



PRODUÇÃO DE (2R,3R)-BUTANODIOL POR *Paenibacillus polymyxa* PM 3605
UTILIZANDO SUBSTRATOS ALTERNATIVOS COMO FONTES DE CARBONO

Daniel Tinôco Campos Neto

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química (COPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire
Leda dos Reis Castilho

Rio de Janeiro
Outubro de 2017

PRODUÇÃO DE (2R,3R)-BUTANODIOL POR *Paenibacillus polymyxa* PM 3605
UTILIZANDO SUBSTRATOS ALTERNATIVOS COMO FONTES DE CARBONO

Daniel Tinôco Campos Neto

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof^a. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

Prof^a. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

Dr. Antônio Carlos de Oliveira Machado, D.Sc.

Prof^a. Lucy Seldin, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

OUTUBRO DE 2017

Tinôco, Daniel Campos Neto

Produção de (2R,3R)-butanodiol por *Paenibacillus polymyxa* PM 3605 utilizando substratos alternativos como fontes de carbono / Daniel Tinôco Campos Neto. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

XXII, 123 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Leda dos Reis Castilho

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 112-123.

1. Produção de 2,3-butanodiol. 2. Glicerol residual. 3. Melão residual. 4. Levantamento tecnológico. I. Freire, Denise Maria Guimarães *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Aos meus pais, Mildes e Éder, que nunca pouparam esforços para tornarem realidade todos os meus sonhos, sobretudo, relacionados à vida acadêmica.

“Aprendi, através da experiência amarga, a suprema lição: controlar minha ira e torná-la como o calor que é convertido em energia. Nossa ira controlada pode ser convertida numa força capaz de mover o mundo.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir sonhar o Seu sonho, que também é meu, em minha vida acadêmica e profissional.

Às agências de fomento, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por quem devo à minha formação profissional e minha decisão em me tornar um pesquisador-professor na área de Engenharia Química, com ênfase em bioprocessos.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), à COPPE e ao Programa de Engenharia Química (PEQ), pela oportunidade de aprendizado, de construção do conhecimento e de formação complementar dos principais valores que o profissional de Engenharia Química deve possuir.

Ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) e ao Instituto de Química da UFRJ, por terem proporcionado toda a estrutura física e todo o conhecimento, necessários ao desenvolvimento desta pesquisa de mestrado, bem como por favorecer o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À Professora Denise Freire, por quem guardo uma admiração especial, sobretudo, devido à sua confiança para comigo e ao seu profissionalismo em cada uma das etapas deste trabalho. Agradeço, especialmente, por me defender perante às injustiças, muitas vezes, presentes no ambiente acadêmico, como resultado dessa confiança estabelecida entre orientador-aluno.

À Professora Leda, por ter sido a primeira a me receber e, assim, ter sido a responsável por me introduzir no caminho que percorri e continuarei a trilhar no universo científico.

À Professora Lucy Seldin e à Doutora Renata, pela disponibilidade constante em sanar minhas dúvidas em relação à investigação realizada, bem como pela total presteza no fornecimento do micro-organismo usado neste trabalho, sem o qual não seria possível a realização desta pesquisa. Agradeço, ainda, por toda confiança.

À Doutora Aline de Castro, pela confiança e profissionalismo durante cada resultado apresentado em nossas reuniões, bem como pelas orientações dadas para melhoria da qualidade desta investigação.

Aos profissionais do Laboratório de Biotecnologia Microbiana 7 (LaBiM 7), Rui, Fábio e Douglas, por todo o apoio prestado, toda a atenção dada e todo o conhecimento compartilhado, sobretudo, junto às análises dos resultados encontrados nesta investigação, bem como no ensino da manipulação dos biorreatores, para o sucesso das fermentações realizadas.

Aos pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia Microbiana 5 (LaBiM 5), por todo apoio e auxílio oferecidos a cada momento e em cada uma das situações vividas por mim ao longo desta jornada, não somente de caráter profissional, como também pessoal. Agradeço, especialmente, à minha parceira de pesquisa Maria Eduarda, Duda, por toda a amizade e toda confiança, desde o início deste trabalho. Ao Anderson, pelas dicas e apoio dados. À Eliane e à Jaque Greco, pela atenção e motivação que sempre me ofereceram, sobretudo, nos momentos mais críticos. À Jaque “1” e à Kássia, pelos momentos mais divertidos que passei no LaBiM e pelas caronas até o BRT Fundão (Jaque “1”). À Taissa, pela amizade e por ter me ajudado na etapa de levantamento tecnológico. Enfim, a todos os outros profissionais, que sempre me respeitaram e acreditaram no meu potencial, me estimulando a continuar em frente.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Biotecnologia Microbiana 5 (LaBiM 5), Ju, Bia, Joice, Ana Cristina e Isabel. As risadas juntas, bem como a atenção que sempre deram às minhas palhaçadas, foram fundamentais para que eu seguisse em frente. Obrigado pela amizade.

A todos os funcionários das secretarias do LaBiM e do PEQ, especialmente a Aline e a Vera, pelos serviços prestados e pelo respeito que sempre tiveram por mim.

Aos meus pais, Mildes e Éder, por terem me proporcionado vivenciar ótimos dias na cidade maravilhosa. Obrigado pelas orações, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim. Obrigado por terem me ensinado a ser um homem de caráter e a colocar nas mãos de Deus a minha vida e os meus planos.

Aos meus familiares, sobretudo meus tios, por sempre se orgulharem de meus passos e me motivarem a conquistar meus sonhos, me oferecendo apoio quando necessário.

Aos amigos do mestrado em Engenharia Química da UFRJ, pelo companheirismo e por terem compartilhado comigo minhas alegrias e frustrações. Somos a melhor turma que há, sem dúvidas.

Aos amigos de república, Carlos e Caio, por terem sabido me compreender da forma que sou, sem julgamentos. Agradeço também ao Bruno, Lucas e Fernando. Obrigado aos cinco pelos risos fáceis de sempre, pelas “zueras”, pelas saídas à Lapa, pela companhia na cidade maravilhosa, pelos churrascos e pela força que sempre me deram, mesmo sem saberem. Sou imensamente grato a Deus pela amizade de cada um de vocês, pela disponibilidade em ouvir minhas lamentações, em compartilhar comigo momentos felizes da minha trajetória e por terem convivido comigo em todo o caminho percorrido até aqui, iniciado em março de 2016.

Aos colegas de balada que fiz no Rio de Janeiro, pelas festas aproveitadas juntas e pela alegria que me proporcionaram, sobretudo em dias de “estresse acadêmico”.

Aos amigos de coração que tenho fora da cidade do Rio de Janeiro, (vocês sabem quem são), por se orgulharem de minhas conquistas com sinceridade e verdade, e por todo apoio dado em cada momento de minha vida.

E a todos que estiveram, direta ou indiretamente, relacionados a este trabalho. Sem a presença de vocês, nada seria tão intenso e marcante como foi.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

PRODUÇÃO DE (2R,3R)-BUTANODIOL POR *Paenibacillus polymyxa* PM 3605
UTILIZANDO SUBSTRATOS ALTERNATIVOS COMO FONTES DE CARBONO

Daniel Tinôco Campos Neto

Outubro/2017

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Leda dos Reis Castilho

Programa: Engenharia Química

Este trabalho investiga o uso de glicerol residual como substrato e melão de cana-de-açúcar como co-substrato para a produção de (2R,3R)-butanodiol pela bactéria *Paenibacillus polymyxa* PM 3605, um micro-organismo considerado GRAS (geralmente reconhecido como seguro). Para isso, ensaios de fermentação foram conduzidos em frascos agitados, objetivando a seleção de condições adequadas de cultivo em termos de: fontes de carbono e de nitrogênio, tipo de substrato (comercial ou residual), concentração inicial de substrato e de inóculo. Ensaios preliminares foram conduzidos em biorreator, a partir do qual foi evidenciada a necessidade de se realizar a otimização dos parâmetros pH, agitação e aeração, considerados críticos ao processo. Os melhores resultados encontrados em frascos agitados foram: produção de 18,9 g.L⁻¹; rendimento de 0,39 g.g⁻¹ e produtividade de 0,13 g.L⁻¹.h⁻¹ de 2,3-butanodiol, em meio contendo 50 g.L⁻¹ de glicerol residual e 10 g.L⁻¹ de melão. Os ensaios em biorreator não foram eficientes, devido às dificuldades impostas pelas condições fermentativas “não-ótimizadas” adotadas. Mesmo assim, a partir dos resultados citados, foi possível conhecer um pouco o comportamento metabólico da *P. polymyxa* PM 3605, bem como as vias para as quais o carbono foi direcionado e que culminaram na produção de ácidos orgânicos, como succínico, acético, láctico e fórmico, além das formas *levo* e *meso* de 2,3-butanodiol. Por fim, um levantamento de patentes para esta investigação permitiu a verificação do nível de desenvolvimento tecnológico do processo fermentativo, demonstrando o quão promissor ele é, do ponto de vista produtivo e econômico.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

(2R,3R)-BUTANEDIOL PRODUCTION BY *Paenibacillus polymyxa* PM 3605 USING ALTERNATIVE SUBSTRATES AS CARBON SOURCES

Daniel Tinôco Campos Neto

October/2017

Advisors: Denise Maria Guimarães Freire

Leda dos Reis Castilho

Department: Chemical Engineering

This work investigates the use of residual glycerol as substrate and sugarcane molasses as a co-substrate for the production of (2R,3R)-butanediol by the bacterium *Paenibacillus polymyxa* PM 3605, a GRAS microorganism. For this, fermentation tests were conducted in shaken flasks, aiming the selection of suitable conditions of cultivation in terms of: carbon and nitrogen sources, substrate type (commercial or residual), initial substrate concentration and inoculum size. Preliminary tests were conducted in a bioreactor, from which it was evidenced the need to perform the optimization of pH, agitation and aeration parameters, considered critical to the process. The best results found in shaken flasks were: production of 18.9 g.L⁻¹; yield of 0.39 g.g⁻¹ and productivity of 0.13 g.L⁻¹.h⁻¹ of 2,3-butanediol, in medium containing 50 g.L⁻¹ residual glycerol and 10 g.L⁻¹ molasses. The bioreactor trials were not efficient, due to the difficulties imposed by the "non-optimized" fermentation conditions adopted. Nevertheless, from the mentioned results, it was possible to know a little the metabolic behavior of *P. polymyxa* PM 3605, as well as the pathways to which the carbon was directed and which culminated in the production of organic acids, such as succinic, acetic, lactic and formic, in addition to the *levo* and *meso* forms of 2,3-butanediol. Finally, a survey of patents for this research allowed the verification of the level of technological development of the fermentation process, demonstrating how promising it is, from a productive and economic point of view.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
NOMENCLATURA.....	xviii
LISTA DE SÍMBOLOS	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
2.1. 2,3-butanodiol.....	6
2.1.1. Características e Aplicações	6
2.1.2. Produção biotecnológica.....	9
2.1.2.1. Contextualização histórica.....	9
2.1.2.2. Micro-organismos produtores	10
2.1.2.3. Rotas metabólicas	11
2.1.2.3.1. Síntese dos isômeros de 2,3-BDO	12
2.1.2.3.2. Função biológica do 2,3-BDO.....	15
2.1.3. Fatores determinantes de produção	15
2.1.3.1.1. Aeração.....	16
2.1.3.1.2 Agitação.....	17
2.1.3.2. Temperatura.....	18
2.1.3.3. Potencial hidrogeniônico (pH).....	19
2.1.4. Estratégias de melhoria produtiva e econômica do processo	23
2.1.4.1. Suplementação nutricional	23
2.1.4.2. Fontes alternativas de nitrogênio e carbono	24
2.1.4.2.1. Glicerol	26
2.1.4.2.1.1. Metabolismo microbiano do glicerol.....	27
2.1.4.2.1.2. Glicerol residual	28
2.1.4.3. Condução do cultivo: modo de operação	31
2.1.4.3.1. Batelada alimentada: estratégias de alimentação.....	33
2.1.5. Processo <i>downstream</i>	35
2.1.6. Economia e Mercado	36
2.1.7. Monitoramento Tecnológico	38

2.1.7.1. Importância das patentes	38
2.1.7.2. Metodologia de prospecção de patentes	39
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo Geral	43
3.2. Objetivos Específicos	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1. Micro-organismo	45
4.2. Meios de cultivo	46
4.2.1. Ativação e manutenção da cultura.....	46
4.2.2. Pré-Inóculo	46
4.2.3. Meio de fermentação	47
4.3. Condições operacionais das fermentações	48
4.4. Procedimento de fermentação	49
4.4.1. Seleção do meio de fermentação em frascos agitados.....	49
4.4.2. Biorreator.....	50
4.5. Métodos analíticos.....	52
4.5.1. Concentração celular	52
4.5.2. Quantificação de biomoléculas.....	52
4.5.3. Reprodutibilidade experimental	53
4.5.4. <i>Softwares</i> utilizados.....	53
4.6. Parâmetros fermentativos	53
4.6.1. Rendimento ($Y_{P/S}$)	53
4.6.2. Produtividade volumétrica (P_V).....	54
4.6.3. Eficiência da fermentação (E_f)	54
4.7. Monitoramento Tecnológico	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Concentração inicial de inóculo	57
5.2. Seleção do meio de fermentação	66
5.3. Comparação com a Literatura.....	70
5.4. Glicerol residual	73
5.5. Influência da concentração inicial do substrato.....	79
5.6. Efeito do co-substrato na produção de 2,3-butanodiol.....	87
5.7. Formação de sub-produtos	92

