cultivo foi aquele correspondente à elevação do pH, após um ligeiro período de estabilização.

À medida que a fermentação ocorre, o meio é acidificado devido à formação dos ácidos orgânicos provenientes do metabolismo das células; a bomba responsável pela adição da base (item 4.1) é acionada pelo controlador de pH e o computador, com o “software” Aquisição de Dados, registra os dados de pH provenientes do pHmetro, fornecendo um valor a cada 5 segundos.

4.6 Sequência Experimental

Os ensaios foram realizados em conjuntos experimentais, sendo que o primeiro conjunto consistiu em avaliar os seguintes valores de pH inicial: 7,0; 6,5; 6,0 e 5,5, sem o controle do pH. No segundo conjunto foram avaliados os valores de pH inicial 7,0; 6,5; 6,0 ;5,5 e 5,2 com controle de pH, mantendo-se o valor de pH inicial até o fim da fermentação.

Para cada conjunto experimental foram realizadas coletas periódicas de amostras para se determinar a concentração de células, de glicerol e de 2,3-butanodiol. Foram realizados dois ensaios para cada condição de pH.

No terceiro conjunto foram feitos quatro ensaios com um valor de pH inicial igual a 7,0. Neste caso o pH foi mantido constante a partir do instante que atingiu os seguintes valores: 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2. Ou seja, no início da fermentação o pH foi igual a 7,0 e não foi controlado. Quando atingiu 6,5 passou a ser controlado neste valor até o final do processo. O mesmo ocorreu com os demais valores.

Finalmente, foram realizados ensaios em biorreator para avaliar a estratégia de controle de pH que apresentou o melhor resultado de produção de 2,3-butanodiol em frasco. Os ensaios foram realizados em biorreator STR BioFLO III (New Brunswick Sci. Co.) com cuba de 1,25 L de volume útil, controle de agitação, de aeração, pH e temperatura. Neste caso foi calculado o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) em água, nas condições dos ensaios em frascos (temperatura, volume do meio e agitação), de acordo com a metodologia descrita por Schmidell (2001). Esta determinação foi realizada partindo-se da variação da concentração de oxigênio dissolvido (OD) com o tempo, expressa como percentual da saturação, e registrada na unidade de controle do biorreator. As concentrações de OD (C) foram obtidas empregando-se uma sonda tipo polarográfica.

Inicialmente, o meio dentro do frasco foi submetido a um fluxo de nitrogênio gasoso até que a concentração de oxigênio fosse nula. Posteriormente, um fluxo de ar era introduzido no frasco por 5 segundos, para eliminar o nitrogênio residual, e os valores de C em função do tempo eram registrados. Nestas condições, a variação de C com o tempo é dada pela equação 1

$$dC/dt = k_La (C_S - C) \quad (1)$$

Onde:

dC/dt – variação da concentração de oxigênio (% saturação/h);

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

C_S – concentração de oxigênio na saturação (100%);

C – concentração de oxigênio dissolvido a cada instante (% saturação).

Esta equação rearranjada e integrada resulta a equação 2.

$$\ln [1 - (C/C_S)] = - k_La \cdot t \quad (2)$$

No gráfico de $\ln [1 - (C/C_S)]$ em função do tempo, a partir dos dados experimentais, obtém-se uma reta cujo coeficiente angular permite obter o valor de k_La . O k_La encontrado foi igual a $21,96 h^{-1}$.

O mesmo procedimento foi realizado no biorreator, na mesma condição de temperatura, com o volume útil de trabalho de 1,25 L e testando-se a agitação e a vazão de ar visando-se encontrar o mesmo valor de $k_L a$ encontrado em frasco. O valor encontrado foi de $22,68 \text{ h}^{-1}$.

Foram então realizados ensaios fermentativos em frascos Erlenmeyer, empregando-se o sistema automático de controle de pH, e no biorreator STR (BioFLO III), com uma concentração de 60 g/L de glicerol residual, com as mesmas condições descritas no item 4.5. A agitação no biorreator foi de 370 rpm e a aeração foi de 0,2 vvm.

4.7 Métodos Analíticos

4.7.1 Concentração celular

O crescimento celular foi quantificado por turbidimetria, sendo a concentração celular calculada por uma equação que descreve o trecho linear de uma curva de calibração que correlaciona a absorbância a 600 nm com concentração de células. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro digital (SP-22 Biospectro).

4.7.2 Concentração de substrato

A concentração de glicerol foi determinada a partir de um kit enzimático para análise de triglicerídeos, denominado Triglicérides Liquiform. O princípio do método quantifica o teor de glicerol por meio da enzima glicerolquinase. A metodologia consistiu em adicionar 10 μL de amostra e 1 mL do reativo enzimático a um tubo de ensaio que foi incubado em banho-maria a 37°C durante 10 min. Após este período a absorbância da amostra foi determinada a 505 nm em espectrofotômetro digital (SP-22 Biospectro). A curva padrão foi obtida com soluções de glicerol na faixa de concentração de 0,05 a 0,80 g/L.

4.7.3 Concentração de 2,3-butanodiol

A concentração de 2,3-butanodiol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), empregando-se um cromatógrafo WATERS 2414. A separação foi feita em uma coluna Hamilton PRP-X300, volume de injeção de 20 µL, a 50 °C, vazão de 0,8 mL/min e água ultra-pura degaseificada como fase móvel. Os resultados serão calculados em gramas por litro a partir de uma curva de calibração.

4.8 Forma de análise dos resultados

Os resultados foram analisados na forma de gráficos e tabelas de concentrações de células, de substrato e de produto em função do tempo, e dos seguintes parâmetros fermentativos: fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$), o fator de conversão de substrato em produtos ($Y_{p/s}$), produtividade volumétrica em células (Q_x), produtividade volumétrica em produto (Q_p) e por meio das velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de formação de produto para cada condição experimental.

4.8.1 Fator de conversão de glicerol em células ($Y_{x/s}$)

Foi determinado pela relação entre a quantidade de células produzidas e a correspondente quantidade de glicerol consumido, durante o tempo considerado da fermentação, conforme a equação 3.

$$Y_{x/s} = \frac{C_{xf} - C_{x0}}{C_{s1\ cons}} \quad (3)$$

Onde $Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato em célula (g/g); C_{xf} = concentração final de células (g); C_{x0} = concentração inicial de células (g); $C_{s1\ cons}$ = concentração de substrato consumida (g).

4.8.2 Fator de conversão substrato em produto ($Y_{p/s}$)

Fator de conversão de substrato em produto foi calculado empregando-se a equação 4.

$$Y_{p/s} = \frac{C_{pf} - C_{p0}}{C_{s1\text{ cons}}} \quad (4)$$

Onde,

$Y_{p/s}$ = fator de conversão em produto (g/g); C_{pf} = concentração final de produto (g); C_{p0} = concentração inicial de produto (g); $C_{s1\text{ cons}}$ = concentração de substrato consumida (g).

4.8.3 Produtividade volumétrica em células (Q_x)

A produtividade volumétrica em células foi determinada pela relação entre a variação da concentração de células e o intervalo do tempo correspondente de acordo com a equação 5.

$$Q_x = \frac{X_f - X_i}{\Delta t} \quad (5)$$

Em que:

Q_x = produtividade volumétrica em células (g/L.h); X_f = concentração final de células (g/L); X_i = concentração inicial de células (g/L); Δt = intervalo de tempo considerado da fermentação (h).

4.8.4 Produtividade volumétrica em produto (Q_p)

A produtividade volumétrica em produto foi calculada pela relação entre a variação da concentração de produto e o intervalo do tempo correspondente, conforme a equação 6.

$$Q_p = \frac{P_f - P_i}{\Delta t} \quad (6)$$

Onde Q_P = produtividade volumétrica em produto (g/L.h); P_f = concentração final de produto (g/L); P_i = concentração inicial de produto (g/L); Δt = intervalo de tempo considerado da fermentação (h).

4.8.5 Velocidades específicas

Os dados experimentais foram suavizados por polinômios utilizando-se o programa Microcal Origin 2020. Para a obtenção das velocidades específicas de crescimento, formação de produto e consumo de substrato (μ_x , μ_p , μ_s), primeiramente foram calculadas as velocidades com base no método geométrico de Le Duy e Zajic (1973), a partir dos dados obtidos da curva suavizada das concentrações em função do tempo. Em seguida as velocidades foram divididas pela concentração nos seus respectivos tempos. Todos os cálculos foram realizados empregando-se uma planilha desenvolvida por Gombert (2001) para EXCEL, para a qual os dados de entrada são as concentrações de biomassa, de substrato e de produto, e os respectivos tempos de cultivo.

4.9 Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) das amostras em duplicata. A análise estatística foi realizada por teste de Tukey com auxílio do software Statistica 13 (TIBCO software Inc., EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do pH inicial do meio para os ensaios sem o controle de pH

O pH é um fator importante a ser analisado durante um cultivo microbiano, sobretudo quando este varia significativamente ao longo do processo. Sendo assim, para avaliar a influência do pH sobre a fermentação (com 40 g/L de glicerol) durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca*, variou-se primeiramente o pH inicial. Os resultados obtidos em relação ao perfil de variação do pH estão apresentados na Figura 9. Pode-se observar que em todos os ensaios com o pH iniciando em 7; 6,5; 6; 5,5 houve uma redução drástica do pH logo nas primeiras horas de fermentação, chegando a valores entre 4 e 5. Observa-se, também, que quanto menor o valor do pH inicial, menor o valor mínimo que se estabilizou.

Figura 9 – Valores de pH do meio durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca*, sem controle de pH.

Fonte: Autoria própria.

A redução do pH durante o cultivo celular com *Klebsiella oxytoca* para produção de 2,3-butanodiol é causada pela produção de compostos ácidos no decorrer da fermentação (PETROV; PETROVA, 2010; PRYA *et al.*, 2016). O ensaio que no fim da fermentação apresentou um valor mais alto foi com o pH iniciando em 7. O ensaio iniciando em 5,5, ao término da fermentação, aproximou-se mais do pH 4. Esta acidificação do meio pode inibir o crescimento celular e, conseqüentemente a formação de produtos de fermentação, uma vez

que a célula não se encontra em condições ótimas para o seu desenvolvimento. Aparentemente não é o valor do pH em si que faz com que as células cessem suas atividades, mas sim o valor do pH associado a algum outro fator. Sugere-se que a quantidade de ácido acético produzida corresponda a tal efeito, tendo em vista que quanto maior o pH inicial, maior é a quantidade de ácido acético produzida, resultando a estabilização do pH em valores mais altos (Figura 9).

O efeito da produção de ácidos durante a fermentação sobre o crescimento celular em diferentes valores de pH inicial pode ser observado no gráfico da Figura 10. Para o ensaio com o pH iniciando em 7, observa-se que houve um crescimento contínuo até 5 horas de fermentação, logo após o pH ter atingido o valor mais baixo (Figura 9). Entretanto o tempo desse crescimento celular contínuo foi menor para os ensaios com o pH inicial 6,5, 6,0 e 5,5 com até 2 horas de fermentação, uma vez que, para esses ensaios, o pH atingiu valores baixos de pH em até 2 horas de fermentação.

Figura 10 – Perfil de variação do pH inicial das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com temperatura de 37 °C e concentração inicial de glicerol como única fonte de carbono de 40 g/L, sem controle de pH sobre a concentração celular.

Fonte: Autoria própria.

A acidificação do meio de fermentação pode provocar a limitação do crescimento celular. Os resultados obtidos para o desenvolvimento da biomassa (Figura 10) mostram que

à medida que os valores de pH se tornaram mais ácidos, o crescimento celular passa a ficar limitado, sendo que o ensaio com o pH inicial 7,0 resultou maior concentração celular, com $1,62 \pm 0,03$ g/L até o final da fermentação, e os ensaios com pH inicial de 6,5 (com $1,37 \pm 0,075$ g/L), 6,0 (com $1,27 \pm 0,05$ g/L) e 5,5 (com $1,16 \pm 0,015$), foram os que resultaram menor crescimento da biomassa. Pode-se notar uma tendência de quanto menor o valor de pH inicial menor foi o crescimento celular da bactéria.