5.8. Condução em biorreator	93
5.8.1. Testes preliminares	93
5.9. Formação de exopolissacarídeos (EPS).....	99
5.10. Monitoramento Tecnológico	100
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	107
6.1. Conclusões.....	107
6.2. Sugestões	109
7. ANEXOS	110
7.1. Anexo I: Curvas-padrão de massa celular seca	110
7.2. Anexo II: Composição do melão residual	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	112

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Formas isoméricas do 2,3-butanodiol..... 6
- Figura 2:** Rota metabólica de produção de 2,3-BDO e de sub-produtos. (Desenho próprio, baseado em MADDOX, 1996)..... 13
- Figura 3:** Mecanismo de síntese dos isômeros de 2,3-BDO, proposto para as bactérias *K. pneumoniae* e *P. polymyxa*. As letras, correspondentes às enzimas, que estão em negrito são usadas por *P. polymyxa*, somente. A enzima *g* é considerada NADPH-dependente, enquanto às demais são NADH-dependentes. (Desenho próprio, baseado em JI *et al.*, 2011). 14
- Figura 4:** Fluxo metabólico de produção de 2,3-BDO a partir do glicerol. (Desenho próprio, baseado em DA SILVA *et al.*, 2009). 28
- Figura 5:** Glicerol como precursor de diferentes produtos químicos de aplicação industrial. (Desenho próprio baseado em PAGLIARO *et al.*, 2007)..... 30
- Figura 6:** Esquema do método de agrupamento de patentes usado na prospecção tecnológica. *Fonte:* baseado em Joung e Kim, 2017. 40
- Figura 7:** Imagem microscópica das células de *P. polymyxa* PM 3605, após incubação em frascos agitados por 16h, 37°C e 200 rpm, em meio contendo glicose como substrato. As células representadas foram observadas com um aumento de 40x em microscópio de luz..... 45
- Figura 8:** Batelada convencional, conduzida no biorreator da BIOFLO® & CELLIGEN® 310, para a produção de 2,3-BDO. 51
- Figura 9:** Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, usando glicose comercial como substrato. Concentração inicial do inóculo: (a) 3,75 %(v/v); (b) 10,0 %(v/v). —●— Glicose comercial; -●- 2,3-BDO; e ●●● DO_{600nm}. 58
- Figura 10:** Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, usando glicose comercial como substrato e extrato de levedura LaBiM como fonte de nitrogênio. Concentração inicial do inóculo: (a) 3,75 %(v/v); (b) 10,0 %(v/v). —●— Glicose comercial; -●- 2,3-BDO; e ●●● DO_{600nm}. 59
- Figura 11:** Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, usando glicerol comercial como substrato. Concentração inicial do inóculo: (a) 3,75 %(v/v); (b) 10,0 %(v/v). —●— Glicose comercial; -●- 2,3-BDO; e ●●● DO_{600nm}. 60
- Figura 12:** Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, usando extrato de levedura LaBiM e

glicerol comercial como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente. Concentração inicial do inóculo: (a) 3,75 %(v/v); (b) 10,0 %(v/v).
 —●— Glicose comercial; —●— 2,3-BDO; e ●●● DO_{600nm}..... 61

Figura 13: Parâmetros cinéticos da fermentação de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM3605, a 37°C, 200 rpm, em frascos agitados, usando 10,0 %(v/v) de inóculo: (a) Produção máxima; (b) Rendimento e produtividade; (c) Eficiência da fermentação e consumo de substrato. ■ M3 – glicerol comercial; ■ M4 – extrato de levedura LaBiM e glicerol comercial. 67

Figura 14: Isomerismo de 2,3-BDO - Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, usando glicerol comercial como substrato. —●— Glicerol comercial; —●— *Levo*-2,3-BDO; —■— *Meso*-2,3-BDO; e ●●● DO_{600nm}..... 69

Figura 15: Perfis de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 em diferentes tipos de glicerol, em frascos agitados a 37°C e 200rpm: —●— Glicerol comercial; —■— Glicerina loira sem sebo; e —▲— Glicerina loira com 10,0 %(v/v) de sebo. 74

Figura 16: Cinética de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, usando glicerol residual, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm: —●— Glicerol originado da glicerina sem sebo; ■■ Glicerol originado da glicerina com 10,0 %(v/v) de sebo; —●— 2,3-BDO produzido da glicerina sem sebo; e ■■ 2,3-BDO produzido da glicerina com 10,0 %(v/v) de sebo..... 76

Figura 17: Perfis cinéticos de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605, para diferentes concentrações iniciais de glicerol residual, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm: —●— 50,0 g.L⁻¹; —■— 70,0 g.L⁻¹; e —◆— 85,0 g.L⁻¹. 80

Figura 18: Cinética de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, para diferentes concentrações iniciais de glicerol residual, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm: —●— 50,0 g.L⁻¹; —■— 70,0 g.L⁻¹; e —◆— 85,0 g.L⁻¹ (Glicerol) ●●● 50,0 g.L⁻¹; ■■ 70,0 g.L⁻¹; e ◆◆ 85,0 g.L⁻¹ (2,3-BDO). 81

Figura 19: Taxas de consumo de glicerol, para diferentes concentrações iniciais: —●— 50,0 g.L⁻¹; —■— 70,0 g.L⁻¹; e —◆— 85,0 g.L⁻¹ 82

Figura 20: Perfil cinético de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e taxas de consumo de glicerol diárias, para diferentes concentrações de melão residual usado como co-substrato, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm: —●— 5,0 g.L⁻¹; —■— 10,0 g.L⁻¹; e —◆— 20,0 g.L⁻¹ (DO_{600nm}) ●●● 5,0 g.L⁻¹; ■■ 10,0 g.L⁻¹; e ◆◆ 20,0 g.L⁻¹ (Taxas). 87

Figura 21: Cinética de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, para diferentes concentrações de melão residual usado como co-substrato, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm: —●— 5,0 g.L⁻¹; —■— 10,0 g.L⁻¹; e —◆— 20,0 g.L⁻¹ (Glicerol) ●●● 5,0 g.L⁻¹; ■■ 10,0 g.L⁻¹; e ◆◆ 20,0 g.L⁻¹ (*levo*-2,3-BDO) 89

Figura 22: Produção dos sub-produtos da fermentação de 2,3-BDO, em meio contendo 50,0 g.L⁻¹ de glicerol residual e 10,0 g.L⁻¹ de melão. Os ensaios foram conduzidos por

144h, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm.	
● Ácido Succínico; ■ Ácido Láctico; e ▲ Ácido Fórmico.	92
Figura 23: Cinéticas de crescimento de <i>P. polymyxa</i> PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em biorreator a 37°C, 200 rpm e cascata de aeração (0,5 vvm), em meio contendo 20,0 g.L ⁻¹ de glicerol residual e 10,0 g.L ⁻¹ de melaço.	
—●— Glicerol residual; - -●- - <i>Levo</i> -2,3-BDO; - -■- - <i>Meso</i> -2,3-BDO; e	
●●●● DO _{600nm}	95
Figura 24: Produção dos sub-produtos da fermentação de 2,3-BDO, em meio contendo 20,0 g.L ⁻¹ de glicerol residual e 10,0 g.L ⁻¹ de melaço. Os ensaios foram conduzidos por 25h em biorreator a 37°C, 200 rpm e cascata de aeração (0,500 vvm).	
● Ácido Succínico; e ■ Ácido Acético.....	97
Figura 25: Evolução anual das patentes relacionadas à produção de 2,3-BDO por <i>P. polymyxa</i> , usando glicose como substrato.	101
Figura 26: Detentores tecnológicos das patentes avaliadas neste estudo.....	103
Figura 27: Classificação Internacional de Patentes para as patentes selecionadas na prospecção tecnológica em estudo. <i>Fonte: Orbit</i>	104
Figura 28: Níveis hierárquicos da IPC – <i>International Patent Classification</i> . <i>Fonte: WIPO</i> (http://www.wipo.int/portal/en/).....	105
Figura 29: Curvas-padrão de massa celular seca (g.L ⁻¹) de <i>P. polymyxa</i> PM 3605, a 37°C e 200 rpm: (a) meio YPD com 20,0 g.L ⁻¹ de glicose comercial – meio de pré-inóculo para ensaios em frascos agitados; (b) meio base da literatura com 20,0 g.L ⁻¹ de glicerol residual – meio de pré-inóculo para ensaios em biorreator.	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Derivados do 2,3-BDO, seus processos de geração e suas principais aplicações.....	8
Tabela 2: Temperatura de produção de 2,3-BDO para as principais bactérias produtoras.....	19
Tabela 3: Potencial hidrogeniônico (pH) para a produção de 2,3-BDO, de acordo com a bactéria produtora.....	20
Tabela 4: Modo operacional da fermentação e substrato usados na produção de 2,3-BDO, para as principais bactérias produtoras.....	33
Tabela 5: Estratégias de melhoria usadas no levantamento de patentes em trabalhos encontrados na literatura.....	42
Tabela 6: Parâmetros cinéticos de produção de 2,3-BDO por <i>P. polymyxa</i> PM 3605, a partir de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.....	64
Tabela 7: Comparativo dos parâmetros fermentativos de produção de 2,3-BDO, para diferentes linhagens de <i>P. polymyxa</i> , utilizando glicerol como substrato. Todos os dados correspondem à condução batelada em frascos agitados.....	71
Tabela 8: Parâmetros cinéticos de produção de 2,3-BDO por <i>P. polymyxa</i> PM 3605, usando diferentes tipos de glicerol como substratos.....	77
Tabela 9: Parâmetros cinéticos de produção de 2,3-BDO por <i>P. polymyxa</i> PM 3605 em diferentes concentrações iniciais de glicerol residual. Os parâmetros foram calculados após 144h de processo.....	84
Tabela 10: Resumo dos principais trabalhos encontrados na literatura para a produção de 2,3-BDO, em batelada simples – frascos agitados e biorreator, utilizando diferentes concentrações iniciais de glicerol residual.....	86
Tabela 11: Efeito da adição de melão, usado como co-substrato, sobre os parâmetros cinéticos de produção de 2,3-BDO por <i>P. polymyxa</i> PM 3605, usando 50,0 g.L ⁻¹ de glicerol residual inicial.....	90
Tabela 12: Composição do melão de cana-de-açúcar usado neste trabalho, em termos de açúcares componentes.....	111

NOMENCLATURA

1,3-PDO	1,3-propanodiol
2,3-BDO	2,3-butanodiol
ALDC	α -acetolactato descarboxilase
ALS	α -acetolactato sintase
ATP	Adenosina trifosfato
BD, BDL, BDO	2,3-butanodiol
BDH	2,3-BDO desidrogenase
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cálcio di-hidratado
CENPES	Centro de Pesquisa da Petrobrás
$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Glicerol
CO_2	Dióxido de carbono
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cobalto hexa-hidratado
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Cobre(II) di-hidratado
<i>EPO</i>	<i>European Patent Office</i>
EPS	Exopolissacarídeo
FAMPAT	Família de patentes
$\text{Fe}(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de diaminferro(II) hexa-hidratado
<i>GRAS</i>	<i>Generally Recognized As Safe</i>
ICT	Instituto de Ciência e Tecnologia
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
K^+	Íons potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Dióxido de hidrogênio fosfato de potássio

K_2HPO_4	Hidrogeno fosfato de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
H_3BO_3	Ácido bórico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IPC	<i>International Patent Classification</i>
LaBiM	Laboratório de Biotecnologia Microbiana
M1,2,3,4	Meios 1, 2, 3 e 4
MEK	Metil-etil-cetona
Mn^{2+}	Íons manganês
NaCl	Cloreto de sódio
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
$NADH_2$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma mais reduzida)
Na_2EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio
$NaMoO_4$	Molibdato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na_2SeO_3	Selenito de sódio
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amônio
$NiCl_2$	Cloreto de níquel
MG	Minas Gerais
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Cloreto de manganês tetra-hidratada
$MnSO_4$	Sulfato de manganês
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PIB	Produto Interno Bruto
<i>TF-IDF</i>	<i>Term frequency - inverse document frequency</i>

TSB	<i>Tryptone Soy Broth (Caldo Triptona de Soja)</i>
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
UV	Ultra-violeta
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>
YPD	<i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

$\%(m/v)$	Porcentagem em massa por volume
$\%(v/v)$	Porcentagem em volume por volume
μL	Microlitro
μ_x	Velocidade específica de crescimento celular
US\$	Dólar americano
US\$/kg	Dólar americano por quilograma
BTU/lb	<i>British thermal unit</i> por libra
C_{BDO}	Produção máxima de 2,3-BDO
C/N	Relação entre a quantidade de carbono e de nitrogênio
C_x	Concentração celular
$\text{DO}_{600\text{nm}}$	Densidade Óptica em comprimento de onda de 600 nanômetros
DO_0	Densidade óptica celular inicial
E	Eficiência de conversão
E_f	Eficiência fermentativa
$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	Massa de produto em gramas por massa de substrato em gramas
$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Gramas por litro
$\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Gramas por litro por hora
g	Força centrífuga relativa
KJ/Kg	Quilojoule por quilograma
Kton	Quilotonelada
L	Litro
lb	Libra (massa)

$\ln X$	Logaritmo neperiano da concentração celular
M	Molar
mL	Mililitro
$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	Mililitro por minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetro
P	Concentração final de 2,3-BDO
P_0	Concentração inicial de 2,3-BDO
$P_{\text{máx}}$	Concentração máxima de 2,3-BDO
pH	Potencial hidrogeniônico
P_V	Produtividade volumétrica
R^2	Coefficiente de correlação linear
rpm	Rotações por minuto
S	Concentração final de substrato
S_0	Concentração inicial de substrato
t	Tempo
TF	Tempo de fermentação
t_G	Tempo de geração (duplicação)
TMP	Tempo referente à máxima produção de 2,3-BDO
vvm	Volume de ar por volume de meio por tempo
X	Concentração final de células
X_0	Concentração inicial de células
$Y_{P/S}$	Rendimento experimental de 2,3-BDO a partir do substrato
$Y_{P/S \text{ teórico}}$	Rendimento estequiométrico de 2,3-BDO a partir do substrato

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de produtos químicos, sobretudo, os chamados “químicos de plataforma” (*bulk chemicals*), tem ganhado especial atenção nas últimas décadas, em razão do aumento das pressões ambientais sobre as tradicionais fontes de energia, principalmente o petróleo, bem como do futuro esgotamento e dos altos preços de mercado associados a essas fontes fósseis. Além disso, os processos produtivos convencionais requerem uma alta quantidade de energia e uma catálise de alto custo (WONG *et al.*, 2012), onerando, como consequência, a produção. Diante disso, as rotas biológicas para produção comercial em larga escala surgem como alternativa econômica e produtiva, capaz de integrar, inclusive, a produção de combustíveis com a geração de energia, de maneira eficiente (NAN *et al.*, 2014).

Dentre os produtos obtidos por rotas biológicas, o 2,3-butanodiol se destaca, uma vez que apresenta aplicações industriais multifacetadas, que incluem: perfumaria, explosivos, plasticidas, alimentos, fármacos, tintas e combustíveis. Adicionalmente, seu potencial para geração de 1,3-butadieno, principal constituinte das borrachas sintéticas, e sua possibilidade de desidratação, levando à metil-etil-cetona, um eficiente aditivo à gasolina, usado também como solvente em resinas e tintas, vem contribuindo para o seu destaque, cada vez mais expressivo, na indústria biotecnológica (CELÍNSKA e GRAJEK, 2009).

O 2,3-butanodiol pode ser sintetizado sob três diferentes formas isoméricas: *meso*, *levo* e *dextro* rotatórias. Dessas, a forma *levo* é considerada a mais interessante industrialmente, devido às suas propriedades físico-químicas, com destaque ao ponto de congelamento de -60°C , que a permite ser aplicada como anti-congelante, e à sua natureza quiral, que contribui para uma melhor conversão nos diferentes derivados já mencionados (YU *et al.*, 2011). Diferentes micro-organismos são capazes de sintetizar o 2,3-butanodiol, no entanto, as bactérias são conhecidas como os melhores produtores, principalmente dos seguintes gêneros e espécies: *Klebsiella*; *Paenibacillus*; *Bacillus licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*; *Serratia*; e *Enterobacter* (JI *et al.*, 2011).

A espécie *Paenibacillus polymyxa* tem se mostrado promissora na produção de 2,3-butanodiol, não somente por sua capacidade fermentativa, mas também por algumas

características, como: não-patogenicidade (bactéria classificada no grupo de risco 1, que indica uma baixa capacidade de contaminação humana); produção preferencial da forma *levo* (com cerca de 98% de pureza em detrimento às demais formas isoméricas); e uso de substratos não-convencionais (como glicerol comercial e residual – com e sem sebo). Essas particularidades têm contribuído para o aumento das investigações de 2,3-butanodiol utilizando esse micro-organismo (YU *et al.*, 2011).

Apesar dos avanços obtidos nos estudos de produção de 2,3-butanodiol, a viabilidade econômico-produtiva dessa biomolécula ainda é bastante questionável, uma vez que a alta concentração final do composto no meio de fermentação é um pré-requisito crítico para sua comercialização e alguns fatores limitam essa condição (OKONKWO *et al.*, 2017). Dentre eles, a presença de sub-produtos, como: formato, lactato e etanol, que deslocam o carbono para suas sínteses, comprometendo o rendimento de 2,3-butanodiol. Além do fator metabólico, a produção de exopolissacarídeos (EPS), em determinadas condições de cultivo, promove um efeito negativo sobre a etapa *downstream*, em que a recuperação do 2,3-butanodiol se torna dispendiosa e complexa, em razão da elevada viscosidade e pouca homogeneidade do meio (HÄBLER *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013). Como consequência, o custo global do processo aumenta.

Diferentes estratégias, no entanto, têm sido adotadas para melhorar a produção de 2,3-butanodiol, como: melhoramento de linhagens microbianas produtoras do diol; otimização das condições fermentativas; construção de modelos matemáticos para controle do processo; e uso de fontes de carbono e de nitrogênio de baixo custo. *A priori*, para que um eficiente processo industrial em larga escala seja estabelecido, é necessário um meio nutricionalmente adequado para a síntese de 2,3-butanodiol e o uso de parâmetros operacionais otimizados. Nesse contexto, as matérias-primas residuais da agroindústria surgem como opções viáveis, capazes de fornecer os nutrientes e a energia necessárias à atividade metabólica microbiana. Ademais, se associadas às condições ótimas de cultivo, como pH e temperatura, a produção de 2,3-butanodiol pode ser significativamente melhorada (PRIYA *et al.*, 2016).

O glicerol em substituição à glicose pura, com destaque ao glicerol residual, também conhecido como glicerina e glicerina loira, é um exemplo de substrato de baixo custo, capaz de fornecer carbono e energia suficientes para vários micro-organismos. A

síntese de 2,3-butanodiol a partir de glicerol também apresenta caráter ácido-misto, porém a geração de piruvato não está condicionada às enzimas da glicólise. Logo, existem menos intermediários na via metabólica, fazendo com que a síntese ocorra com maior rapidez, se respeitadas as condições ótimas de pH e temperatura. Além disso, o glicerol residual, ao ser aproveitado na fermentação, tem seu problema de disposição minimizado, uma vez que, atualmente, sua produção é resultante do processo de transesterificação, que dá origem ao biodiesel. Nessa reação, o glicerol é produzido na concentração de 10,0% (m/v), sob a forma de sub-produto, o que o caracteriza como um resíduo (ANITHA *et al.*, 2016). Portanto, sua fermentação não somente agrega valor ao produto, como também garante o uso de uma tecnologia de aproveitamento de biomassa, considerada limpa e que permite o estabelecimento da sustentabilidade de processos.

A fonte de nitrogênio, por sua vez, também tem sido substituída. O uso de extrato de levedura é considerado economicamente inviável aos processos industriais, devido ao seu elevado custo. Logo, a busca por alternativas, como o uso do licor de milho e de extratos de levedura produzidos de maneira menos custosa, tem sido priorizada (ADLAKHA e YAZDANI, 2015). Em ambos os casos, a disponibilização de nitrogênio é fundamental para a síntese proteica microbiana, a partir da qual novas enzimas podem ser obtidas, bem como biomassa, de modo que a produção de 2,3-butanodiol ocorra de forma equilibrada e eficiente. A quantidade adequada de nitrogênio no meio é fundamental, ainda, para evitar a formação de EPS, que compromete o rendimento de 2,3-butanodiol, além de prejudicar a oxigenação e a viscosidade do meio (LEE *et al.*, 1997).

Em relação às condições de pH e temperatura, é sabido que cada micro-organismo apresenta valores ótimos, nos quais a produção de 2,3-butanodiol é máxima (MA *et al.*, 2009). Os biosistemas são dependentes desses parâmetros, uma vez que estes agem diretamente sobre a atividade enzimática e sobre o metabolismo celular. Conseqüentemente, a determinação das condições ótimas é fundamental para que os processos de conversão, tanto da fonte de carbono quanto da fonte de nitrogênio, aconteçam corretamente (SYU, 2001).

A disponibilização de oxigênio é outro fator determinante na produção de 2,3-butanodiol. Um meio altamente aerado tende a apresentar baixa seletividade da forma

levo do diol, fazendo com que a forma *meso* seja produzida de maneira preferencial. Se as condições de microaerobiose no meio de cultivo são alteradas, a produção de *meso*-2,3-butanodiol é favorecida e o rendimento do *levo*-isômero é, por consequência, reduzido (CELÍŃSKA e GRAJEK, 2009).

A aeração do meio está, também, associada à produção de biomassa e CO₂, pois quando os valores de oxigênio excedem o limite, o 2,3-butanodiol é consumido para a geração de energia e para a manutenção celular. Entretanto, a redução expressiva de oxigênio pode causar efeito semelhante no rendimento de 2,3-butanodiol, uma vez que a biomassa é desfavorecida, impedindo, assim, que haja células suficientes para a fermentação. Portanto, a produtividade do diol e a geração de biomassa são um resultado direto da disponibilidade equilibrada de oxigênio, o que comprova sua importância no contexto da fermentação (CELÍŃSKA e GRAJEK, 2009).

Por fim, o modo de condução do processo é outro fator a ser levado em consideração. Basicamente, existem três modos de operação: batelada, batelada alimentada e contínuo (este último pode apresentar outras configurações, como contínuo com reciclo). As duas primeiras formas são mais utilizadas que a terceira, embora um cultivo contínuo apresente maior produtividade e capacidade de produzir grandes quantidades de produto. Todavia, os problemas de contaminação e perda de material são maiores nesse tipo de condução. Por esse motivo, os estudos científicos dão enfoque às bateladas. A literatura reporta uma produção de 15 a 80 g.L⁻¹ de 2,3-butanodiol para batelada e cerca de 19,5 a 111 g.L⁻¹ para a batelada alimentada (valores máximos reportados até o momento), usando glicose comercial como substrato (citado por OKONKWO *et al.*, 2017). Esses valores são justificados pelo fato de a batelada alimentada permitir o uso de maiores quantidades de substrato, sem haver comprometimento metabólico e sem afetar as taxas de crescimento celular, quando comparada à batelada simples. Com isso, o uso da batelada alimentada tem sido recorrente em vários trabalhos científicos e em diversas aplicações industriais, como estratégia de melhoria da produção, com destaque ao 2,3-butanodiol (JI *et al.*, 2011).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo investigar o uso de glicerol residual como fonte de carbono de baixo custo, em meio de cultivo contendo melão de cana-de-açúcar, funcionando como co-substrato, a fim de se garantir uma produção eficiente de 2,3-butanodiol, do ponto de vista econômico e produtivo. Além disso, foi

utilizada uma bactéria não-patogênica da espécie *Paenibacillus polymyxa*, como micro-organismo de trabalho, de maneira a permitir uma condução segura do processo, tanto em frascos agitados quanto em biorreator. Os parâmetros fermentativos pH, aeração e agitação foram preliminarmente analisados, com o intuito de se conhecer sua influência sobre a síntese de 2,3-butanodiol. Por fim, um levantamento de patentes foi realizado, a fim de se conhecer o nível de desenvolvimento da tecnologia investigada neste estudo.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. 2,3-butanodiol

2.1.1. Características e Aplicações

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO), também conhecido por 2,3-butileno glicol, 2,3-dihidroxi-butano, dimetiletileno glicol e butano-2,3-diol (IUPAC), é um álcool incolor, inodoro e altamente viscoso, com massa molecular de 90,121 g.mol⁻¹ e fórmula molecular C₄H₁₀O₂ (CELÍNSKA e GRAJEK, 2009).

O 2,3-BDO pode ser encontrado sob três formas isoméricas distintas: *dextro*-rotatória L(+), *levo*-rotatória D(-) e *meso*. Seus isômeros são caracterizados por apresentarem um alto ponto de ebulição, superior ao da água, variando entre 177°C e 182°C. Em decorrência da grande quantidade de água presente no caldo de fermentação, a recuperação desse composto por destilação é dificultada. Por esse motivo, métodos alternativos de recuperação têm sido desenvolvidos, como: osmose reversa, pervaporação, extração por solvente e *salting out* (JI *et al.*, 2011).