Com 5 horas de fermentação, observa-se para todos os ensaios que o pH chega a valores ácidos e não tem variações consideráveis até o final da fermentação (Figura 10) e, conseqüentemente, a concentração celular se manteve sem alterações. Isso mostra que o pH é um fator fundamental para definir o crescimento e o metabolismo celular de *Klebsiella oxytoca*, uma vez que as enzimas dessa bactéria perdem sua atividade em valores de pH ácidos (PARK *et al.*, 2017).

Petrov e Petrova (2009) realizaram fermentações com o isolado búlgaro *Klebsiella pneumoniae* G31, utilizando o glicerol como única fonte de carbono em uma série de processos de batelada alimentada com pH não controlado a partir de diferentes valores de pH inicial e também observaram que quanto maior o valor de pH, maior foi o crescimento celular.

Cho *et al.* (2015) realizaram fermentações sem controle de pH com a bactéria *Klebsiella oxytoca* M1 em frascos, com um pH inicial 7 e 200 rpm de agitação, utilizando como uma única fonte de carbono o glicerol residual da produção de biodiesel com a concentração inicial de 40 g/L. Ao fim da fermentação os autores observaram que o pH estava em 4,9 e com 1,6 g/L de concentração celular, sem o consumo total de substrato. São valores próximos aos encontrados no presente estudo, no qual o ensaio com o pH iniciando em 7, a concentração celular final foi de 1,62 g/L (Figura 10) e o pH em 4,88 com 9 horas de fermentação.

O efeito de cada pH inicial da fermentação sobre o consumo de glicerol pode ser visualizado no gráfico da Figura 11. Nota-se que em todos os ensaios o consumo de substrato não foi total. Nas primeiras horas de fermentação dos diferentes ensaios, foram observadas diferenças no consumo de substrato. Nos ensaios com pH inicial de 7 e 6,5 houve consumo de substrato nas primeiras 3 horas de fermentação, o mesmo não sendo observado para os ensaios com o pH inicial em 6,0 e 5,5. As condições mais favoráveis do meio (pH 7 e 6,5) podem ter favorecido o consumo do glicerol, enquanto em valores mais baixos (6 e 5,5) a bactéria pode ter tido maior afinidade por outra fonte de carbono presente no meio, tal como a glicose do extrato de levedura. Romio (2014), ao avaliar o consumo de substrato por *K.*

oxytoca, notou diferentes comportamentos para glicerol e glicose, sugerindo que quando os dois substratos (glicerol e glicose) estão disponíveis para o microrganismo, glicose é preferencialmente consumida, pelo fato de este composto ser um carboidrato simples e de fácil oxidação para a maioria dos seres vivos.

Figura 11 – Perfil de variação da concentração de glicerol em diferentes pH inicial das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com temperatura de 37 °C e concentração inicial de glicerol como única fonte de carbono de 40 g/L, sem controle de pH sobre a concentração de glicerol.

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 12 estão apresentadas as concentrações de 2,3-butanodiol em função do tempo para o conjunto de ensaios. Para os ensaios com o pH inicial do meio 6,0 e 5,5 verificou-se que ao final da fermentação (9 horas de fermentação) a concentração de 2,3-butanodiol foi de $2,64 \pm 0,004$ e $2,71 \pm 0,03$ g/L, respectivamente, sendo os melhores resultados de produção de 2,3-butanodiol para este conjunto de ensaios. Nos ensaios com o pH inicial 7,0 e 6,5 a bactéria produziu $1,02 \pm 0,03$ e $1,04 \pm 0,12$ g/L de 2,3-butanodiol, respectivamente, com 9 horas de fermentação.

Figura 12 – Perfil de variação da concentração de 2,3-butanodiol em diferentes pH inicial das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com temperatura de 37 °C e concentração inicial de glicerol como única fonte de carbono de 40 g/L, sem controle de pH sobre a produção de 2,3-butanodiol.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que a produção de 2,3-butanodiol foi inversamente proporcional ao pH inicial dos meios. Isto pode ser atribuído ao fato de que o pH ótimo da enzima acetolactato descarboxilase, responsável pela descarboxilação do α -acetolactato em acetoína, molécula precursora de 2,3-BD, encontra-se na faixa entre 5 e 6 (GARG; JAIN, 1995). Dessa forma, quando se inicia a fermentação em valores de pH próximos a essa faixa, haverá produção mais rápida de 2,3-BD.

Para uma melhor visualização do efeito do pH sobre o desenvolvimento da biomassa, consumo de substrato e formação de produto, na Figura 13 encontra-se o perfil da variação da concentração destes componentes para os ensaios com pH inicial do meio igual a 7,0; 6,5; 6,0; e 5,5. É possível visualizar o comportamento do crescimento celular sob a variação de pH, onde todos os ensaios o crescimento da biomassa ficou limitado quando o pH se encontrava em valores mais baixos.

Figura 13 – Perfil de variação do pH inicial 7 (a), 6,5 (b), 6,0 (c), 5,5 (d) das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, sem controle de pH sobre a concentração celular, consumo de glicerol, produção de 2,3-butanodiol.

“Continua”

“Conclusão”

Fonte: Autoria própria.

Com estes ensaios observou-se um perfil variado para o consumo de substrato, crescimento celular e produção de 2,3-butanodiol para cada pH inicial. Isto pode indicar a influência do pH inicial do meio de fermentação sobre o cultivo de *Klebsiella oxytoca* e a quantidade de 2,3-BD produzida a partir de glicerol. Os resultados indicam que quanto menor o valor de partida do pH, maior é a quantidade de 2,3-BD produzida.

Outros trabalhos na literatura, como Mitrea e Vodnar (2019), Kumar *et al.* (2016), Wojtusik *et al.* (2015) e Metsoviti *et al.* (2012) também observaram um abaixamento do pH pela produção excessiva de ácidos durante a fermentação com bactérias do gênero *Klebsiella*, causando uma redução do crescimento celular, da formação de produtos de fermentação e do consumo de substrato.

As velocidades específicas de crescimento para todos os ensaios em que se variou o pH inicial do meio estão apresentadas na Figura 14. Como pode ser observado, todos os ensaios mostraram maiores velocidades de formação de células nas primeiras horas de fermentação, justamente quando ainda o pH não se encontrava em valores baixos (Figura 9). Somente para o ensaio com pH inicial 7,0 a velocidade específica de crescimento celular se manteve acima de zero até próximo ao fim da fermentação. Isto se deve ao fato de que neste ensaio transcorreu maior tempo para atingir valores de pH baixos, possibilitando maior crescimento celular. O ensaio com o pH inicial 5,5, apresentou o menor valor de μ_x no início da fermentação, correspondendo ao baixo crescimento celular apresentado (Figura 10). Isto se deve ao fato da célula se encontrar em um pH mais baixo, não muito favorável para o crescimento celular. O Comportamento apresentado pelos ensaios para a velocidade específica de crescimento coincidiu com que foi observado no crescimento celular (Figura 10), em que quanto maior o pH inicial do meio, maior o crescimento celular, decorrente da maior velocidade específica de crescimento.

Figura 14 – Velocidades específicas de crescimento de células, em função do tempo para diferentes pH iniciais 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, sem controle de pH.

Fonte: Autoria própria.

As velocidades específicas de consumo de substrato (Figura 15) nas primeiras horas de fermentação, para os ensaios com o pH inicial 7,0 e 6,5, foram $1,87 \text{ h}^{-1}$ e $0,99 \text{ h}^{-1}$ respectivamente, sendo maiores em relação aos ensaios com o pH inicial 6,0 e 5,5, os quais apresentaram velocidades próximas de zero, aumentando ao longo da fermentação. Isto se deve ao não consumo de substrato nas primeiras horas de processo, observado para estes ensaios, utilizando o glicerol somente após 3 horas de fermentação (Figura 11).

Figura 15 – Velocidades específicas de consumo de substrato, em função do tempo para diferentes pH iniciais 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, sem controle de pH.

Fonte: Autoria própria.

O valor 5,5 de pH inicial do meio resultou a maior velocidade específica de formação de 2,3-butanodiol, dentre os ensaios, no início da fermentação, com $2,49 \text{ h}^{-1}$, seguido de $1,56 \text{ h}^{-1}$ do pH inicial 6,0 (Figura 16). Nota-se a tendência de que valores de pH inicial do meio mais baixos, resultam maiores velocidades específicas de formação de produto, apesar de o pH inicial 7,0 ter apresentado velocidade maior do que o ensaio com o pH inicial 6,5. Provavelmente, por ter apresentado maior velocidade de crescimento celular e de consumo de substrato, o pH inicial 7,0 resultou uma adequada concentração celular para consumir o glicerol e formar o 2,3-butandiol. De modo geral, a velocidade específica de formação de produto não apresentou variações após 2 horas de processo, permanecendo próxima de zero para todos os ensaios.

Figura 16 – Velocidades específicas de formação de produto, em função do tempo para diferentes pH iniciais 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, sem controle de pH.

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 3 encontram-se os parâmetros fermentativos do processo: fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), produtividade volumétrica em célula (Q_x) e produto (Q_p) das fermentações realizadas com diferentes valores de pH inicial da fermentação, sem controle de pH.

O maior valor de $Y_{x/s}$ dentre os ensaios foi com o pH 7 (0,13 g/g), seguido por 0,09 g/g do pH 6,5; 0,07 g/g do pH 6,0 e 0,065 do pH 5,5. Nota-se um decréscimo da conversão de substrato em células com o abaixamento do pH inicial da fermentação, conforme também observado por Petrov e Petrova (2009), quando variaram o pH inicial da fermentação, utilizando também o glicerol como fonte de carbono.

O maior valor de $Y_{p/s}$, 0,55 g/g, que está próximo ao fator estequiométrico de conversão de glicerol em 2,3-butanodiol/acetoina (0,489 g/g) ocorreu quando o menor valor de pH inicial foi utilizado, neste caso o pH 5,5. Provavelmente isto ocorreu porque o glicerol não foi consumido no início da fermentação, quando a bactéria passa pela fase exponencial, onde o metabolismo é direcionado para a produção de ATP, conseguindo utilizar o glicerol disponível para a formação de produtos pelo metabolismo anaeróbio. Tal fato demonstra a influência do pH inicial da fermentação na formação de 2,3-butanodiol. Apesar disto, o pH inicial 6,5 proporcionou um valor de $Y_{p/s}$ menor comparado com o pH inicial 7,0, certamente em razão deste último ter mostrado maior crescimento celular, uma vez que a

produção de 2,3-butanodiol comumente acontece associada ao crescimento celular (CELIŃSKA; GRAJEK, 2009).

Tabela 3 - Resultados e parâmetros fermentativos dos ensaios conduzidos sem o controle de pH, em diferentes pH iniciais das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*.

Ensaio	pH-7,0	pH-6,5	pH-6,0	pH-5,5
S ₀ (g/L)	40	40	40	40
S _f (g/L)	34	34	34	35
X _f (g/L)	1,62	1,39	1,28	1,16
But (g/L)	1,59	1,04	2,64	2,71
Y _{x/s} (g/g)	0,13	0,09	0,07	0,065
Y _{p/s} (g/g)	0,26	0,17	0,44	0,51
Q _x (g/L.h)	0,13	0,09	0,07	0,05
Q _p (g/L.h)	0,53	0,11	0,29	0,28

S₀ – concentração inicial de glicerol;

S_f – concentração final de glicerol;

X_f – concentração celular final;

But – 2,3-butanodiol;

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

Y_{p/s} – fator de conversão em 2,3-butanodiol;

Q_x – produtividade volumétrica em células;

Q_p – produtividade volumétrica em produto.