A Figura 1 ilustra os três isômeros do 2,3-BDO.

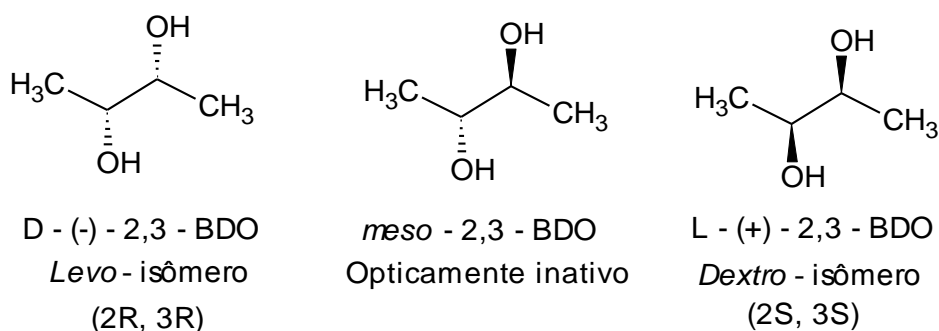


Figura 1: Formas isoméricas do 2,3-butanodiol.

O 2,3-BDO apresenta diferentes aplicações industriais, devido às suas propriedades físico-químicas. Um exemplo é o uso comercial como anticongelante, uma vez que apresenta baixo ponto de congelamento, em torno de -60°C (YU *et al.*, 2011). Outra propriedade interessante é o seu calor de combustão (cerca de 27200 J.g^{-1}), comparável ao de combustíveis líquidos, como o metanol (cerca de 22080 J.g^{-1}) e o etanol (cerca de 29055 J.g^{-1}) (FLICKINGER, 1980). Sua desidratação leva à formação de metil-etil-cetona (MEK ou butan-2-ona), cujo calor de combustão é superior ao do etanol, sendo, por isso, considerado um eficiente aditivo de combustíveis. Por fim, ele apresenta um alto índice de octano, servindo também, por essa razão, de reforço à gasolina (GARG e JAIN, 1995).

O 2,3-BDO é considerado um composto biodegradável. Essa característica lhe permite ser aplicado na fabricação de produtos menos agressivos ao meio ambiente, o que o coloca numa posição de destaque no mercado. A indústria de solventes e de polímeros é um exemplo de segmento que aproveita essa vantagem ecológica para utilizá-lo como agente de ligação na produção de tintas (BERBERT-MOLINA, 1995).

O 2,3-BDO pode ser convertido, também, em outros compostos, empregados em tecnologias ligadas aos setores: alimentício, médico, farmacêutico e de cosméticos (GARG e JAIN, 1995). A desidrogenação catalítica desse álcool produz diacetil, usado como aditivo alimentício, de alto poder flavorizante, capaz de conferir sabor amanteigado aos alimentos (BARTOWSKY e HENSCHKE, 2004). O diacetil possui propriedades bacteriostáticas, responsáveis por inibirem o crescimento de microorganismos patogênicos (UNDERKOFER e HICKEY, 1954). A esterificação do 2,3-BDO gera produtos de aplicação cardiovascular, transportadores de fármacos e perfumes (GARG e JAIN, 1995; PETRINI *et al.*, 1999).

Outro importante derivado do 2,3-BDO é o 1,3-butadieno, utilizado na fabricação de borracha sintética. Majoritariamente, o 1,3-butadieno é obtido através da conversão de petróleo, porém estudos têm sido desenvolvidos objetivando sua obtenção por meio de fontes alternativas, sobretudo, residuais, como a biomassa. Não somente as questões ambientais têm estimulado essas novas pesquisas, mas, principalmente, a perspectiva futura de escassez de oferta das fontes convencionais, bem como seus altos preços (ROMIO, 2014).

A Tabela 1 apresenta alguns derivados do 2,3-BDO, seus processos de obtenção e suas principais aplicações.

Tabela 1: Derivados do 2,3-BDO, seus processos de geração e suas principais aplicações.

Derivado do 2,3-BDO	Processo de obtenção	Aplicações	Referências Bibliográficas
Octano	Hidrogenação	Combustível	BIAŁKOWSKA(2016)
Metil-etil-cetona	Desidratação catalisada por ácido	Combustíveis (aviões), resinas, tintas e solventes	SYU (2001); LI <i>et al.</i> (2013)
Poliuretano-maleimidas (PUMAs)	Esterificação	Aplicações cardiovasculares e medicamentos diversos	TANZI <i>et al.</i> (1999)
1,3-butadieno	Desidratação	Látex, plásticos, calçados, modificadores de asfaltos e aditivos de óleos lubrificantes	ROMIO (2014)
Acetoína	Desidrogenação	Flavorizante responsável por aromas e essências	FAVERI <i>et al.</i> (2003)
Componentes de Tetrametil	Cetalização	Aditivo à gasolina, similar ao MTBE (metil terc-butil éter)	VOLOCH <i>et al.</i> (1985)
2,3-butanodiol diéster	Esterificação	Precusores de fármacos e cosméticos; e plastificante de polímeros termoplásticos	VOLOCH <i>et al.</i> (1985)

2.1.2. Produção biotecnológica

2.1.2.1. Contextualização histórica

A produção de 2,3-BDO por via biotecnológica começou a ser investigada no início do século XX, pelos pesquisadores Harden e Walpole (1906) e Harden e Norris (1912), que empregaram a bactéria *Klebsiella pneumoniae* como micro-organismo de trabalho (MAGEE e KOSARIC, 1987). Em 1926, culturas de *Paenibacillus polymyxa* foram aplicadas pela primeira vez (GARG e JAIN, 1995), objetivando uma produção mais segura, uma vez que essa bactéria não apresenta patogenicidade.

A produção industrial de 2,3-BDO foi primeiramente proposta por Fulmer *et al.* (1933), sendo consideravelmente estimulada durante o período da Segunda Guerra Mundial (JI *et al.*, 2011). Esse estímulo foi justificado pelo fato de o 2,3-BDO ser um precursor químico do 1,3-butadieno, composto usado na síntese de borracha sintética, de interesse tecnológico entre os países envolvidos na guerra (NUNES *et al.*, 2005). Diante desse contexto, fermentações passaram a ser conduzidas em escala piloto. Entretanto, o desenvolvimento desse bioprocessos foi afetado pela produção de 1,3-butadieno a partir do petróleo, cuja rota química foi considerada economicamente mais vantajosa (de baixo custo) (JI *et al.*, 2011).

Em 1970, com a crise do petróleo, o uso da biomassa para a geração de 2,3-BDO voltou a ganhar atenção (VOLOCH *et al.*, 1985), o que culminou em um novo interesse pela produção em larga escala. Atualmente, a busca por uma economia sustentável, de aproveitamento de carbono e de eficiência energética, tem contribuído com o desenvolvimento do processo biotecnológico (LI *et al.*, 2010). Isso tem auxiliado o desenvolvimento das chamadas biorrefinarias, caracterizadas por integrarem o uso de recursos renováveis com o processo tradicional de geração de energia (RAGAUSKAS *et al.*, 2006; VAN HAVEREN *et al.*, 2008), o que, por sua vez, mantém ativa a cultura de sustentabilidade visada pelas indústrias além de estimular, cada vez mais, a síntese biológica de 2,3-BDO.

2.1.2.2. Micro-organismos produtores

As bactérias são consideradas os produtores de maior potencial produtivo e econômico, dentre os micro-organismos capazes de gerar, industrialmente, 2,3-BDO (GARG e JAIN, 1995). As principais espécies produtoras pertencem aos gêneros: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Serratia* (MADDOX, 1996). Cada uma delas é capaz de produzir uma mistura distinta de estereoisômeros de 2,3-BDO, segundo suas características metabólicas próprias. De um modo geral, a produção de 2,3-BDO ocorre sob a forma de uma mistura isomérica, que normalmente contém dois dos três isômeros existentes (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

Até o presente momento, as bactérias *Klebsiella oxytoca* e *K. pneumoniae*, bem como *Paenibacillus polymyxa*, têm sido majoritariamente empregadas na produção eficiente de 2,3-BDO, sobretudo em razão de algumas características que apresentam (JI *et al.*, 2011).

A bactéria do gênero *Klebsiella* é capaz de gerar, pelo menos, o dobro da quantidade de 2,3-BDO produzida por *P. polymyxa*, a partir de um meio de cultivo simples do ponto de vista nutricional. Além disso, pode metabolizar os principais açúcares presentes em hidrolisados de hemicelulose e celulose (CHANDEL *et al.*, 2010). No entanto, sua maior limitação é o fato de ser uma espécie com linhagens patogênicas, o que compromete sua aplicação em processos em larga escala (JI *et al.*, 2011).

P. polymyxa, por sua vez, é capaz de produzir a forma *levo* de 2,3-BDO, com um grau de pureza de até 98%, considerada um isômero de fácil manipulação química e com propriedades anti-congelantes, interessantes em determinadas aplicações industriais (OKONKWO *et al.*, 2017). Ela pode fermentar xilana, inulina e amido, bem como sintetizar xilanase, inulase e α -amilase, enzimas que degradam polímeros a açúcares de cadeias mais simples (GAO *et al.*, 2010), além de hidrolisados lignocelulósicos, que podem ser usados como substratos na síntese de 2,3-BDO. Além disso, essa bactéria é não-patogênica, classificada no grupo de risco 1, o que permite sua aplicação industrial segura. Entretanto, alguns sub-produtos podem ser produzidos, o que acaba comprometendo o rendimento e a purificação de 2,3-BDO, dependendo de sua quantidade no meio (MADDOX, 1996).

A escolha do micro-organismo de trabalho dependerá do objetivo que se almeja no bioprocesso: se segurança em larga escala, se determinado isômero ou se maior produção de 2,3-BDO (JI *et al.*, 2011). Em cada caso, o conhecimento das características biológicas do micro-organismo faz-se necessário, sendo indispensável ao desenvolvimento do processo industrial.

2.1.2.3. Rotas metabólicas

A biossíntese de 2,3-BDO é metabolicamente dependente de três enzimas, consideradas enzimas-chave do processo: α -acetolactato sintase (ALS), α -acetolactato descarboxilase (ALDC) e 2,3-BDO desidrogenase (BDH, também chamada de acetoína redutase) (JI *et al.*, 2011).

Todas essas enzimas apresentam atividade ótima em pH ácido, condição na qual o piruvato, originado da glicólise ou da combinação entre a via glicolítica e a via das pentoses-fosfato, é convertido em 2,3-BDO, um metabólito neutro, além de acetato, lactato, succinato, acetoína e etanol (MADDOX, 1996). Por conta dessa conversão característica, a fermentação de 2,3-BDO é conhecida como butileno-glicólica (VAN HOUTT *et al.*, 2007) ou de pH misto.

Cada micro-organismo apresenta sua rota e sua atividade metabólicas. Logo, a via biotecnológica pode diferir conforme a espécie de bactéria utilizada. Entretanto, de um modo geral, o piruvato é, inicialmente, convertido em α -acetolactato, a partir da ação da enzima ALS. Essa enzima promove a descarboxilação do piruvato, sob condições anaeróbias e de baixa disponibilidade de NADH. A presença de oxigênio inativa a ALS, o que afeta a produção de 2,3-BDO (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

A enzima ALDC é responsável pela conversão do α -acetolactato em acetoína, que por sua vez é convertida em 2,3-BDO pela ação da enzima BDH, na ausência de oxigênio. Caso o α -acetolactato entre em contato com um ambiente aeróbio, uma descarboxilação espontânea é favorecida, levando à geração de diacetil. O diacetil é convertido em acetoína pela enzima diacetil redutase e, por fim, a enzima BDH promove a redução da acetoína a 2,3-BDO (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

Todas as enzimas e substâncias presentes na rota produtiva do 2,3-BDO são obtidas nas fases exponencial e estacionária do crescimento microbiano (estacionária quando em frascos agitados), pois nelas ocorre a limitação de oxigênio, condição necessária para suas sínteses (MALLONEE e SPECKMAN, 1988). O pH ácido contribui, ainda, para a obtenção de várias dessas enzimas, ao permitir que o acetato, gerado paralelamente ao 2,3-BDO, induza suas formações (BRYN *et al.*, 1973).

A Figura 2 ilustra a via fermentativa de produção do 2,3-BDO, bem como dos sub-produtos etanol, acetato, lactato e formato.

2.1.2.3.1. Síntese dos isômeros de 2,3-BDO

O mecanismo responsável pela formação dos isômeros de 2,3-BDO ainda é pouco conhecido, mas muito discutido entre especialistas da área. Desde 1960, estudiosos tentam estabelecer modelos capazes de explicar a síntese de cada forma isomérica, baseando-se, para isso, em mecanismos bioquímicos, que levam em consideração a atividade específica de determinadas enzimas, conforme o tipo de micro-organismo utilizado (JI *et al.*, 2011).