Fonte: Autoria própria.

O maior valor de produtividade volumétrica em célula foi obtido com pH 7,0 (0,13 g/L.h). Percebe-se uma diminuição de Q_x com o abaixamento do pH inicial da fermentação, o que evidencia uma limitação de crescimento celular em condições mais ácidas. Como o pH 7,0 resultou uma concentração celular maior, mais rapidamente do que os demais ensaios, a sua produtividade volumétrica em produto foi maior (0,53 g/L.h). O menor valor de Q_p para este conjunto de ensaios foi proveniente do ensaio com pH inicial 6,5, com 0,11 g/L.h.

Cho *et al.* (2015) estudaram a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca* M1, modificada metabolicamente, em que os genes *pduC* (que codifica a sub-unidade maior da enzima glicerol desidratase) e *ldhA* (que codifica a lactato desidrogenase) foram deletados para reduzir a formação de subprodutos, como 1,3-propanodiol e ácido lático. *K. oxytoca*

M1 foi cultivada em frasco Erlenmeyer, com pH inicial igual a 7,0, sem controle de pH, utilizando 40 g/L de glicerol residual como única fonte de carbono. Observou-se uma produção de $8,9 \pm 0,26$ g/L, 0,19 g/L.h de produtividade e um rendimento de 0,24 g/g de 2,3-butanodiol ao final de 48 horas de cultivo. No presente trabalho iniciando a fermentação com o valor de pH igual 5,5, observou-se uma produtividade de 0,28 g/L.h e um rendimento de 0,51 g/g (Tabela 3), sendo valores superiores aos encontrados por Cho *et al.* (2015) iniciando o cultivo em pH 7,0. Tal fato indica que iniciar o cultivo com o pH do meio em valores mais baixos pode proporcionar melhores resultados de produtividade e de rendimento de 2,3-butanodiol.

5.1.1 Análise de Variância e Teste de Tukey para os parâmetros fermentativos de acordo com o pH inicial par os ensaios sem controle de pH

Os resultados dos parâmetros fermentativos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t (5% de probabilidade), sendo os resultados apresentados na Tabela 4. Em seguida os resultados das médias foram comparados pelo teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade (Tabela 5).

Tabela 4 – Análise de Variância (ANOVA) para diferentes pH inicial da fermentação sem controle de pH em função dos parâmetros fermentativos Yx/s, Yp/s, Qx, Qp.

Variáveis respostas	Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p-valor
Yx/s fator de conversão de substrato em células	pH	0,004894	3	0,001631	177,123	0,000104*
	Erro	0,000037	4	0,000009		
	Total	0,004931	7			
Yp/s fator de conversão de substrato em produto	pH	0,142811	3	0,047604	180,400	0,000101*
	Erro	0,001056	4	0,000264		
	Total	0,143867	7			
Qx	pH	0,006152	3	0,002051	261,718	0,000048*
produtividade volumétrica em células	Erro	0,000031	4	0,000008		
	Total	0,006183	7			
Qp	pH	0,175555	3	0,058518	246,394	0,000054*
produtividade volumétrica em produto	Erro	0,000950	4	0,000237		
	Total	0,176505	7			

*significativo a 95% de confiança.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com o resultado da ANOVA, o *p*-valor para todas as variáveis dependentes foi menor que 0,05, podendo-se concluir que as diferenças entre algumas das médias são estatisticamente significativas e assim o pH inicial da fermentação influencia significativamente nos parâmetros Yx/s, Yp/s, Qx e Qp. Após verificar que as médias são diferentes entre si, o teste de Tukey revela quais médias se diferenciam entre si, como pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5 – Teste de Tukey para diferentes pH inicial da fermentação sem controle de pH em função dos parâmetros fermentativos $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_x .

pH	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	Q_x	Q_p
7,0	0,13a	0,26a	0,13a	0,53a
6,5	0,09b	0,17b	0,09b	0,11b
6,0	0,07c	0,44c	0,07c	0,29c
5,5	0,06c	0,50d	0,05d	0,28c

Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre colunas não diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo teste de tukey.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 17 apresenta os gráficos dos efeitos principais dos diferentes valores de pH inicial do meio, tendo como resposta o fator de conversão de substrato em células, produtividade volumétrica em células, fator de conversão de substrato em produto e produtividade volumétrica em produto. Cada intervalo é um intervalo de confiança de 95% para a média de um grupo. É possível ter 95% de confiança de que a média do grupo está dentro do intervalo de confiança do grupo.

O pH 7,0 e 6,5 se diferenciam entre si para $Y_{x/s}$, no entanto o pH 6,0 e 5,5 não se diferenciaram entre si significativamente, podendo-se afirmar que estatisticamente a variação do pH inicial do meio de cultivo de *Klebsiella oxytoca* influencia no crescimento celular. Os valores de pH inicial da fermentação diferenciaram entre si quanto à produtividade volumétrica em células (Q_x), ou seja, como pode ser observado na Figura 17 a e b, quanto maior foi o pH inicial da fermentação maior foi o fator de conversão de substrato em células, assim como a produtividade volumétrica em células.

Ainda de acordo com o teste de Tukey todos os ensaios diferenciaram entre si significativamente para o fator de conversão de substrato em produto, em que os valores de pH inicial mais baixos (5,5 e 6,0) apresentaram maiores médias (Figura 17 c). Os ensaios 5,5 e 6,0 não diferenciaram entre si significativamente em relação à produtividade volumétrica em produto. Ademais, o valor de pH inicial 7,0 apresentou menor fator de conversão de substrato em produto (Figura 17 c), apesar disto resultou em uma maior produtividade volumétrica de produto em relação aos demais ensaios, provavelmente isto se deve ao fato da maior formação de células, proporcionando menor tempo de produção de produto.

Figura 17 – Gráfico de efeito para análise dos efeitos dos diferentes pH iniciais da fermentação para Fator de conversão de substrato em células $Y_{x/s}$ (a), Produtividade volumétrica em células Q_x (b), Fator de conversão de substrato em produto $Y_{p/s}$ (c), Produtividade volumétrica em produto Q_p (d).

Fonte: Autoria própria

A faixa de pH inapropriada para o crescimento microbiano pode alterar o potencial redox da célula, inativar as enzimas oxidativas e modificar as vias metabólicas de formação de produtos. Como consequência da limitação do crescimento microbiano, ocorre baixa produção de compostos oxidados que serão utilizados para a formação de produtos de interesse (CHO *et al.*, 2015; MENDES, 2011).

Levando em conta o exposto, fica nítida a necessidade de se manter uma faixa de pH estável no meio, para permitir um adequado crescimento microbiano, formação de produto, como também possibilitar o consumo de substrato satisfatório, visto que a falta de controle desta variável leva à parada do consumo de substrato pela bactéria (Figura 11).

5.2 Avaliação do pH inicial do meio de fermentação com controle de pH

Como exposto no item 5.1, durante a fermentação houve uma grande redução do pH para valores próximos a 4. Sendo assim é de fundamental importância definir uma forma de controlar o pH do meio de fermentação, quando se trabalha com *Klebsiella oxytoca* para a produção de 2,3-butanodiol, especialmente em frascos agitados. Em razão disto, estudou-se o crescimento microbiano, o consumo de glicerol e a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca*, com controle de pH, em frascos Erlenmeyer, empregando-se o sistema de monitoramento e controle apresentado no item 4.1. Seguindo a sequência experimental, os ensaios consistiram em avaliar os parâmetros mencionados iniciando a fermentação com pH 7,0; 6,5; 6,0, 5,5 e 5,2, mantendo-os até o fim da fermentação. A Figura 18 mostra o gráfico do perfil de variação do pH do meio para todos os ensaios desta fase. Nota-se que o pH foi mantido de forma eficaz em torno do valor escolhido para todos os ensaios.

Figura 18 – Perfil de variação do pH na fermentação com controle no pH 7,0; 6,5; 6,0 e 5,5.

Fonte: Autoria própria

Observa-se que em determinado momento da fermentação, para todos os ensaios, o pH para de diminuir e começa a aumentar. Esse fenômeno é indicativo que o glicerol foi todo consumido, com a interrupção da produção de ácidos orgânicos pela bactéria *K. oxytoca*. Assim como observado por Prata (1997), a partir desse momento, supõe-se que as células utilizam o ácido produzido como fonte de carbono, sobretudo o ácido acético, e o

consumo desse composto presente no meio leva ao aumento do pH, como observado no gráfico da Figura 18.

O gráfico da Figura 19 mostra o crescimento celular, ao longo da fermentação para todos os ensaios com controle de pH em 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2. Verifica-se um crescimento praticamente linear nas primeiras 6 horas de fermentação para os ensaios com pH 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2, sendo que para o pH 7,0 este comportamento se estendeu até 8 horas. O crescimento praticamente se estagnou após 6 horas de cultivo para todos os valores de pH, exceto para 7,0, o que ocorreu após 12 horas. Observa-se um comportamento de que quanto maior foi o pH controlado da fermentação, maior foi a concentração da biomassa, sendo o valor mais elevado no pH 7,0, com $4,63 \pm 0,05$ g/L. Este comportamento também foi observado por outros autores como Mitrea *et al.* (2017), Da Silva *et al.* (2015), Wong *et al.* (2014), Cheng *et al.* (2010), Petrov e Petrova (2009), que controlando o pH em diferentes valores, constataram que em valores de pH mais altos houve um maior crescimento da biomassa, com o pH 7,0. Observa-se, ainda, que em nenhum dos casos foi possível identificar fase lag ou fase exponencial de crescimento, as quais poderiam ter ocorrido no intervalo de 0 a 3 horas. Tal fato é um indicativo de que a composição do meio, assim como a ativação das células, está adequada para o cultivo da bactéria *K. oxytoca* em meio contendo glicerol como substrato.

Assim, com esses variados perfis do crescimento celular para cada valor controlado de pH, comprova-se a influência do pH no crescimento celular de *Klebsiella oxytoca*, sendo que em pH baixo, o crescimento pode ser inibido, conforme também verificado por Perego *et al.* (2000).

Figura 19– Perfil de variação do crescimento celular durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca* com controle de pH em 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2 desde o início da fermentação.

Fonte: Autoria própria

O gráfico da Figura 20 apresenta o consumo de glicerol ao longo da fermentação para todos os ensaios. Pode-se observar que em todos os casos a concentração de glicerol chegou próximo de zero no final da fermentação, em tempos semelhantes ao início do aumento do pH (Figura 18). Outra vez é possível observar um consumo diferencial de glicerol para todos os valores de pH, sendo que na fermentação com controle de pH em 5,5 e 5,2 a bactéria demorou cerca de 30 e 26 horas, respectivamente, para o consumo total de glicerol. Os ensaios com o pH 7,0, 6,5 e 6,0 com 15 horas de processo a concentração de glicerol no meio estava próxima de zero. Exceto para o pH 6,0, os perfis de consumo de substrato estão em acordo com os perfis de crescimento (Figura 19), em que o crescimento e o consumo de substrato foram nitidamente mais rápidos para o pH 7,0 e pH 6,5 e mais lentos para 5,5 e 5,2.

Figura 20 – Perfil de variação da concentração de glicerol durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca* com controle de pH em 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2 desde o início da fermentação.

Fonte: Autoria própria.

Por meio do gráfico da Figura 21 pode-se analisar a produção de 2,3-butanodiol para todos os ensaios. O ensaio em que se controlou o pH em 5,5 apresentou maior produção de 2,3-butanodiol, com $3,84 \pm 0,01$ g/L ao fim da fermentação, embora esta concentração tenha sido atingida apenas com 30 horas. De acordo com esse perfil de variação da concentração de 2,3-butanodiol pode-se notar uma tendência de que quanto menor o pH da fermentação, maior foi a produção do produto, com exceção do ensaio controlando o pH em 5,2, onde a concentração de 2,3-butanodiol ($3,33 \pm 0,00$ g/L) foi menor em relação ao pH 5,5. Certamente, por estar próximo ao limite ótimo da faixa ideal de pH entre 5 e 6 para a produção de 2,3-butanodiol, pode ter causado uma diminuição na produção em relação ao pH 5,5 (GARG; JAIN, 1995).

Figura 21 – Perfil de variação da concentração de 2,3-butanodiol durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca* com controle de pH em 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2 desde o início da fermentação.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Figura 22, que apresenta os resultados do controle de pH em 7,0 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2 sobre o desenvolvimento da biomassa, consumo de substrato e produto, verifica-se que em todos os ensaios o crescimento da biomassa foi contínuo, com concomitante consumo de substrato e formação de produto. De forma geral, observa-se que há uma tendência de que o melhor valor de pH é 6,0, tendo em vista que resultou uma concentração de produto que apesar de ser pouco menor que a obtida com o pH 5,5, foi atingida num tempo consideravelmente inferior (18 horas, pH 6,0 e 30 horas, pH 5,5).

Figura 22– Perfil de variação do pH 7,0 (a), 6,5 (b), 6,0 (c), 5,5 (d) e 5,2 (e) das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com controle de pH sobre a concentração celular, consumo de glicerol, produção de 2,3-butanodiol.

“Continua”

“Continuação”

Fonte: Autoria própria.

O gráfico da Figura 23 demonstra as velocidades específicas de crescimento celular, em função do tempo, para os ensaios com o pH controlado desde o início da fermentação (pH 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2). Observa-se que o ensaio com o pH 6,5 apresentou o maior valor de μ_x no início da fermentação, com $0,93 \text{ h}^{-1}$, tendo, entretanto, mostrado valores menores que o pH 7,0 a partir de 2 horas de fermentação. Isso explica o fato de que o ensaio com o controle de pH em 7,0 ter apresentado maior concentração celular no final da fermentação, comparado ao ensaio com o controle de pH em 6,5 (Figura 19). Os ensaios com controle de pH em 6,0; 5,5 e 5,2 resultaram os menores valores de μ_x dentre os ensaios, correspondendo à baixa concentração celular destes ensaios no final da fermentação (Figura 19).

Figura 23 – Velocidades específicas de formação de células em função do tempo para diferentes pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2 das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com controle de pH.

Fonte: Autoria própria.

Analisando o gráfico da Figura 24, observa-se que a velocidade específica de consumo substrato foi maior para os valores de pH 7,0; 6,5 e 6,0 ($4,41 \text{ h}^{-1}$; $4,20 \text{ h}^{-1}$ e $3,70 \text{ h}^{-1}$) consecutivamente, no início da fermentação, se aproximando de zero ao longo do tempo. Os ensaios com o pH 5,5 e 5,2, resultaram menores valores de μ_s , no entanto, se prolongando longe da velocidade zero, por um maior período, em relação aos demais, o que justifica esses ensaios terem levado um maior tempo para o consumo total do substrato. Um comportamento semelhante é notado para as velocidades específicas de formação de produto, apresentadas no gráfico da Figura 25, para todos os ensaios. Os valores de μ_p dos ensaios com o pH controlado em 5,5 e 5,2 permaneceram acima de zero por um maior tempo, ao longo da fermentação. Vale destacar a velocidade específica de formação de produto do ensaio com o controle de pH no valor 6,0, que se mostrou abaixo do ensaio com controle em 7,0, nas primeiras 4 horas de fermentação, permanecendo acima de todos os demais ensaios nas horas seguintes, chegando a zero com 20 horas, quando o glicerol foi todo consumido (Figura 20).

Figura 24 – Velocidades específicas de consumo de substrato em função do tempo para diferentes pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2 das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com controle de pH.

Fonte: Autoria própria.

Figura 25 – Velocidades específicas de formação de produto em função do tempo para diferentes pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2 das fermentações em cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com controle de pH.

Fonte: Autoria própria.

5.2.1 Análise de Variância e Teste de Tukey para os parâmetros fermentativos de acordo com o pH inicial para os ensaios com controle de pH

Os resultados dos parâmetros fermentativos fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), produtividade volumétrica em célula (Q_x) e produto (Q_p) das fermentações realizadas com diferentes pH da fermentação, com controle de pH foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t (5% de probabilidade) (Tabela 6). Posteriormente os resultados das médias foram comparados pelo teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade (Tabela 7).

Tabela 6 – Análise de Variância (ANOVA) para diferentes pH da fermentação com controle de pH em função dos parâmetros fermentativos $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_x , Q_p .

Variáveis respostas	Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p-valor
$Y_{x/s}$ fator de conversão de substrato em células	pH	0,004490	4	0,001123	202,039	0,000010*
	Erro	0,000028	5	0,000006		
	Erro total	0,004518	9			
$Y_{p/s}$ fator de conversão de substrato em produto	pH	0,000925	4	0,000231	222,74	0,000008*
	Erro	0,000005	5	0,000001		
	Erro total	0,000930	9			
Q_x produtividade volumétrica em células	pH	0,014466	4	0,003617	100,514	0,000058*
	Erro	0,000180	5			
	Erro total	0,014646	9	0,000036		
Q_p produtividade volumétrica em produto	pH	0,028815	4	0,007204	5,7458	0,041206*
	Erro	0,006269	5	0,001254		
	Erro total	0,035083	9			

*significativo a 95% de confiança.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 7 – Teste de Tukey para diferentes pH da fermentação com controle de pH em função dos parâmetros fermentativos $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_x e Q_p .

pH	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Q_x (g/L.h)	Q_p (g/L.h)
7,0	0,09a	0,07a	0,20a	0,27a
6,5	0,08b	0,08b	0,15b	0,18b
6,0	0,04c	0,09c	0,12c	0,20b
5,5	0,03c	0,10d	0,08d	0,12b
5,2	0,04c	0,08b	0,12c	0,12b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre colunas não diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo teste de tukey.

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

$Y_{p/s}$ – fator de conversão em 2,3-butanodiol;

Q_x – produtividade volumétrica em células;

Q_p – produtividade volumétrica em produto.

Fonte: Autoria própria.

Segundo o resultado da ANOVA o fator de conversão de substrato em células e produto, assim como a produtividade volumétrica em células e produto são influenciados significativamente pelo pH controlado da fermentação, com significância de 5% de probabilidade. Pelos dados da Tabela 7, nota-se que o ensaio com o pH controlado em 7,0 apresentou maior fator de conversão de substrato em células (0,09 g/g), se diferenciando significativamente dos demais ensaios, seguido do pH 6,5, com 0,08 g/g, também se diferenciando dos demais. Por outro lado, os ensaios com pH 6,0, 5,5 e 5,2 apresentaram os menores valores para $Y_{x/s}$, com 0,04, 0,03 e 0,04 g/g, respectivamente, não diferenciando entre si. Deste modo, fica nítido que controlando-se o pH da fermentação em valores mais altos no cultivo de *K. oxytoca* ocorre uma maior produção celular, como pode ser visualizado no gráfico da Figura 26 a. Em contrapartida, menores valores de pH mostraram maiores fatores de conversão de substrato em produto (Figura 26.c), apresentando diferenças significativas entre si, sendo que o pH 5,5 resultou o maior $Y_{p/s}$ (0,10 g/g). Com exceção do pH 5,2, que não se diferenciou significativamente do pH 6,5, ambos apresentaram 0,08 g/g.

Com relação à produtividade volumétrica em células, os maiores valores de pH se mostraram mais eficientes, da mesma forma que produtividade volumétrica em produto (Figura 26.b e d). A faixa de pH inapropriada para o crescimento microbiano pode alterar o potencial redox da célula, inativar as enzimas oxidativas e modificar as vias metabólicas de formação de produtos (CHO *et al.*, 2015; MENDES, 2011), certamente por esta razão os valores de pH mais elevados resultaram maior fator de conversão de substrato em células e

maior produtividade volumétrica em produto, em relação aos ensaios com o pH mais baixos, exceto o pH 6,0, que apresentou maior produtividade volumétrica em produto em relação ao pH 6,5. Apesar do pH 5,5 ter apresentado maior concentração de 2,3-butanodiol e fator de conversão em produto, sua produtividade volumétrica em produto foi baixa. Sendo assim, o pH 6,0 se apresentou como o de melhor desempenho com relação à produção e à produtividade de 2,3-butanodiol. Embora os valores de $Y_{p/s}$ e Q_p para o pH 6,0 não tenham sido superiores a todos os demais valores de pH, estes foram inferiores apenas a um valor, ou seja, $Y_{p/s}$ inferior apenas ao pH 5,5 e Q_p inferior apenas ao pH 7,0. Levando em consideração a concentração de produto obtida, inferior apenas ao pH 5,5, considera-se que o pH 6,0 é a condição mais adequada.

Figura 26 – Gráfico de efeito para análise dos efeitos dos diferentes pH controlado da fermentação para Fator de conversão de substrato em células $Y_{x/s}$ (a), Produtividade volumétrica em células Q_x (b), Fator de conversão de substrato em produto $Y_{p/s}$ (c), Produtividade volumétrica em produto Q_p (d).

Fonte: Autoria própria.

5.3 Avaliação das fermentações com controle de pH em comparação com as sem controle de pH

Na Tabela 8 apresentam-se os dados de concentração celular, de concentração final de glicerol e de 2,3-butanodiol para os ensaios sem e com controle de pH.

Realizando uma comparação entre os resultados das fermentações com o pH controlado e sem controle, observa-se a efetividade do sistema de controle do pH do meio, uma vez que os ensaios com o pH inicial em 7,0, 6,5, 6,0 e 5,5 sem o controle de pH levaram a um crescimento celular máximo de $1,62 \pm 0,03$, $1,37 \pm 0,075$, $1,27 \pm 0,05$ e $1,16 \pm 0,015$ g/L, nessa ordem, enquanto que para os ensaios com controle de pH as concentrações finais foram de $4,63 \pm 0,05$, $4,28 \pm 0,00$, $3,03 \pm 0,00$ e $2,64 \pm 0,02$ g/L, respectivamente. Nota-se que em todos os casos o crescimento celular de *K. oxytoca* foi maior quando se controlou o pH da fermentação. Como exemplo, controlando-se o pH da fermentação em 7,0, o crescimento celular foi quase 2,3 vezes maior em relação ao sem controle.

Tabela 8 – Dados da concentração celular, de concentração final de glicerol e de 2,3-butanodiol dos ensaios sem controle de pH e dos ensaios com o pH controlado.

pH	Sem controle de pH			pH controlado		
	Concentração celular (g/L)	Concentração final de glicerol (g/L)	Concentração de 2,3-butanodiol (g/L)	Concentração celular (g/L)	Concentração final de glicerol (g/L)	Concentração de 2,3-butanodiol (g/L)
7,0	$1,62 \pm 0,03$	$34 \pm 0,00$	$1,59 \pm 0,03$	$4,63 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,32$	$2,71 \pm 0,02$
6,5	$1,37 \pm 0,075$	$34 \pm 0,00$	$1,04 \pm 0,02$	$4,28 \pm 0,00$	$0,020 \pm 0,00$	$3,43 \pm 0,00$
6,0	$1,27 \pm 0,05$	$34 \pm 0,00$	$2,64 \pm 0,00$	$3,03 \pm 0,00$	$0,005 \pm 0,13$	$3,64 \pm 0,00$
5,5	$1,16 \pm 0,015$	$35 \pm 0,07$	$2,71 \pm 0,03$	$2,64 \pm 0,02$	$0,012 \pm 0,05$	$3,84 \pm 0,01$

Fonte: Autoria própria.