Ui *et al.* (1984) propuseram modelos de síntese dos isômeros para as bactérias *K. pneumoniae* e *P. polymyxa*, baseando-se na existência de algumas enzimas. No caso de *K. pneumoniae*, eles atribuíram a três 2,3-BDO desidrogenases a responsabilidade pela geração de cada isômero: *meso*-2,3-BDO desidrogenase (D-(-)-acetoína), *meso*-2,3-BDO desidrogenase (L-(+)-acetoína) e L-(+)-2,3-BDO desidrogenase. Para *P. polymyxa*, eles propuseram um modelo baseado em duas enzimas: NADPH-dependente diacetil redutase (L-(+)-acetoína) e D-(-)-2,3-BDO desidrogenase, cujas atividades justificaram a formação dos isômeros *levo* e *meso*.

A Figura 3 ilustra a rota metabólica de síntese de cada um dos três isômeros de 2,3-BDO.

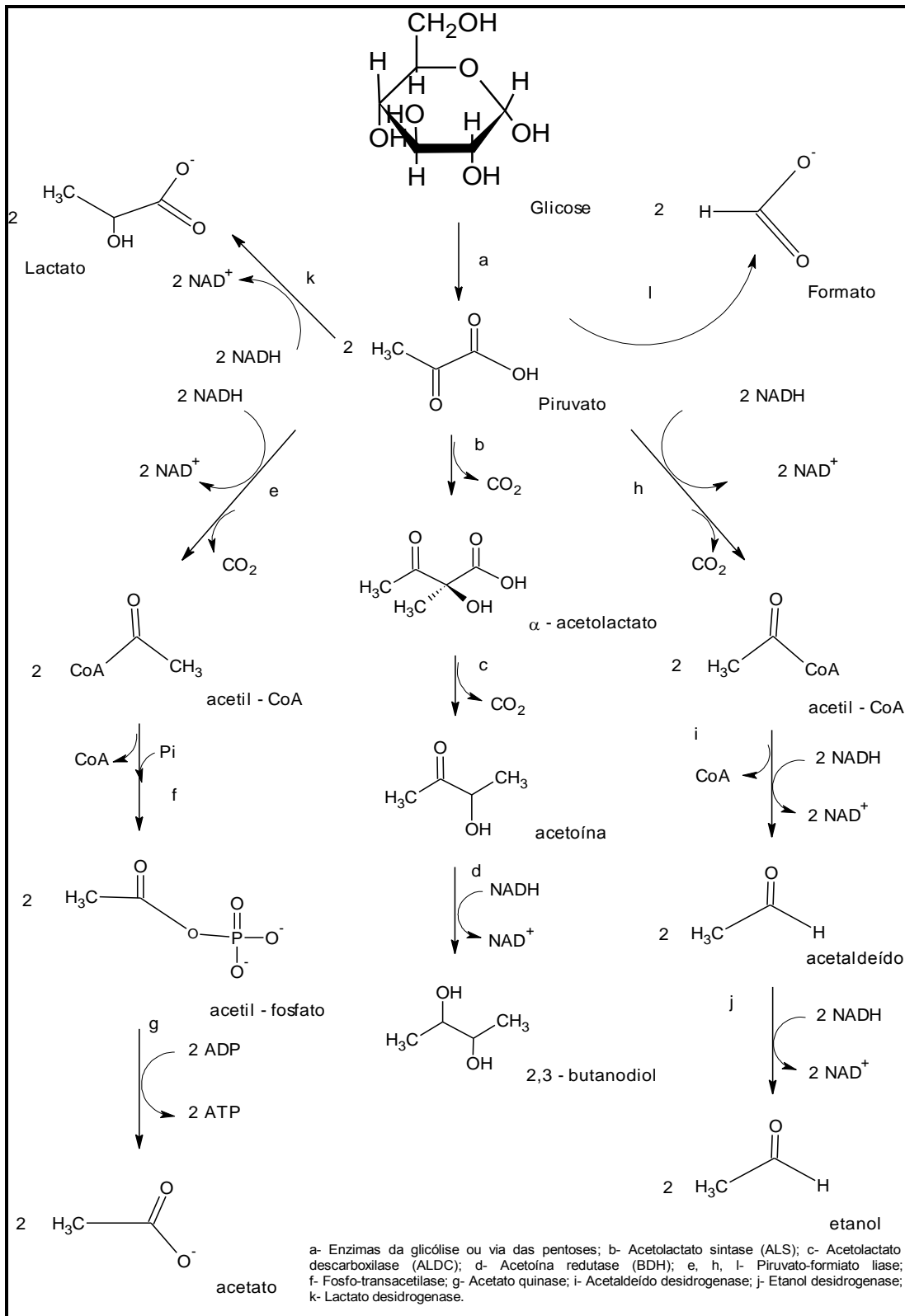


Figura 2: Rota metabólica de produção de 2,3-BDO e de sub-produtos.

(Desenho próprio, baseado em MADDOX, 1996)

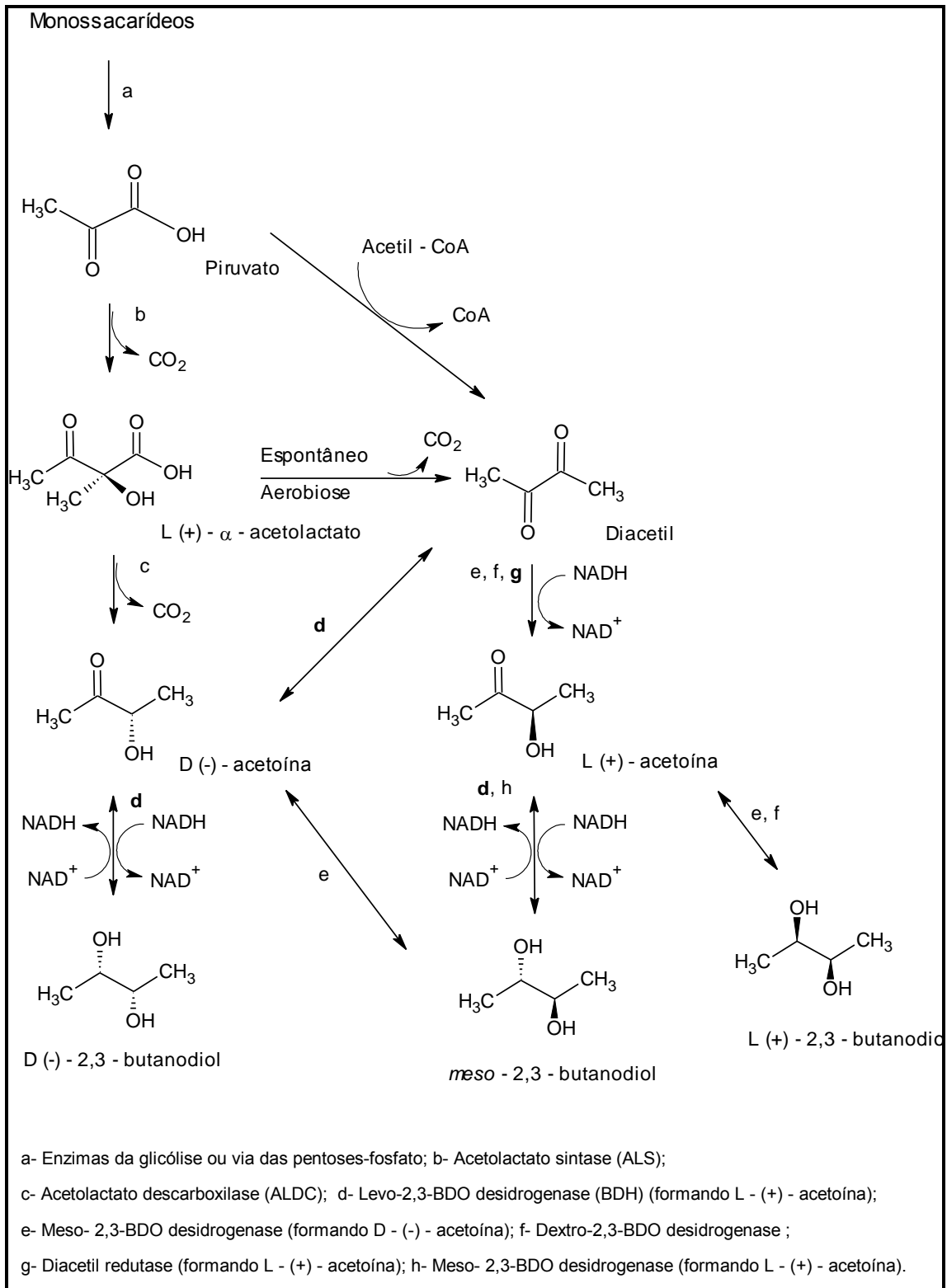


Figura 3: Mecanismo de síntese dos isômeros de 2,3-BDO, proposto para as bactérias *K. pneumoniae* e *P. polymyxa*. As letras, correspondentes às enzimas, que estão em negrito são usadas por *P. polymyxa*, somente. A enzima g é considerada NADPH-dependente, enquanto às demais são NADH-dependentes.

(Desenho próprio, baseado em JI *et al.*, 2011)

2.1.2.3.2. Função biológica do 2,3-BDO

A função metabólica da síntese de 2,3-BDO é, ainda, pouco conhecida. No entanto, sabe-se que a produção desse composto é essencial para os micro-organismos produtores, sobretudo do ponto de vista fisiológico. Essa condição está associada ao fato de o 2,3-BDO contribuir para a prevenção da acidificação intracelular, em razão de sua natureza neutra, bem como participar da regulação de NADH/NAD^+ no interior das células, o que ajuda a compensar a perda de energia associada à glicólise. Além disso, ele consiste em uma forma de estocagem de carbono e energia, utilizados no crescimento microbiano, especialmente na fase estacionária, quando o substrato já foi totalmente consumido (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009; JI *et al.*, 2011).

2.1.3. Fatores determinantes de produção

2.1.3.1. Oxigênio dissolvido

A disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo é um fator crítico do processo, uma vez que é responsável pelo rendimento e produtividade de 2,3-BDO, bem como pela formação de sub-produtos, conseguida a partir do direcionamento do metabolismo para uma determinada via bioquímica (PETROV e PETROVA, 2010). Além disso, a presença adequada de oxigênio no meio promove a geração de biomassa celular, que por sua vez levará à produção de 2,3-BDO, a partir da assimilação do substrato e demais nutrientes.

O suprimento de oxigênio normalmente é conseguido por meio do controle de duas condições operacionais: aeração e agitação. O equilíbrio entre a aeração e a agitação tem impacto sobre o parâmetro kLa - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio - de processos conduzidos em biorreator, em que o controle dessas variáveis pode ser realizado de maneira eficiente. O kLa reflete a capacidade do sistema em transferir oxigênio para a fase líquida, o que determina as condições de (micro)aerobiose vivenciadas pelas células.

2.1.3.1.1. Aeração

A aeração é considerada a variável mais importante nos processos de produção de 2,3-BDO, uma vez que esse composto é produzido sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio. A aeração se relaciona à manutenção do equilíbrio entre NAD^+ e NADH , que participam da rota metabólica de 2,3-BDO e que dependem da relação acetoína:2,3-BDO. Essa razão surge a partir da reação reversível entre acetoína e 2,3-BDO, na qual o NADH da glicólise é regenerado pela ação da enzima BDH (BLOMQUIST *et al.*, 1993).

Nos ambientes de pouca aeração, classificados como microaeróbios, a atividade da enzima ALS é mantida e o α -acetolactato pode ser convertido em 2,3-BDO sem nenhum problema. Em contrapartida, em ambientes aeróbios, a enzima ALS pode ser inativada, fenômeno explicado por Voloch *et al.* (1985). Vale ressaltar que nesse e em outros estudos, as bactérias empregadas foram a *Klebsiella* e a *P. polymyxa*, microorganismos aeróbio-facultativos, capazes, portanto, de obter energia por meio da fermentação e da respiração. Essas diferentes rotas metabólicas são simultaneamente ativadas sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio, que, ao mesmo tempo em que favorecem o rendimento de 2,3-BDO, levam à diminuição da taxa de conversão global do substrato a 2,3-BDO, devido à baixa densidade óptica celular produzida (CONVERTI *et al.*, 2003).

Apesar de 2,3-BDO ser um produto do metabolismo anaeróbico, e, portanto, essa condição ser necessária nos ensaios fermentativos, processos com aeração, para controle da biomassa celular, têm sido investigados (PRIYA *et al.*, 2016). Um exemplo são os estudos de Metsovitt *et al.* (2012b), que verificaram a produção de 2,3-BDO sob condições aeróbicas, usando *Enterobacter*, em frascos agitados. Esses estudos revelam a necessidade de se estabelecer a quantidade de oxigênio ideal à fermentação, a fim de que um equilíbrio entre a produtividade volumétrica de 2,3-BDO e a concentração celular no meio de cultivo sejam alcançados (CELÍŇSKA e GRAJEK, 2009).