O pH influenciou da mesma forma o consumo de glicerol. No ensaio sem o controle de pH, devido à acidificação do meio, o consumo de substrato foi mais lento, constatando-se uma concentração residual de glicerol de 34 g/L para maioria dos ensaios, enquanto nos ensaios com controle da acidificação do meio o substrato foi totalmente consumido ao fim da fermentação.

Romio (2014) estudou a fermentação para a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca*, utilizando glicerol como fonte de carbono, controlando o pH em valores próximos de 5 e 6 com tampão, em agitador de bancada, empregando 40 g/L de glicerol inicial e não detectou a formação de 2,3-butanodiol. Todavia, no presente trabalho, aplicando o sistema de controle de pH, conseguiu-se detectar a produção de $3,64 \pm 0,00$ e $3,84 \pm 0,01$ g/L de 2,3-butanodiol para esta mesma faixa de pH (Figura 21). O autor, ainda nos ensaios sem o controle de pH, também verificou, durante o crescimento celular, uma significativa redução do pH até valores próximos a 4, assim como foi observado no presente trabalho (Figura 9), verificando-se um crescimento celular 2,5 vezes maior para o ensaio com controle de pH. Contudo o autor optou por testar a condução do processo em biorreator de bancada, devido à dificuldade de se controlar o pH.

Da mesma forma, Cho *et al.* (2015), estudando a produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol pela espécie *Klebsiella oxytoca* M1, ao realizarem uma fermentação descontínua conduzida sem o controle de pH em frascos, também verificaram uma redução do pH para valores próximos de 4,9, com o glicerol não sendo mais utilizado a partir desse momento. Assim, para dar continuidade aos estudos foi necessário realizar fermentações adicionais em batelada com o controle de pH no valor 6,0 em biorreator, observando-se uma produção de 59,4 g/L, produtividade de 0,52 g/L.h e rendimento de 0,31 g/g. No presente trabalho foi obtido 0,27 g/L.h de produtividade de 2,3-butanodiol, controlando o pH no valor 7,0 e o maior rendimento, de 0,10 g/g, para o controle de pH no valor 5,5.

Semelhantemente, Petrov e Petrova (2009) realizaram fermentações com o isolado búlgaro de *Klebsiella pneumoniae* G31, utilizando o glicerol como única fonte de carbono, em uma série de processos de batelada alimentada com controle de pH nos valores 5,0 e 7,0. Tiveram que utilizar um biorreator para realizar experimentos com o controle de pH. Os autores observaram uma maior produção de 2,3-butanodiol no pH 5,0, com 4,5 g/L. No presente trabalho foi observada uma produção de 3,84 g/L (Tabela 8) de 2,3-butanodiol para o valor 5,5 de pH. Desta forma, pode-se afirmar que valores mais baixos de pH do meio proporciona uma maior produção de 2,3-butanodiol. O mesmo ocorreu em trabalhos de outros autores como Meng *et al.* (2020), Kim *et al.* (2016) e Priya (2016).

5.4 Influência do pH controlado em diferentes valores (6,5; 6,0; 5,5 e 5,2) tendo como valor de partida o pH 7,0

Nos experimentos anteriores, controlando-se o pH em um valor desde o início da fermentação até o final, observou-se que valores de pH mais altos apresentaram maiores produtividades volumétricas em células e, também, maior produtividade em produto. Entretanto obtiveram-se baixos valores de fator de conversão de substrato em produto, sendo que menores valores de pH demonstraram ser mais eficientes na produção de 2,3-butanodiol. Para superar esse baixo crescimento celular de ensaios com o pH mais baixos, seguiu-se a estratégia de iniciar a fermentação com o pH 7,0 e, a partir do momento que este atingisse os valores 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2 passou-se a controlar o pH nestes respectivos valores. No gráfico da Figura 27 mostram-se os perfis da variação do pH para estes ensaios, incluindo o ensaio no qual controlou-se o pH em 7,0 desde o início da fermentação até o final, apresentado no item 5.2.

Nota-se que o sistema de controle automático de pH novamente foi efetivo, uma vez que houve pequenas variações em torno do valor desejado, que não comprometeram o processo.

Figura 27 – Perfil de variação do pH inicial da fermentação igual a 7,0 sem controle e com controle de pH a partir de 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2.

Fonte: Autoria própria.

O objetivo de iniciar a fermentação em pH 7,0, sem o controle no início, e controlar a partir do momento que os valores 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2 fossem atingidos foi alcançado. Como nos ensaios anteriores (item 5.2), o pH começou a subir ao fim da fermentação, indício que neste momento as células começam a utilizar o ácido produzido como fonte de carbono, devido ao consumo total de glicerol (PRATA, 1997). O ensaio com o pH 5,5 levou o maior tempo para o fim da fermentação, cerca de 47 horas de processo.

Controlando-se o pH em 7,0 durante toda a fermentação, obteve-se maior concentração celular em relação aos demais ensaios, como pode ser observado no gráfico da Figura 28. Mais uma vez percebe-se que maiores de valores de pH resultam um maior crescimento celular, semelhante aos ensaios do item anterior.

Figura 28 – Perfil de variação do crescimento celular durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca* com pH inicial da fermentação igual a 7,0, sem controle e com controle a partir de 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2.

Fonte: Autoria própria.

Quanto ao consumo de glicerol, os resultados das concentrações deste substrato no decorrer da fermentação estão exibidos no gráfico da Figura 29. O consumo de glicerol foi total para todos os ensaios, exceto para o ensaio com o pH 5,2. Pode-se observar que para este ensaio restou uma considerável quantidade de substrato no meio ($9,91 \pm 0,26$ g/L de glicerol). Em menores valores de pH a bactéria levou um maior tempo para o consumo total de glicerol.

No gráfico da Figura 30 têm-se os resultados para concentrações de 2,3-butanodiol. Pode-se notar que as maiores concentrações foram obtidas controlando-se o pH em 7,0 e 6,5 com $2,70 \pm 0,00$ e $2,64 \pm 0,03$ g/L, respectivamente, enquanto para os pH mais baixos $2,18 \pm 0,01$, $1,55 \pm 0,04$, $1,16 \pm 0,16$ para os pH 6,0, 5,5 e 5,2 respectivamente. Nota-se que para estes ensaios, diferentemente do ocorrido quando o pH foi controlado desde o início (item 5.2), quanto maior o valor de pH controlado maior foi a formação de 2,3-butanodiol, iniciando a fermentação em 7,0.

Figura 29 – Perfil de variação da concentração de glicerol durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca* com pH inicial em 7,0 sem controle e com controle a partir dos valores 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2.

Fonte: Autoria própria.

Figura 30 – Perfil de variação da concentração de 2,3-butanodiol durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca* com o pH inicial igual a 7,0 sem controle e com controle a partir de 6,5, 6,0, 5,5 e 5,2.

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 9 estão os dados de fator de conversão de substrato em células e em produto, produtividade volumétrica em células e produto, concentração final de células e 2,3-butanodiol obtidos nos ensaios com controle de pH desde o início da fermentação (item 5.2) e dos ensaios com o pH inicial igual a 7,0, sem controle de pH e com controle nos valores 6,5; 6,0; 5,5 e 5,2. Verifica-se que o pH 6,5 apresentou resultados similares de crescimento celular ($4,21 \pm 0,00$ g/L) quando se iniciou a fermentação em pH 7,0 e ao chegar em 6,5 manteve-se este até o final e quando se controlou em 6,5 desde o início ($4,28 \pm 0,00$ g/L). Quanto aos parâmetros $Y_{x/s}$, Q_x e Q_p estes também exibiram valores próximos para as duas estratégias. Com o pH 6,0 atingiu-se uma concentração final de células de $3,26 \pm 0,00$ g/L na estratégia de começar a fermentação em pH 7,0 sem controle e controlando posteriormente, sendo um pouco maior que $3,03 \pm 0,00$ g/L, o crescimento obtido controlando o pH desde o início. Apesar disto, a produtividade volumétrica em células foi menor, $0,07$ g/L.h iniciando com o pH 7,0, contra $0,12$ g/L.h. O ensaio iniciando a fermentação em 7,0 sem controle depois com controle quando o pH atingiu o valor 5,5 apresentou uma concentração celular final de $2,66 \pm 0,06$ g/L, semelhante à concentração de $2,64$ g/L quando se controlou o pH desde o início em 5,5, embora Q_x e $Y_{x/s}$ tenham sido menores para a primeira situação. A situação de iniciar o pH da fermentação em 7,0 sem

controle e depois controlar em 5,2 resultou uma menor concentração celular, assim como o fator de conversão de substrato em células e a produtividade volumétrica em células.

Contudo, no geral, a condição de iniciar o pH da fermentação em 7,0 sem controle e controlar após atingir um determinado valor de pH não foi vantajoso para a formação de 2,3-butanodiol, uma vez que a concentração final de produto foi menor para todos os casos em relação ao controle de pH desde o início. Possivelmente por começar em um pH neutro pode ter favorecido a produção de 1,3-propanodiol, para a qual é necessária a ação de duas enzimas: Glicerol desidratase e 1,3-propanodiol desidrogenase em pH neutro (VILLEGAS *et al.*, 2007; GOLIAS *et al.*, 2002). A via do lactato também acontece em pH neutro, com pouca regeneração de NADH_2 . Outra via existente tem como produto final o etanol, resultado da geração de acetil-CoA a partir de piruvato, que posteriormente é convertido em etanol, por ação das enzimas aldeído desidrogenase e álcool desidrogenase, tendo como faixa ideal o pH neutro (METSOVITI *et al.*, 2012; TRAN; YET-POLE; LIN, 2013).

Tabela 9 – Dados do fator de conversão de substrato em células e em produto, produtividade volumétrica em células e produto, concentração final de células e 2,3-butanodiol dos ensaios com controle de pH desde o início da fermentação e dos ensaios com o pH inicial igual a 7,0, sem controle de pH e com controle depois.

pH	pH inicial igual a 7,0 sem controle e com controle depois						pH controlado desde o início					
	Y _{x/s} (g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Q _x (g/L.h)	Q _p (g/L.h)	X _f (g/L)	But (g/L)	Y _{x/s} (g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Q _x (g/L.h)	Q _p (g/L.h)	X _f (g/L)	But (g/L)
7,0	0,09	0,07	0,20	0,27	4,63	2,71	0,09	0,07	0,20	0,27	4,63	2,71
6,5	0,07	0,06	0,16	0,17	4,21	2,64	0,08	0,08	0,15	0,18	4,28	3,43
6,0	0,05	0,05	0,07	0,18	3,26	2,17	0,04	0,09	0,12	0,20	3,03	3,64
5,5	0,03	0,03	0,02	0,08	2,66	1,55	0,03	0,10	0,08	0,12	2,64	3,84
5,2	0,03	0,03	0,06	0,04	2,71	1,16	0,04	0,08	0,12	0,12	2,925	3,33

Y_{x/s} – fator de conversão em células.

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

Y_{p/s} – fator de conversão em 2,3-butanodiol;

Q_x – produtividade volumétrica em células;

Q_p – produtividade volumétrica em produto.

Fonte: Autoria própria.

Desta forma, a melhor estratégia de controle de pH da fermentação durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca* para uma adequada produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol residual foi controlar o pH durante toda a fermentação em 6,0, o qual demonstrou-se como melhor combinação dos parâmetros cinéticos fermentativos, conseguindo apresentar ótimo fator de conversão de substrato em produto, junto com uma apropriada produtividade volumétrica em produto (Tabela 7). Assim, os ensaios fermentativos seguintes foram realizados controlando-se o pH em 6,0 durante toda a fermentação.

5.5 Avaliação dos ensaios em biorreator para analisar a estratégia de controle de pH

Como mencionado anteriormente, Romio (2014) estudou a fermentação para a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca*, utilizando glicerol como fonte de carbono, controlando o pH em valores próximos de 5 e 6 com tampão em agitador de bancada, empregando 40 g/L de glicerol inicial, também em regime descontínuo, e não detectou a formação de 2,3-butanodiol. No presente trabalho, aplicando-se o sistema de controle automático de pH conseguiu-se identificar a produção de 2,3-butanodiol com uma concentração inicial de glicerol de 40 g/L. Romio (2014) testou a concentração inicial de glicerol de 60 g/L nas mesmas condições e verificou uma produção de 6,9 g/L de 2,3-butanodiol. Assim, para comprovar a efetividade do sistema de controle automático de pH adotado neste trabalho, realizaram-se ensaios fermentativos empregando-se 60 g/L de glicerol, controle de pH em 6,0, em frascos Erlenmeyer de 1,0 L.

Os resultados para o crescimento celular, consumo de substrato, produção de 2,3-butanodiol e pH no decorrer da fermentação estão apresentados no gráfico da Figura 31. O sistema de controle de pH possibilitou um efetivo controle, mantendo o pH no valor desejado. Observa-se um crescimento celular contínuo até 8 horas de fermentação, a partir deste momento a bactéria entre em uma fase estacionária, sendo que ao fim da fermentação a concentração celular foi de $3,37 \pm 0,12$ g/L. Houve a produção de 2,3-butanodiol com concomitante consumo de substrato. A bactéria cessou a formação de 2,3-butanodiol por volta de 40 horas de processo, com $10,96 \pm 0,02$ g/L. A fermentação durou 52 horas, com consumo total de glicerol. Estes resultados demonstram a efetividade do sistema de controle automático de pH em frascos, uma vez que a produção de 2,3-butanodiol foi de 10,95 g/L, sendo maior que a concentração de 6,9 g/L observada por Romio (2014).

Figura 31– Perfil de variação da concentração celular, de concentração de glicerol, de 2,3-butanodiol e de pH durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com 60 g/L de glicerol como fonte de carbono, sob pH controlado em 6,0 em frascos Erlenmeyer a 37 °C.

Fonte: Autoria própria.

Em seguida foram realizados ensaios em biorreator STR (BioFLO III, New Brunswick Sci. Co.) empregando-se as mesmas condições que foram utilizadas nos frascos (60 g/L de glicerol e com controle de pH em 6,0), com o objetivo de avaliar-se a estratégia de controle de pH em frascos era representativa da estratégia de controle no biorreator. O gráfico da Figura 32 permite analisar o desenvolvimento da fermentação em biorreator, quanto o crescimento celular, consumo de glicerol, produção de 2,3-butanodiol e pH. Foi também realizada a análise de variância dos resultados para os dois sistemas (frasco e biorreator) em função da concentração celular final, de 2,3-butanodiol e de produto, assim como em função dos parâmetros fermentativos: $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_x e Q_p . Os resultados estão apresentados na Tabela 10. Foi ainda realizado o teste de média (Tuckey, $p < 0,05$) dos resultados obtidos nos ensaios em frascos e nos ensaios em biorreator, estando os resultados apresentados na Tabela 11.

Nota-se um crescimento celular contínuo até por volta de 8 horas de cultivo, entrando numa fase estacionária de crescimento, com concentração celular final de

3,38 $\pm$ 0,09 g/L e, segundo os dados da Tabela 11 não houve diferença significativa entre a concentração final de células para os ensaios em frascos e biorreator, a 5% de probabilidade. O mesmo é notado para o consumo de glicerol, que, por volta de 52 horas de fermentação, a concentração foi igual à zero, não se identificando diferença significativa para os dois sistemas, quanto ao consumo de glicerol.

Figura 32 – Perfil de variação da concentração celular, de glicerol, de 2,3-butanodiol e de pH durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com 60 g/L de glicerol como fonte de carbono, sob pH controlado em 6,0 em biorreator a 37 °C.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10 – Análise de Variância (ANOVA) para os dois sistemas (Frasco e Biorreator) em função da concentração final celular, de 2,3-butanodiol, de glicerol e dos para parâmetros fermentativos Yx/s, Yp/s, Qx, Qp.

Variáveis respostas	Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p-valor
X _f	Sistema	0,00003	1	0,00003	0,3	0,647821*
concentração	Erro	0,00018	2	0,00009		
celular final	Erro	0,00020	3			
	Total					
But	Sistema	0,0002	1	0,0002	0,3	0,630115*
concentração	Erro	0,0011	2	0,0006		
final de	Erro	0,0013	3			
2,3-butanodiol	Total					
S _f concentração	Sistema	0,000188	1	0,000188	0,2129	0,689853*
final de	Erro	0,001768	2	0,000884		
substrato	Erro	0,001956	3			
	Total					
Yx/s fator de	Sistema	0,000000	1	0,000000	0,3	0,647821*
conversão de	Erro	0,000000	2	0,000000		
substrato em	Erro	0,000000	3			
células	Total					
Yp/s fator de	Sistema	0,000000	1	0,000000	0,3	0,630115*
conversão de	Erro	0,000000	2	0,000000		
substrato em	Erro	0,000000	3			
produto	Total					
Qx	Sistema	0,000000	1	0,000000	0,3	0,647821*
produtividade	Erro	0,000001	2	0,000000		
volumétrica em	Erro	0,000001	3			
células	Total					
Qp	Sistema	0,000000	1	0,000000	0,3	0,630115*
produtividade	Erro	0,000000	2	0,000000		
volumétrica em	Erro	0,000001	3			
produto	Total					

*não significativo a 95% de confiança.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 – Tabela comparativa entre os dados da concentração final de células, de 2,3-butanodiol, da glicerol e dos parâmetros fermentativos: fator de conversão de substrato em células e em produto, produtividade volumétrica em células e produto do cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com 60 g/L de glicerol inicial, controlando o pH da fermentação em 6,0 em frasco e biorreator.

Sistema	X _f (g/L)	But (g/L)	S _f (g/L)	Y _{x/s} (g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Q _x (g/L.h)	Q _p (g/L.h)
Frasco	3,37±0,13*	10,96±0,02*	0±0,00*	0,04±0,00*	0,18±0,00*	0,21±0,00*	0,22±0,00*
Biorreator	3,38±0,00*	10,94±0,00*	0±0,00*	0,04±0,00*	0,18±0,00*	0,21±0,00*	0,22±0,00*

Médias seguidas pelo * entre colunas não diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

X_f – Concentração celular final;

But – Concentração final de 2,3-butanodiol;

S_f – Concentração de substrato final;

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

Y_{p/s} – fator de conversão em 2,3-butanodiol;

Q_x – produtividade volumétrica em células;

Q_p – produtividade volumétrica em produto.

Fonte: Autoria própria.

A produção de 2,3-butanodiol nos ensaios realizados no biorreator foi semelhante aos ensaios desenvolvidos nos frascos, no qual foi detectado $10,94 \pm 0,00$ g/L do produto, não se diferenciando significativamente da concentração de $10,96 \pm 0,02$ g/L de 2,3-butanodiol para os ensaios em frascos. Os parâmetros fermentativos calculados para os dois sistemas (Frasco e Biorreator) também estão apresentados na Tabela 11. De modo geral, não houve diferença significativa entre os parâmetros fermentativos dos dois sistemas. A comparação dos perfis cinéticos, quanto o crescimento celular, consumo de substrato e formação de 2,3-butanodiol entre os ensaios realizados em frascos e em biorreator está apresentada nos gráficos da Figura 32. Nota-se uma semelhança no crescimento da biomassa para ambos os sistemas, os quais apresentaram um crescimento contínuo até por volta das 8 horas de fermentação, como mostrado nos gráficos anteriores (Figura 31 e Figura 32). Quanto à dinâmica do consumo de glicerol, esta semelhança foi ainda mais nítida, como pode ser verificado no gráfico da Figura 33b, com pontos até mesmo coincidentes em determinados tempos. Da mesma forma ocorreu para a formação de 2,3-butanodiol, exibida na Figura 33.c, sendo que em certos pontos a concentração foi idêntica.

O mesmo é observado quando se analisa as velocidades específicas de crescimento, consumo de glicerol e formação de produto dos dois sistemas, que podem ser visualizadas nos correspondentes gráficos (a), (b) e (c) da Figura 34. A velocidade específica de crescimento no início das fermentações em frasco e biorreator demonstraram-se próximas com $0,61 \text{ h}^{-1}$ e $0,67 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Apesar desta ligeira diferença no início das

fermentações, os pontos coincidiram ao longo do tempo para os ambos os sistemas. Nota-se um decaimento da μ_x nas horas seguintes, chegando próximas a zero, a partir de 10 horas, justamente quando se observou a bactéria entrando em uma fase estacionária de crescimento celular (Figura 33 a). As velocidades específicas de consumo de substrato, assim como de formação de produto para os dois sistemas também foram semelhantes no decorrer do processo, diminuindo ao longo da fermentação (Figura 34.b e c). Observa-se até uma sobreposição das curvas dos dois sistemas em determinados períodos.

Figura 33 – Perfil de variação da concentração celular (a), de glicerol (b), de 2,3-butanodiol (c) durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com 60 g/L de glicerol como única fonte de carbono, sob pH controlado em 6,0

Fonte: Autoria própria.

Figura 34 – Velocidades específicas de formação de células (a), velocidades de consumo de substrato (b) e formação de produto (c) em função do tempo durante o cultivo de *Klebsiella oxytoca*, com 60 g/L de glicerol como única fonte de carbono, sob pH controlado em 6,0 em frasco e biorreator.

Fonte: Autoria própria.

Esses resultados revelam a eficácia do sistema de controle automático de pH aplicado em frascos estudado neste trabalho, tendo sido possível obter resultados semelhantes, sem diferença significativa entre as fermentações realizadas em frascos e em biorreator. O uso de biorreatores de bancada com sistemas automatizados para o controle dos parâmetros operacionais, tal como o pH, facilita a operação dos processos fermentativos, mas, normalmente, demanda maior quantidade de insumos e impede a realização de vários ensaios em simultâneo. No entanto, o uso de frascos de Erlenmeyer permite a execução de vários ensaios, mas dificulta o controle dos parâmetros operacionais. Desta forma, os resultados deste trabalho mostram uma efetiva alternativa para o controle de pH em frascos, aplicando um sistema de controle de pH automático, sem a necessidade de utilizar tampões, que correspondem a uma baixa precisão de controle. O sistema de controle de pH automático

aplicado no frasco Erlenmeyer para o cultivo de *Klebsiella oxytoca*, possibilitou uma representatividade do biorreator em frasco.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho demonstram que *Klebsiella oxytoca* NRRL B-199 é capaz de metabolizar o glicerol residual como substrato em processos fermentativos, com crescimento celular e consumo de substratos similares aos encontrados na literatura.

A avaliação do comportamento da bactéria *Klebsiella oxytoca* em diferentes situações de pH inicial da fermentação sem o controle de pH durante seu crescimento e o consumo de glicerol residual foi importante para observar diferentes respostas para a concentração celular, consumo de glicerol e pH em cada processo. A fermentação com o pH inicial em 7 mostrou com um melhor resultado para a produção de biomassa, atingindo $1,62 \pm 0,03$ g/L ao fim da fermentação, entretanto os pHs iniciais mais baixos apresentaram melhores rendimentos de na produção de 2,3-butanodiol, no qual o pH inicial igual a 5,5 exibiu maior rendimento de $2,71 \pm 0,03$ g/L. Todavia não é possível realizar a fermentação sem o devido controle de pH do meio.