O estabelecimento da aeração ideal no processo é também importante para o controle da síntese dos sub-produtos da fermentação de 2,3-BDO: etanol, formato, acetato, lactato e acetoína, cujas produções se dão sob anaerobiose. Sob aeração controlada, o etanol e o formato podem ser evitados e o substrato pode ser

majoritariamente convertido em 2,3-BDO (MADDOX, 1996). No entanto, se o oxigênio fornecido ao processo exceder a quantidade necessária à fermentação, somente dióxido de carbono (CO₂) e biomassa celular serão produzidos, fazendo com que haja redução nos níveis de 2,3-BDO, como verificado por Motiwani *et al.* (1993).

O controle do oxigênio é, portanto, variável importante do processo, pois além de contribuir com o rendimento e com a produtividade de 2,3-BDO, pode minimizar a formação de sub-produtos, cuja presença pode dificultar a recuperação do 2,3-BDO e, conseqüentemente, encarecer a etapa de processamento *downstream*. Além disso, esses sub-produtos podem atuar como inibidores da fermentação de 2,3-BDO, comprometendo, novamente, a produção desse álcool (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

2.1.3.1.2 Agitação

A agitação do meio de cultivo é, intrinsecamente, associada à aeração. A importância da agitação está no fato de permitir a exposição de novos substratos à cultura celular, bem como de disseminar os metabólitos em todo o ambiente de fermentação (GARG e JAIN, 1995).

A agitação, assim como a aeração, apresenta um valor ótimo, no qual a produção de 2,3-BDO é maximizada, mediante tipo de micro-organismo e natureza do substrato utilizados (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). Normalmente, as fermentações são conduzidas entre 300 e 800 rpm. Abaixo de 300 rpm, os nutrientes podem não ser eficientemente disponibilizados ao micro-organismo (AMANULLAH *et al.*, 2004), por problemas operacionais do equipamento, dado o aumento da viscosidade do meio e da produção de exopolissacarídeos (EPS). Häßler *et al.* (2012) observaram a formação de biofilme no vaso de fermentação, conduzida a 300 rpm. Por outro lado, acima de 800 rpm, o processo torna-se demasiadamente caro, apesar de a produtividade volumétrica tender a aumentar, bem como o *kLa*. No entanto, a seletividade dos isômeros de 2,3-BDO acaba diminuindo, o que pode comprometer o rendimento de uma forma enantiomérica específica, caso esse seja o objetivo da fermentação (HÄßLER *et al.*, 2012).

Portanto, a agitação é particularmente importante à fermentação de 2,3-BDO, pois contribui para o aumento da eficiência de conversão do substrato e de geração do produto de interesse, auxiliando, também, na transferência de oxigênio ao meio.

2.1.3.2. Temperatura

A temperatura é uma importante variável do processo fermentativo, uma vez que está associada ao controle da atividade enzimática e à manutenção celular (GARG e JAIN, 1995; MARWOTO *et al.*, 2002). Em ambas as situações, uma faixa de temperatura é considerada adequada para a fermentação microbiana, sendo que para a fermentação bacteriana esta faixa varia de 30 a 35°C, considerando uma máxima conversão da fonte de carbono (CELÍŃSKA e GRAJEK, 2009; LI *et al.*, 2013).

O conhecimento da faixa ideal de temperatura é fundamental ao processo, sobretudo porque cada micro-organismo apresenta uma região ótima de atividade, que não sendo respeitada pode resultar em falhas na regulação metabólica microbiana (condição “sub-ótima”), bem como na degradação enzimática (condição “super-ótima”). Além disso, essa temperatura ótima depende da natureza e tipo de substratos usados, o que ratifica a necessidade de se determinar, individualmente a cada linhagem microbiana, a faixa ideal de temperatura (CELÍŃSKA e GRAJEK, 2009).

No caso da bactéria *P. polymyxa*, a faixa de temperatura ideal varia de 25 a 40°C. Acima de 40°C, a produção de 2,3-BDO pode ser inviabilizada, em razão do comprometimento da atividade metabólica microbiana (HÄBLER *et al.*, 2012). Já em temperaturas em torno de 25°C ou menos, a produção de outros metabólitos é favorecida “às custas” do 2,3-BDO, o que resulta em baixos valores de rendimento e produtividade (PRIYA *et al.*, 2016). De modo geral, a temperatura de 37°C é considerada a temperatura ótima para a bactéria *P. polymyxa*, embora algumas linhagens apresentem variações em torno desse valor.

A Tabela 2 apresenta um resumo da temperatura usada na produção de 2,3-BDO pelas principais espécies e linhagens de bactérias, cujas informações foram extraídas de diferentes trabalhos da literatura.

Tabela 2: Temperatura de produção de 2,3-BDO para as principais bactérias produtoras.

Espécie/Linhagem	Temperatura (°C)	Referência Bibliográfica
<i>Enterobacter aerogenes</i>	39	PEREGO <i>et al.</i> (2000)
<i>Clostridium pasteurianum</i> ATCC 6013365	37	VENKATARAMANAN <i>et al.</i> (2012)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365	37	HÄBLER <i>et al.</i> (2012) e OKONKWO <i>et al.</i> (2017)
<i>Klebsiella</i> sp. e <i>Serratia</i> sp.	30	HUANG <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus amyloquefaciens</i> B10-127	37	YANG <i>et al.</i> (2013)
<i>P. polymyxa</i> CJX518	37	DAI <i>et al.</i> (2014)
<i>Raoutella</i> sp.	30	RIPOLL <i>et al.</i> (2016)
<i>K. oxytoca</i> GSC 12206	37	KIM <i>et al.</i> (2016)
<i>E. cloacae</i> TERI BD 18	37	PRIYA <i>et al.</i> (2016)

2.1.3.3. Potencial hidrogeniônico (pH)

O potencial hidrogeniônico, pH, é considerado o segundo mais importante parâmetro relacionado ao processo fermentativo de produção de 2,3-BDO, ficando atrás, apenas, do oxigênio dissolvido (ver seção 2.1.3.1. *Oxigênio dissolvido*). A justificativa dessa condição se deve à característica particular dessa fermentação: a síntese metabólica de 2,3-BDO ocorre em meio ácido (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

A acidez da fermentação de 2,3-BDO é resultante do aumento de formas tóxicas não-dissociadas no meio, que estimulam o micro-organismo a desenvolver estratégias de defesa. Um exemplo dessas estratégias é a geração de compostos neutros, como o 2,3-BDO, que auxilia no controle do pH intracelular. O pH interno das células permite que as enzimas envolvidas no metabolismo do 2,3-BDO passem a apresentar atividade de síntese, culminando, então, na produção desse composto (MADDOX, 1996; VAN HOUTT *et al.*, 2007).

Assim como para a temperatura, há uma faixa ótima de pH para a produção de 2,3-BDO, que também é fortemente dependente do micro-organismo e do substrato

utilizados (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). Geralmente, para as principais bactérias produtoras de 2,3-BDO, o pH ótimo encontra-se entre 5,0 e 6,0 (PIRT, 1975).

Valores extremos de pH comprometem a atividade enzimática, fazendo com que as convencionais vias metabólicas sejam substituídas por outras rotas capazes de fornecer a energia necessária ao micro-organismo (ROMIO, 2014). Variações abruptas de pH causam modificações nos sítios ativos de diversas enzimas, resultando em perda de eficiência na produção de 2,3-BDO (VOLOCH *et al.*, 1985).

O pH é também responsável pela redução da fase *lag* do crescimento microbiano, ao favorecer a assimilação eficiente da fonte de carbono. Isso permite que a fase exponencial seja logo alcançada e, conseqüentemente, que uma significativa quantidade de biomassa celular seja gerada (PRIYA *et al.*, 2016).

A Tabela 3 apresenta um resumo do pH usado na produção de 2,3-BDO para as principais espécies e linhagens de bactérias produtoras, cujas informações foram extraídas de diferentes trabalhos da literatura.

Tabela 3: Potencial hidrogeniônico (pH) para a produção de 2,3-BDO, de acordo com a bactéria produtora.

Espécie/Linhagem	pH	Referência Bibliográfica
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5,5	PEREGO <i>et al.</i> (2000)
<i>Clostridium pasteurianum</i> ATCC 6013365	5-7	VENKATARAMANAN <i>et al.</i> (2012)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365	6,0 – 6,5	HÄBLER <i>et al.</i> (2012)
<i>Klebsiella</i> sp. e <i>Serratia</i> sp.	6,6	HUANG <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus amyloquefaciens</i> B10-127	6,5	YANG <i>et al.</i> (2013)
<i>P. polymyxa</i> CJX518	5,2	DAI <i>et al.</i> (2014)
<i>Raoutella</i> sp.	Neutro	RIPOLL <i>et al.</i> (2016)
<i>K. oxytoca</i> GSC 12206	6,5	KIM <i>et al.</i> (2016)
<i>E. cloacae</i> TERI BD 18	6,5	PRIYA <i>et al.</i> (2016)
<i>P. polymyxa</i> DSM 365	6,0 - 6,5	OKONKWO <i>et al.</i> (2017)

2.1.3.4. Concentração inicial de substrato

A concentração inicial da fonte de carbono é um importante fator fermentativo, uma vez que é responsável, diretamente, pela concentração final dos produtos da fermentação (PRIYA *et al.*, 2016), cujos rendimentos são obtidos com base na quantidade de massa que entra no sistema. Além disso, é responsável pela geração de biomassa celular, que pode sofrer os efeitos de inibição, caso essa concentração atinja o limite metabólico de assimilação por parte do micro-organismo (LI *et al.*, 2014).

Os processos de produção de 2,3-BDO reportados na literatura utilizam, na grande maioria das vezes, uma concentração inicial de açúcar, como fonte de carbono, na faixa entre 5,0 e 10,0% (GARG e JAIN, 1995). A razão dessa baixa concentração inicial está diretamente relacionada à inibição que o excesso de substrato no meio de cultivo pode causar. Sob esse efeito, a atividade enzimático-metabólica das células tende a sofrer alterações, que, por sua vez, levam à redução da velocidade específica de crescimento celular (devido a uma queda na atividade da água) e da produtividade de 2,3-BDO (CELÍNSKA e GRAJEK, 2009). McCall e Georgi (1954) verificaram que concentrações de sacarose em torno de 170 g.L⁻¹ corroboraram para uma fermentação incompleta e menos eficiente de 2,3-BDO, usando *Aerobacter aerogenes*.

Além da inibição por excesso de carbono, a inibição por substâncias tóxicas (sulfatos, furfural e compostos fenólicos) pode acontecer. Essas substâncias estão associadas a substratos originados de fontes residuais (hidrolisados agroindustriais e de madeiras), condição que confere uma relação direta entre sua concentração no meio de cultivo e a concentração da fonte de carbono. Em outras palavras, uma maior quantidade de açúcar conterà uma maior quantidade de compostos tóxicos, se o substrato se originar de biomassa, cuja disponibilização do carbono requer uma etapa prévia de tratamento, responsável pela liberação dessas substâncias (CELÍNSKA e GRAJEK, 2009). Long e Patrick (1963) verificaram esse tipo de inibição em meios contendo açúcares de biomassa lignocelulósica.

O aumento da concentração inicial de substrato pode, no entanto, favorecer a produção de 2,3-BDO, desde que o substrato seja originado de uma fonte não-residual de carbono. Geralmente, substratos comerciais apresentam um nível de pureza elevado e, por isso, compostos inibitórios não são identificados no meio de fermentação. Nesses

casos, concentrações de até 200 g.L⁻¹ de açúcar podem ser fermentadas, sem haver comprometimento do crescimento celular e das atividades metabólicas, que, ao contrário, acabam favorecidas, refletindo na melhoria do rendimento de 2,3-BDO. Todavia, deve-se notar que a produção de 2,3-BDO é dependente da espécie de micro-organismo empregada, já que a capacidade de metabolizar as fontes de carbono existentes de maneira eficiente varia de acordo com o micro-organismo empregado. Sendo assim, cada cultura celular apresentará um arranjo de condições específicas de cultivo considerado ótimo e que favorecerá a cinética de produção de 2,3-BDO (CELÍŃSKA e GRAJEK, 2009). De Mas *et al.* (1988) propuseram uma concentração máxima de substrato de 150 g.L⁻¹ ao empregarem *Bacillus polymyxa*, enquanto Long e Patrick (1963) propuseram uma concentração de 40 g.L⁻¹ de hidrolisado de madeira ao empregarem *K. pneumoniae*.