O controle do pH do meio desde início se mostrou a melhor alternativa para obter melhores rendimentos na produção de 2,3-butanodiol. O controle de pH da fermentação desde o início em 6,0 apresentou melhores resultados para o rendimento e produtividade volumétrica de 2,3-butanodiol comparado aos demais valores (7,0; 6,5; 6,0, 5,5 e 5,2), com uma produção de $3,64 \pm 0,00$ g/L do produto a partir de 40 g/L de substrato.

Os ensaios em que se controlou o pH, a partir de um mesmo valor não se mostrou uma boa estratégia, devido ao baixo crescimento celular e produção de 2,3-butanodiol. Pode-se afirmar que a implantação do sistema de controle automático de pH obteve um resultado muito satisfatório, com uma variação em torno do valor desejado que não compromete o processo. Além disso, as fermentações realizadas em frascos aplicando o sistema de controle automático de pH, não apresentaram diferença significativa em relação às fermentações em biorreator, apontando a eficácia do sistema em repetir as mesmas condições oferecidas em um biorreator, em relação ao controle de pH.

Como perspectivas para continuidade desta pesquisa, sugere-se a otimização da concentração inicial de glicerol, da transferência de oxigênio e da concentração celular inicial. Além disso, visando a ampliação de escala, será importante definir uma fonte de nitrogênio alternativa, tendo em vista o alto custo do extrato de levedura.

REFERÊNCIAS

ALGOUFI, Y. T. *et al.* Upgrading of glycerol from biodiesel synthesis with dimethyl carbonate on reusable Sr–Al mixed oxide catalysts. **Energy Conversion and Management**, v. 138, p. 183-189, 2017.

ANP– AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Boletim de produção – sistema de movimentação de produtos da anp. Setembro 2019. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>. Acesso em: 10 dez. 2020.

ANVARI, M.; SAFARI MOTLAGH, M.R. Enhancement of 2, 3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* PTCC 1402. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.

ARDI, M. S.; AROUA, M. K.; HASHIM, N. Awanis. Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1164-1173, 2015.

ARESTA, M.; DIBENEDETTO, A.; DUMEIGNIL, F. **Biorefinery: from biomass to chemicals and fuels**. 1st ed. Bari: Walter de Gruyter, 2012. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=ptB;lr=;id=_PIC9EuTo6wC;oi=fnd;pg=PR13;dq=+ARESTA,+M.%3B+DIBENEDETTO,+A.%3B+DUMEIGNIL,+Franck+\(Ed.\).+Biorefinery:+from+biomass+to+chemicals+and+fuels.+Walter+de+Gruyter,+2012.;ots=XvthDFgd77;sig=5gFZ5F79DF3oFdh2x_zJmILbNBs#v=onepage;q;f=false](https://books.google.com.br/books?hl=ptB;lr=;id=_PIC9EuTo6wC;oi=fnd;pg=PR13;dq=+ARESTA,+M.%3B+DIBENEDETTO,+A.%3B+DUMEIGNIL,+Franck+(Ed.).+Biorefinery:+from+biomass+to+chemicals+and+fuels.+Walter+de+Gruyter,+2012.;ots=XvthDFgd77;sig=5gFZ5F79DF3oFdh2x_zJmILbNBs#v=onepage;q;f=false). Acesso em: 08 set. 2019.

BART, J. C. J.; PALMERI, N.; CAVALLARO, S. Valorisation of the glycerol by-product from biodiesel production. **Biodiesel Science and Technology**, p.571–624, 2010.

BECKER, L. C. *et al.* Safety assessment of glycerin as used in cosmetics. **International journal of toxicology**, v. 38, n. 3, p. 6S-22S, 2019. Suppl.

BIAŁKOWSKA, A. M. Strategies for efficient and economical 2, 3-butanediol production: new trends in this field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 200, 2016.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*—batch and continuous culture studies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18-26, 2001.

BRANDUARDI, P. *et al.* Microbial n-butanol production from *Clostridia* to non-Clostridial hosts. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 1, p. 16-26, 2014.

BRISSE, S.; GRIMONT, Fa.; GRIMONT, P. A. D. The genus *Klebsiella*. **The prokaryotes**, v. 6, p. 159-196, 2006.

BRYN, K.; ULSTRUP, J.C.; STØRMER, 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 25, n. 3, p. 511-512, 1973.

CAVALCANTE, F. M.; PRATA, A.M.R. Desenvolvimento de um sistema de controle de pH em frascos para a produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca* a partir da glicerina residual. **Relatório Programa Unificado de Bolsas**. Pró-Reitoria de Graduação-Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2017.

CELÍŃSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2, 3-butanediol—current state and prospects. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 715-725, 2009.

CHAMPLUVIER, B.; DECALLONNE, J.; ROUXHET, P.G. Influence of sugar source (lactose, glucose, galactose) on 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199. **Archives of microbiology**, v. 152, n. 5, p. 411-414, 1989.

CHENG, Ke-Ke. *et al.* Improved 2,3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 613-616, 2010.

CHENG, Ke-Ke *et al.* Effects of pH and dissolved CO₂ level on simultaneous production of 2,3-butanediol and succinic acid using *Klebsiella pneumoniae*. **Bioresource technology**, v. 135, p. 500-503, 2013.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy conversion and management**, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.

CHO, S. *et al.* High production of 2, 3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 146, 2015.

CHOL, C. G. *et al.* Purification of crude glycerol derived from biodiesel production process: experimental studies and techno-economic analyses. **Fuel Processing Technology**, v. 178, p. 78-87, 2018.

CLOMBURG, J.M.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 20-28, 2013.

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, 2003.

CORNEJO, A. *et al.* Oxygenated fuel additives from glycerol valorization. Main production pathways and effects on fuel properties and engine performance: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1400-1413, 2017.

DANTAS, J. Síntese, caracterização e performance catalítica de nanoferritas mistas submetidas a reação de transesterificação e esterificação via rota metálica e etílica para biodiesel. **Matéria, Rio de Janeiro**, v. 21, n. 4, p. 1080-1093, 2016.

DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

DA SILVA, G. P.; DE LIMA, C. J. B.; CONTIERO, J. Production and productivity of 1, 3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. **Catalysis Today**, v. 257, p. 259-266, 2015.

DE OLIVEIRA, N. M. L. *et al.* Reaproveitamento de resíduos da cadeia do biodiesel obtido a partir do óleo de palma (elaeis guineenses). **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 7, n. 1, 2017. ISSN: 2236-9171

DE PAULA, A. A.; RODRIGUES, F. G. M.; MENDES, M.F. Avaliação técnica de diferentes processos de separação para purificação do glicerol como subproduto-revisão. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 6, n. 5, 2017.

DRABO, P. *et al.* Anionic extraction for efficient recovery of biobased 2,3-butanediol—a platform for bulk and fine chemicals. **ChemSusChem**, v. 10, n. 16, p. 3252-3259, 2017.

DROŹDŹYŃSKA, A. *et al.* Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei*—newly isolated strains from the Enterobacteriaceae. **New biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 402-410, 2014.

DUAN, H.; YAMADA, Y.; SATO, S. Future prospect of the production of 1, 3-butadiene from butanediols. **Chemistry Letters**, v. 45, n. 9, p. 1036-1047, 2016.

FONSECA, G. G. *et al.* The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339-354, 2008.

FRAZER, F. R.; MCCASKEY, T. A. Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2, 3-butanediol. **Biomass**, v. 18, n. 1, p. 31-42, 1989.

GARCIA, A. D. **Produção fermentativa de 2, 3-butanodiol a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto**. 2006. 114 p. Tese (Doutorado em Ciências)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

GARG, S. K.; JAIN, A. Fermentative production of 2, 3-butanediol: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 2-3, p. 103-109, 1995.

GARLAPATI, V. K.; SHANKAR, U.; BUDHIRAJA, A. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 9-14, 2016.

GAYATHRI, G.; SRINIKETHAN, G. Crude glycerol as a cost-effective carbon source for the production of cellulose by *K. saccharivorans*. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 16, p. 326-330, 2018.

GEBREMARIAM, S.N.; MARCHETTI, J. M. Economics of biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 168, p. 74-84, 2018.

GOLIAS, H. *et al.* Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with

thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*. **Journal of biotechnology**, v. 96, n. 2, p. 155-168, 2002.

GOMBERT, A. K. Cinética de Processos Fermentativos - Apêndice. In: SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Coords. **Biotecnologia Industrial-Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2, p. 93-122.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 442-446, 2004.

GRÄFJE, H. *et al.* Butanediols, butenediol, and butynediol. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Wiley Oline Library; Wiley-VCH7, 2000. p. 1-12.

GUO, X. *et al.* Efficient production of 2, 3-butanediol from cheese whey powder (CWP) solution by *Klebsiella pneumoniae* through integrating pulsed fed-batch fermentation with a two-stage pH control strategy. **Fuel**, v. 203, p. 469-477, 2017.

GURAGAIN, Y. N.; VADLANI, P. V. 2, 3-Butanediol production using *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724: evaluation of biomass derived sugars and fed-batch fermentation process. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 25-34, 2017.

HAN, S-H. *et al.* Production of 2, 3-butanediol by a low-acid producing *Klebsiella oxytoca* NBRF4. **New biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 166-172, 2013.

HAKIZIMANA, O.; MATABARO, E.; LEE, B. H. The current strategies and parameters for the enhanced microbial production of 2, 3-butanediol. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00397, 2020

HAZEENA, S. H. *et al.* Response Surface Modeling and Optimization of Culture Media in Fermentative Production of 2, 3-butanediol. **Journal of Energy and Enviromental Sustainability**, n.7, p. 27-31, 2019.

HEJNA, A. *et al.* The influence of crude glycerol and castor oil-based polyol on the structure and performance of rigid polyurethane-polyisocyanurate foams. **Industrial crops and products**, v. 95, p. 113-125, 2017.

IRENA. International Renewable Energy Agency. (2020). Global renewables outlook: energy transformation 2050. Disponível em: <https://www.irena.org/publications/2020/Apr/Global-Renewables-Outlook-2020>. Acesso em: 01 dez. 2020.

JACKSON, E.; RIPOLL, M.; BETANCOR, L. Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 12, p. e926, 2019.

JANSEN, N. B.; FLICKINGER, M. C.; TSAO, G. T. Production of 2, 3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnology and bioengineering**, v. 26, n. 4, p. 362-369, 1984.

JANTAMA, K. *et al.* Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2, 3-butanediol by a combined deletion of alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* in mineral salts medium. **Metabolic engineering**, v. 30, p. 16-26, 2015.

JI, X.J.; HUANG, H.; OUYANG, P.K. Microbial 2, 3-butanediol production: a state-of-the-art review. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 351-364, 2011.

JIANG, L-Q. *et al.* Production of 2, 3-butanediol from acid hydrolysates of Jatropha hulls with *Klebsiella oxytoca*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 405-410, 2012.

JOHNSON, E.E.; REHMANN, L. The role of 1, 3-propanediol production in fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*. **Bioresource technology**, v. 209, p. 1-7, 2016.

KIM, D.K. *et al.* Metabolic engineering of a novel *Klebsiella oxytoca* strain for enhanced 2,3-butanediol production. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 186-192, 2013.

KIM, D.K. *et al.* Kinetic modeling of substrate and product inhibition for 2, 3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 94-100, 2016.

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.

KOUTINAS, A. A. *et al.* Techno-economic evaluation of a complete bioprocess for 2,3-butanediol production from renewable resources. **Bioresource Technology**, p. 55–64, 2016.

KUMAR, V. *et al.* Effects of mutation of 2, 3-butanediol formation pathway on glycerol metabolism and 1, 3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* J2B. **Bioresource technology**, v. 214, p. 432-440, 2016.

KUMAR, V.; PARK, S. Potential and limitations of *Klebsiella pneumoniae* as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 1, p. 150-167, 2018.

LEE, S. J. *et al.* Effect of crude glycerol-derived inhibitors on ethanol production by *Enterobacter aerogenes*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 35, n. 1-2, p. 85-92, 2012.

LE DUY, A.; ZAJIC, J. E. A Geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 4, p. 805-810, 1973.

LEONE, S. *et al.* Structure of the iron-binding exopolysaccharide produced anaerobically by the gram-negative bacterium *Klebsiella oxytoca* BAS-10. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2007, n. 31, p. 5183-5189, 2007.

LIU, J. *et al.* Combining metabolic engineering and biocompatible chemistry for high-yield production of homo-diacetyl and homo-(S, S) -2, 3-butanediol. **Metabolic engineering**, v. 36, p. 57-67, 2016.

MAERVOET, V. *et al.* Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1, 3-propanediol using metabolic engineering. **Organic Process Research ; Development**, v. 15, n. 1, p. 189-202, 2010.

MAHLIA, T. M. I. *et al.* Patent landscape review on biodiesel production: Technology updates. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 118, p. 109526, 2020.

MITREA, L. *et al.* Isolated microorganisms for bioconversion of biodiesel-derived glycerol into 1, 3-propanediol. **Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca-Food Sci. Technol**, v. 74, p. 43-49, 2017.

MCCORMICK, K.; KAUTTO, N. The bioeconomy in Europe: An overview. **Sustainability**, v.5, n.6, p.2589-2608, 2013.

MCNUTT, J. *et al.* Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 63-76, 2017.

MENDES, F. **Production of glycerol and 1,3-propanediol from renewable resources: study of new biocatalysts and process strategies**. 2011. 302 p. Dissertação (Pós-doutorado)–Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Lisboa, Portugal, 2011.

MENEGHETTI, S. P.; MENEGHETTI, M. R.; BRITO, Y. C. A reação de transesterificação, algumas aplicações e obtenção de biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 63-73, 2013.

MENG, W. *et al.* Efficient 2, 3-butanediol production from whey powder using metabolically engineered *Klebsiella oxytoca*. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2020.

METSOVITI, M. *et al.* Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. **Journal of biotechnology**, v. 163, n. 4, p. 408-418, 2013.

a-METSOVITI, M. *et al.* Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1872-1882, 2012.

METSOVITI, M. *et al.* Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 1, p. 57-68, 2012.

MITREA, L.; VODNAR, D. C. *Klebsiella pneumoniae*—a useful pathogenic strain for biotechnological purposes: diols biosynthesis under controlled and uncontrolled pH levels. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 293, 2019.

MITREA, L. *et al.* Utilization of biodiesel derived-glycerol for 1, 3-PD and citric acid production. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 190, 2017.

MONTEIRO, M. R. *et al.* Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 88, p. 109-122, 2018.

MOTA, C. J. A.; PINTO, B. P. Transformações catalíticas do glicerol para inovação na indústria química. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 135, 2017.

NGUYEN, N. T. T. *et al.* Production of 1, 3-butadiene in one step catalytic dehydration of 2, 3-butanediol. **Catalysis Today**, v. 323, p. 62-68, 2019.

NIH – NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PUBCHEM DATABASE. Glycerol, CID=753. Julho 2019. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycerol>. Acesso em: 2 jul. 2019.

NWACHUKWU, R. ES. *et al.* Bioconversion of glycerol to ethanol by a mutant *Enterobacter aerogenes*. **AMB express**, v. 2, n. 1, p. 20, 2012.

PACHAPUR, V. L. *et al.* Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. **Bioresource technology**, v. 193, p. 297-306, 2015.

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, n. 6, p. 613-620, 2000.

PERUSSI, H. S.; PRATA, A.M.R. Implantação de um sistema de controle automático de pH em frascos para experimentos de produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca*. **Relatório Iniciação Científica**. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo, 2019.

PETROV, K.; PETROVA, P. Enhanced production of 2, 3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 943-949, 2010.

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

PITT, F.D.; DOMINGOS, A.M.; BARROS, AA. C. Purification of residual glycerol recovered from biodiesel production. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 42-51, 2019.

PRATA, A.M.R. **Obtenção de 2,3-Butanodiol a Partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto em Regime Descontínuo Alimentado**. 1997. 125f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PRIYA, A. *et al.* Microbial production of 2, 3-butanediol through a two-stage pH and agitation strategy in 150 l bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 159-167, 2016.

POLADYAN, A. *et al.* Oxidative and reductive routes of glycerol and glucose fermentation by *Escherichia coli* batch cultures and their regulation by oxidizing and reducing reagents at different pHs. **Current microbiology**, v. 66, n. 1, p. 49-55, 2013.

POSADA, J. A.; RINCÓN, L. E.; CARDONA, C. A. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: addressing the glycerol problem. **Bioresource technology**, v. 111, p. 282-293, 2012.

RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. Basic biotechnology. New York: **Cambridge University Press**, 2006. p. 66-69.

RIPOLL, V. *et al.* High 2, 3-butanediol production from glycerol by *Raoultella terrigena* CECT 4519. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 4, p. 685-692, 2020.

ROMIO, T. **Produção de 2, 3-Butanodiol a partir de glicerol por *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724**. 2015. 74 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)– Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2015.

RUSSMAYER, H. *et al.* Spotlight on biodiversity of microbial cell factories for glycerol conversion. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, 2019.

SABRA, W. *et al.* Biofuels and bioenergy: microbial production of 2,3-butanediol. **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 87-97.

SANTOS, D. de A. *et al.* Butanediol production from glycerol and glucose by *Serratia marcescens* isolated from tropical peat soil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101615, 2020.

SARATALE, G.D.; JUNG, M.; OH, M. Reutilization of green liquor chemicals for pretreatment of whole rice waste biomass and its application to 2, 3-butanediol production. **Bioresource technology**, v. 205, p. 90-96, 2016.

SARCHAMI, T.; JOHNSON, E.; REHMANN, L. Optimization of fermentation condition favoring butanol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum* DSM 525. **Bioresource technology**, v. 208, p. 73-80, 2016.

SCHULTZ, E. L.; DE SOUZA, D. T.; DAMASO, M. C. T. The glycerol biorefinery: a purpose for Brazilian biodiesel production. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2014.

SCHMIDELL, W. Agitação e Aeração em Biorreatores. In: Schmidell, M., Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W. (Eds.), *Biotecnologia Industrial, Engenharia Bioquímica*, vol. 2. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, pp. 277–331. 2001.

SONG, C. W. *et al.* Microbial production of 2, 3-butanediol for industrial applications. **Journal of industrial microbiology biotechnology**, v. 46, n. 11, p. 1583-1601, 2019.

SONG, D. Modeling of a Pilot-Scale Fixed-Bed Reactor for Dehydration of 2,3-Butanediol to 1, 3-Butadiene and Methyl Ethyl Ketone. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 72, 2018.

STORMER, F. C. 2, 3-Butanediol biosynthetic system in *Aerobacter aerogenes*. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, v. 41, n. 1 p. 518-533, 1975.

STRACKE, M. *et al.* Biodiesel production process: valorization of the crude glycerol constituents/Processo de produção de biodiesel: valorização dos constituintes do glicerol bruto. **Brazilian Journal of Development**, v. 4, n. 6, p. 3401-3416, 2018.

SUN, D. *et al.* Glycerol hydrogenolysis into useful C3 chemicals. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 193, p. 75-92, 2016.

SUN, D. *et al.* Production of 1, 3-butadiene from biomass-derived C4 alcohols. **Fuel Processing Technology**, v. 197, p. 106193, 2020.

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

TAO, W. *et al.* Homoethanol Production from Glycerol and Gluconate Using Recombinant *Klebsiella oxytoca* Strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 85, n. 5, p. e02122-18, 2019.

THAPA, L. P. *et al.* Co-fermentation of carbon sources by *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007 to enhance the production of bioethanol. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 6, p. 1073-1084, 2014.

TRAN, A. V.; CHAMBERS, R. P. The dehydration of fermentative 2,3-butanediol into methyl ethyl ketone. **Biotechnology and bioengineering**, v. 29, n. 3, p. 343-351, 1987.

TRAN, D.; YET-POLE, I.; LIN, C. Developing co-culture system of dominant cellulolytic *Bacillus* sp. THLA0409 and dominant ethanolic *Klebsiella oxytoca* THLC0409 for enhancing ethanol production from lignocellulosic materials. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 5, p. 762-769, 2013.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH-TMR. 2,3-Butanediol Market (Application: Intermediate Chemicals, Plastics, Food Additives, Cosmetics, and Others [Pesticides and Anti-freeze Agents]) - Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast, 2020-2030. Disponível em: <https://www.transparencymarketresearch.com/2-3-butanediol-market.html> . Acesso em: 11 dez. 2020

TRCHOUNIAN, K. *et al.* Glycerol and mixture of carbon sources conversion to hydrogen by *Clostridium beijerinckii* DSM791 and effects of various heavy metals on hydrogenase activity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p. 7875-7882, 2017.

TRIVEDI, M. K. *et al.* Phenotypic and biotypic characterization of *Klebsiella oxytoca*: An impact of biofield treatment. **Microbial Biochemical Technology**, v. 7, n. 4, p. 202-205, 2015.

VASSILEV, N. *et al.* Potential application of glycerol in the production of plant beneficial microorganisms. **Journal of industrial microbiology biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 735-743, 2017.

VELOCH, M. *et al.* 2,3-butanediol. **Pract of Biotechnol Curr Commod Prod**, v. 3, p. 933-947, 1985.

VIKROMVARASIRI, N. *et al.* Microbial dynamics in ethanol fermentation from glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 15667–15673, 2016.

VILLEGAS, C.G. *et al.* Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol by *Klebsiella oxytoca* NRTL B-199: Study of product inhibition. **Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 131, p. S102, 2007.

XIU, Z-L. *et al.* Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, n. 1, p. 42-52, 2007.

WESTBROOK, A.W. *et al.* Strain engineering for microbial production of value-added chemicals and fuels from glycerol. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 1, p. 538-568, 2018.

WOJTUSIK, M. *et al.* 1, 3-Propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 100-107, 2015.

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, X.B. *et al.* Enhanced hydrogen production from xylose and bamboo stalk hydrolysate by overexpression of xylulokinase and xylose isomerase in *Klebsiella oxytoca* HP1. **International journal of hydrogen energy**, v. 39, n. 1, p. 221-230, 2014.

YANG, C. *et al.* Fed-batch fermentation of recombinant *Citrobacter freundii* with expression of a violacein-synthesizing gene cluster for efficient violacein production from glycerol. **Biochemical engineering journal**, v. 57, p. 55-62, 2011.

YANG, T. *et al.* Enhanced 2, 3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 122, 2015.

YANG, Z.; ZHANG, Z. Recent advances on production of 2, 3-butanediol using engineered microbes. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 4, p. 569-578, 2019.

YANG, D. *et al.* Systems metabolic engineering as an enabling technology in accomplishing sustainable development goals. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1254-1258, 2017.

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.

YOON, Y. G.; SONG, D.S.; LEE, C.J. Process Design for production of 1,3-Butadiene and Methyl Ethyl Ketone from Dehydration of 2, 3-Butanediol. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 40, n. 1, p. 403-408, 2017.

ZHANG, G. *et al.* Influence of blocking of 2, 3-butanediol pathway on glycerol metabolism for 1, 3-propanediol production by *Klebsiella oxytoca*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 1, p. 116-128, 2012.

ZHANG, Y. *et al.* Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. **Metabolic engineering**, v. 11, n. 2, p. 101-106, 2009.

ZHENG, Q. *et al.* Mechanistic study of the catalytic conversion of 2,3-butanediol to butenes. **Journal of Catalysis**, v. 360, p. 221-239, 2018.