A concentração inicial de substrato (S_0) também se relaciona diretamente com alguns parâmetros cinéticos como o tempo de fermentação (TF) e a eficiência de conversão (E) da fonte de carbono. A relação entre S_0 e TF é direta, enquanto que com E, é inversa, de modo que a elevação dos níveis iniciais de substrato faz com que o tempo do processo fermentativo seja aumentado, mas o rendimento do produto diminuído (PEREGO *et al.*, 2000). O tempo passa a ser maior, pois há mais carbono para ser convertido no meio de cultura. Já o rendimento tende a cair, fazendo com que a eficiência de conversão também caia, uma vez que uma mesma quantidade de células está, agora, sujeita a mais biomassa para utilizar o substrato no processo fermentativo. Essa condição acaba dificultando a atuação eficiente por parte do micro-organismo.

Diante do exposto, é possível notar que da mesma forma em que a temperatura, o pH e o oxigênio dissolvido devem ser otimizados, a concentração inicial de substrato deve ser definida em valores ideais, a fim de que a produção de 2,3-BDO seja favorecida de maneira eficiente.

2.1.4. Estratégias de melhoria produtiva e econômica do processo

2.1.4.1. Suplementação nutricional

Diferentes estudos reportados na literatura verificaram que o uso de suplementos exógenos ao meio de fermentação, como acetato, succinato, lactato, formato, compostos nitrogenados, algumas vitaminas e traços de metais, contribuiu para a melhoria do rendimento de 2,3-BDO no processo produtivo (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009; JI *et al.*, 2011).

Dentre esses aditivos, o acetato é considerado um dos mais eficientes em se tratando do aumento do rendimento e da produção de 2,3-BDO. A justificativa está nos efeitos que gera sobre a rota metabólica, especialmente sobre as enzimas ALS, ALDC e BDH (ver seção 2.1.2.3. *Rotas metabólicas*). Essas enzimas são induzidas a produzirem o 2,3-BDO, a partir do piruvato gerado na glicólise, na presença de acetato. Além disso, o acetato regula o balanço entre o 2,3-BDO e a acetoína (precursora do 2,3-BDO), sob limitação de oxigênio e baixo pH, o que garante os altos níveis do produto ao final da fermentação (BRYN *et al.*, 1973; CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). Nakashimada *et al.* (2000) observaram que a adição de 150 mM de acetato, cerca de 0,9 % (m/v), favoreceu a obtenção de 2,3-BDO por *P. polymyxa*, em detrimento dos sub-produtos etanol, lactato e hidrogênio, cujas concentrações acabaram reduzidas. Yu e Saddler (1982) também obtiveram melhores resultados ao utilizarem até 166,5 mM, cerca de 1,0 % (m/v), de ácido acético, bem como 83,25 mM, cerca de 0,5 % (m/v), de acetato, em culturas de *K. pneumoniae*.

Os compostos nitrogenados também apresentam relevância no contexto da suplementação nutricional, uma vez que fornecem nitrogênio ao processo fermentativo. Essa substância está diretamente ligada à síntese proteica, na qual as proteínas geradas são utilizadas no metabolismo celular de geração de biomassa e de fabricação de novas enzimas (JI *et al.*, 2011). Por essa razão, o nitrogênio deve ser disponibilizado ao micro-organismo produtor de 2,3-BDO em quantidades adequadas. Normalmente, o meio de cultivo é composto por extrato de levedura, uma rica fonte de nitrogênio. Entretanto, devido ao seu alto custo, o extrato de levedura tem sido substituído por fontes

alternativas (ver seção seguinte 2.1.4.2. *Fontes alternativas de carbono e nitrogênio*), como o sulfato de amônio, a ureia (SIVAKUMAR *et al.*,1995), o licor de milho e o fosfato de amônio (JI *et al.*, 2009b). Essas substâncias disponibilizam o nitrogênio necessário à síntese proteica, o que, conseqüentemente, compele para a atividade enzimática de geração de 2,3-BDO.

Por fim, o uso de traços de manganês, potássio e magnésio pode ser realizado para aumentar a produção de 2,3-BDO, segundo Anvari e Motlagh (2011). Além desses metais-traço, ferro e diferentes fosfatos podem ser empregados com o mesmo objetivo, como verificado por Qin e seus colaboradores (2006). O fósforo, obtido a partir desses fosfatos, não somente contribui para a melhoria no rendimento de 2,3-BDO, como também apresenta outras funções metabólicas: juntamente com os íons K^+ , ele é utilizado na regeneração de ATP, bem como na biossíntese de pirofosfato-5-fosforribosil (WANG *et al.*, 2007).

2.1.4.2. Fontes alternativas de nitrogênio e carbono

Uma parcela significativa dos custos de produção de 2,3-BDO está associada às fontes de nitrogênio e carbono/energia utilizadas no processo fermentativo. Diferentes estudos foram e estão sendo desenvolvidos com o intuito de reduzir os gastos com substratos e nutrientes, de modo que a rota biotecnológica de geração de 2,3-BDO se torne economicamente viável, sem deixar de ser produtiva. Esses estudos têm tentado, portanto, viabilizar diferentes fontes alternativas de nitrogênio e carbono, para que, então, sob condições adequadas, elas sejam assimiladas eficientemente e usadas na síntese de 2,3-BDO (JI *et al.*, 2011).

Dentre as fontes de nitrogênio, o extrato de levedura é uma das mais utilizadas na fermentação de 2,3-BDO (LAUBE *et al.*, 1984a,b). Apesar de ser rico em nitrogênio, o extrato de levedura é considerado economicamente inviável ao processo industrial, devido ao seu elevado custo, o que limita sua aplicação em larga escala. Diante disso, outras substâncias, como os sais de sulfato e fosfato de amônio (SIVAKUMAR *et al.*, 1995), têm sido investigadas, a fim de serem aplicadas no processo produtivo. Além do baixo custo, essas fontes disponibilizam nitrogênio inorgânico às células microbianas. A

natureza desse nitrogênio faz com que complicações no processamento *downstream*, resultantes do nitrogênio orgânico presente no extrato de levedura, sejam minimizados. (QIN *et al.*, 2006).

O licor de milho (também chamado de sólidos derivados do milho) é outro exemplo de substituto do extrato de levedura. Estudos comprovam sua excelente assimilação por culturas microbianas, o que favorece a síntese de 2,3-BDO. Ademais, apresenta baixo custo, sendo uma opção economicamente interessante (ADLAKHA e YAZDANI, 2015). Outros exemplos são o extrato de carne, a peptona, a ureia, o citrato e o cloreto de amônio, cujos impactos positivos no bioprocessamento podem ser constatados pela melhoria do crescimento microbiano e da produção de 2,3-BDO (YAN *et al.*, 2012).

Em relação à fonte de carbono, dois tipos distintos de substrato têm sido empregados: os não-celulósicos e os lignocelulósicos. Ambos podem ser disponibilizados sob a forma original ou como resíduos, sendo estes utilizados, atualmente, de maneira preferencial àqueles. Os principais exemplos dos materiais não-celulósicos são: as biomassas ricas em hexoses, como a alcachofra de Jerusalém e a cana-de-açúcar; o glicerol, co-produto do biodiesel (JI *et al.*, 2011); os resíduos da indústria de alimentos (como o soro de leite) e das indústrias sucroalcooleiras (como o melaço de cana); e os hidrolisados obtidos do processamento do milho (PEREGO *et al.*, 2003). Já os exemplos que representam os materiais lignocelulósicos são: a madeira (GROVER *et al.*, 1990); a espiga de milho (CAO *et al.*, 1997); a palha e o bagaço de cana-de-açúcar; e demais resíduos de biomassa verde.

O melaço é um exemplo de fonte de açúcares fermentescíveis que tem ganhado especial atenção, devido à sua disponibilidade e ao seu baixo custo (JIMÉNEZ *et al.*, 2004). Encontrado sob a forma de um xarope escuro, obtido do processo de extração de açúcar, o melaço da cana-de-açúcar, por exemplo, contém grandes quantidades de sacarose, além de frutose e glicose, que podem ser aproveitadas na síntese de diferentes biomoléculas de interesse industrial (JUNG *et al.*, 2013). O melaço pode ser usado, ainda, como um suplemento nutricional, fornecendo outras substâncias necessárias ao processo fermentativo, com o intuito de melhorar a assimilação do carbono e, como consequência, aumentar a produção do composto de interesse, em especial, a de 2,3-BDO.

Outros exemplos de fontes de carbonos são os açúcares originados da hidrólise de materiais lignocelulósicos, que têm sido usados na produção de 2,3-BDO há algum tempo. O interesse por esse tipo de substrato perpassa não somente a questão ambiental, mas também a necessidade de se obter uma fonte mais barata e de maior renovação, que possa ser aproveitada com igual ou maior eficiência que as fontes convencionais e comerciais de carbono. De acordo com Marwoto *et al.* (2002), a conversão de xilose (açúcar obtido da sacarificação de materiais lignocelulósicos) a D-gliceraldeído-3-fosfato por meio da via das pentoses fosfato é energeticamente equivalente à glicólise, com geração do mesmo D-gliceraldeído-3-fosfato (composto intermediário da glicólise), para diferentes micro-organismos. Esse, por sua vez, é convertido, até que o piruvato seja formado, quando, então, a síntese do 2,3-BDO é iniciada.

2.1.4.2.1. Glicerol

O glicerol ($C_3H_8O_3$), também chamado de 1,2,3-propanotriol (forma comercial), glicerina e glicerina loira (formas residuais), é um álcool simples, produzido durante a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais, juntamente com o biodiesel (éster etílico) (COLIN *et al.*, 2001). A transesterificação é caracterizada pela hidrólise de triglicerídeos, conseguida mediante reação com metanol ou etanol, na presença de NaOH ou KOH como catalisador. O glicerol formado é considerado um co-produto, uma vez que sua concentração se encontra em torno de 10,0 % (v/v) (MU *et al.*, 2006).

O glicerol está relacionado à indústria de biodiesel. Nos últimos anos, depois que o biodiesel passou a ser considerado um combustível renovável, sua demanda aumentou consideravelmente entre países como os da União Europeia, Estados Unidos e Brasil (DA SILVA *et al.*, 2009). Apesar desse crescimento, muitas companhias europeias, por exemplo, não têm mantido seus negócios, devido a problemas gerados com o excesso de glicerol produzido juntamente com o biodiesel. Tanto a disposição, quanto o custo de operação, relacionados ao glicerol, têm contribuído para o colapso dessas companhias (DHARMADI *et al.*, 2006).

Diante desse impasse, diferentes estratégias de aproveitamento do glicerol têm sido investigadas, todas baseadas em suas propriedades e, principalmente, em sua

versatilidade de aplicações. Devido à sua ocorrência natural, o glicerol pode ser utilizado como uma eficiente fonte de carbono e energia por diferentes microorganismos, com destaque às bactérias. Ele pode substituir carboidratos convencionais, como glicose e sacarose, nas fermentações microbianas, incluindo operações em larga escala. Sua bioconversão corrobora, portanto, com a produtividade da indústria de biodiesel, adicionando valor ao processo (DA SILVA *et al.*, 2009).

O glicerol também está presente em outras aplicações, sendo usado, por exemplo, como matéria-prima para a produção de diversos produtos químicos (WANG *et al.*, 2001), entre eles o 2,3-BDO, o 1,3-PDO, alguns ácidos orgânicos (succínico, cítrico e propiônico), o etanol e alguns biosurfactantes. Seu maior grau de redução, quando comparado ao de açúcares, faz com que os compostos citados sejam produzidos com maior rendimento, o que, associado a um baixo custo e à abundância na natureza, fazem do glicerol um composto promissor na geração de valor à indústria química e bioquímica (DHARMADI *et al.*, 2006).

2.1.4.2.1.1. Metabolismo microbiano do glicerol

O metabolismo de conversão de glicerol a 2,3-BDO é caracterizado por reações de oxirredução e, inicialmente, dependente de duas principais enzimas, responsáveis por levar o glicerol a piruvato: glicerol desidrogenase e dihidroxiacetonaquinase (DA SILVA *et al.*, 2009).

Primeiramente, em uma rota oxidativa, o glicerol é convertido em dihidroxiacetona pela ação catalítica da enzima glicerol desidrogenase, dependente de NAD^+ . Posteriormente, a enzima dihidroxiacetonaquinase promove a fosforilação dessa dihidroxiacetona, transformando-a em dihidroxiacetona-P. Esta é oxidada a fosfoenolpiruvato, pela redução de NAD^+ a NADH_2 , com geração de ATP. O fosfoenolpiruvato sofre desfosforilação, de maneira que o piruvato é produzido. A partir deste ponto, o piruvato segue a rota metabólica de produção de 2,3-BDO, já apresentada neste trabalho (ver seção 2.1.2.3. *Rotas metabólicas*) (DA SILVA *et al.*, 2009).

A Figura 4 ilustra a via fermentativa de produção do 2,3-BDO, a partir do glicerol.

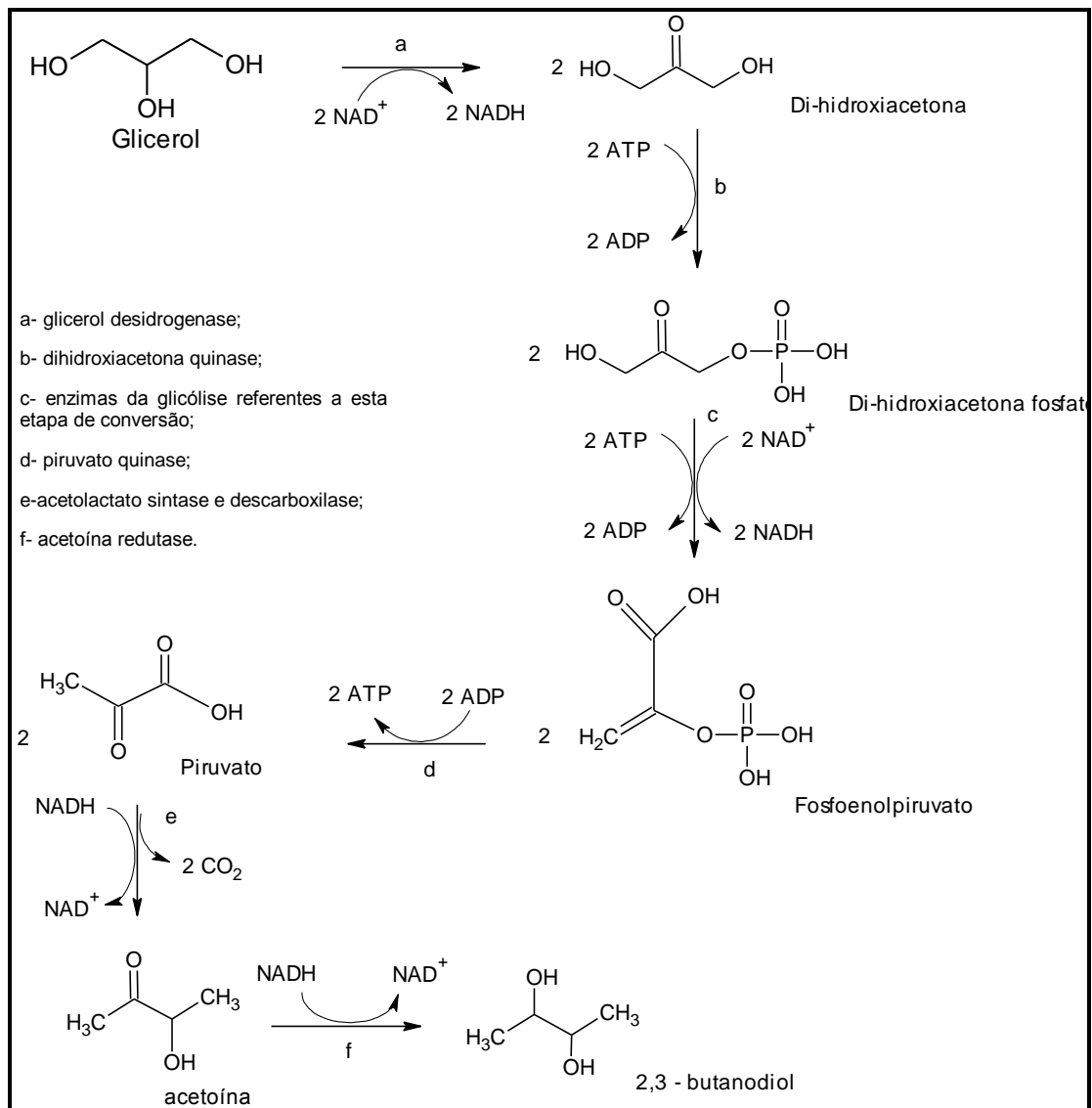


Figura 4: Fluxo metabólico de produção de 2,3-BDO a partir do glicerol.

(Desenho próprio, baseado em DA SILVA *et al.*, 2009)

2.1.4.2.1.2. Glicerol residual

O glicerol resultante do processo de obtenção de biodiesel, por ser um resíduo produzido em quantidades significativas, está intrinsecamente relacionado a impasses ambientais, como os que envolvem a questão da disposição de resíduos. Estima-se que, em 2006, cerca de 250 milhões de libra-massa de glicerol (cerca de 113Kton) tenham sido produzidas somente nos Estados Unidos (WERPY *et al.*, 2004). Esse dado demonstra a dimensão produtiva do glicerol residual, evidenciando a necessidade de se

reaproveitá-lo de alguma forma, ainda que, historicamente, seu reaproveitamento seja considerado caro, dado o custo de US\$0,60-0,90/lb de glicerol (cerca de US\$1,33-2,00/Kg) (JOHNSON e TACONI, 2007).

No entanto, com o desenvolvimento do mercado de biodiesel, o custo envolvido na purificação do glicerol reduziu consideravelmente, passando a ser de US\$0,05/lb (cerca de US\$0,11/Kg) (JOHNSON e TACONI, 2007). Como o glicerol pode ser convertido em diferentes produtos químicos, servindo, inclusive, como fonte de carbono e energia em bioprocessos (ANITHA *et al.*, 2016), seu reaproveitamento como matéria-prima tem se tornado economicamente interessante. Isso tem estimulado a criação das chamadas biorrefinarias, que veem no glicerol uma oportunidade sustentável de mercado, sobretudo a longo prazo (HE *et al.*, 2017).

Em relação ao 2,3-BDO, a forma residual de glicerol não necessita passar por um tratamento prévio para ser usada como substrato na fermentação microbiana. Conseqüentemente, a produção de 2,3-BDO se torna mais barata e mais passível de ser implementado em larga escala (PRIYA *et al.*, 2016), o que justifica a utilização de glicerol residual nesse processo.

O glicerol residual apresenta, ainda, diferentes aplicações baseadas em algumas de suas propriedades físico-químicas: ele é capaz de gerar energia térmica, em torno de 9000 BTU/lb (cerca de 21000KJ/Kg), a partir de sua queima; e pode ser usado como suplemento na alimentação animal, dada a presença de impurezas em sua composição, como sais, álcool e água (HEDTKE, 1996), que são metabolicamente aproveitados.

Além dessas aplicações, a conversão do glicerol em *commodities* tem sido fortemente visada nos últimos anos, como parte integrante do processo de fabricação do biodiesel, sobretudo porque, por meio dela, as plantas industriais podem se tornar mais rentáveis financeiramente. Essa conversão é normalmente feita por duas vias: catalítica e biológica. Na rota catalítica, o glicerol residual pode sofrer oxirredução, produzindo componentes de três carbonos, ou reagir com outros compostos, para a obtenção de novas espécies químicas. Já na rota biológica, como já apresentado, o glicerol pode ser usado como fonte de carbono e energia por micro-organismos, como bactérias e leveduras, que sob condições aeróbias ou anaeróbias, realizam reações metabólicas, levando à formação de diversas biomoléculas, como o etanol, metano, hidrogênio,

algumas proteínas e novas células, além dos compostos considerados biocombustíveis, como o 2,3-BDO (JOHNSON e TACONI, 2007).

A Figura 5 ilustra alguns derivados químicos do glicerol, considerado um “produto químico de plataforma”, por poder ser convertido em diferentes produtos. Há, ainda, os processos que lhes deram origem e suas principais aplicações industriais.

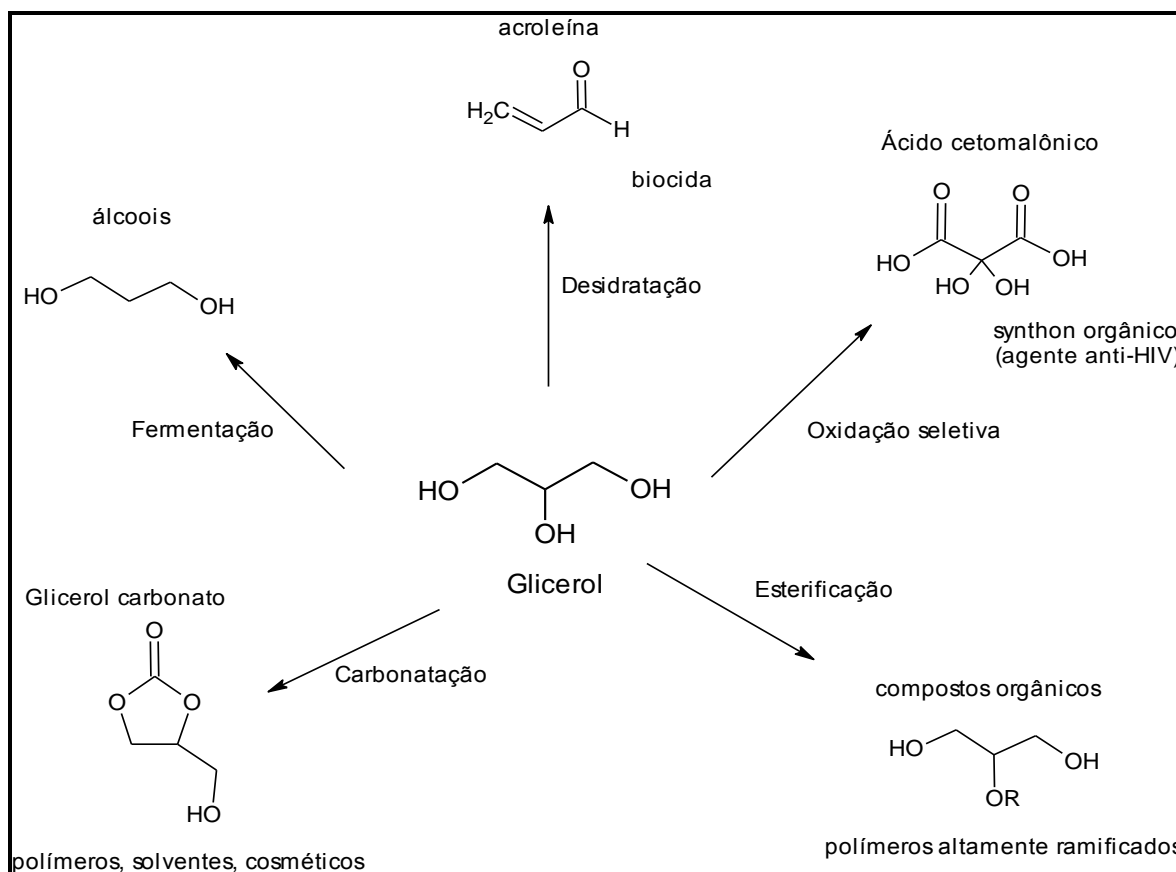


Figura 5: Glicerol como precursor de diferentes produtos químicos de aplicação industrial. (Desenho próprio baseado em PAGLIARO *et al.*, 2007)

Diante do exposto, é notório que a conversão do glicerol residual em produtos de valor agregado representa uma oportunidade de mercado, capaz de integrar processos, mediante o desenvolvimento das chamadas biorrefinarias, ao mesmo tempo em que permite o estabelecimento da cultura de sustentabilidade industrial, tão almejada nos dias de hoje. Seu aproveitamento é, portanto, uma ação necessária e desejável dentro do contexto de produção de biomoléculas, com destaque ao 2,3-BDO.

2.1.4.3. Condução do cultivo: modo de operação

A produção de 2,3-BDO pode ser realizada a partir de diferentes configurações de cultivo, as quais são responsáveis por garantir a eficiência da fermentação, o que permite, como consequência, que um *design* ótimo do processo seja estabelecido. Dentre as configurações adotadas em trabalhos prévios e a nível industrial, há relatos de todos os modos de operação: batelada; batelada alimentada; cultivo contínuo; e variantes dos modos anteriores, com reciclo celular ou com imobilização de células (JI *et al.*, 2011).

A condução em batelada é caracterizada por uma operação descontínua, em que um meio rico em nutrientes e fonte de carbono e energia é fermentado pela ação de micro-organismos, sem haver adição ou descarga de material ao longo do processo (AMORIN, 2005). Quando essas fontes nutricionais acabam, o produto final da fermentação, neste caso o 2,3-BDO, deixa de ser produzido. A fim de buscar um aumento de produtividade, o uso de maiores cargas de substrato pode ser realizado. No entanto, em razão de possíveis inibições causadas pelo excesso da fonte de carbono sobre a atividade microbiana, essa ação acaba limitada (JI *et al.*, 2011). Apesar dessas desvantagens, o modo de operação batelada ainda é usado em muitos processos industriais, devido ao baixo risco de contaminação, ao baixo custo operacional e à garantia de manutenção da estabilidade genética do micro-organismo utilizado (AMORIN, 2005).

A batelada alimentada, por sua vez, é caracterizada por uma condução semi-contínua, na qual o substrato e demais nutrientes são adicionados ao meio de cultivo ao longo da fermentação, com retirada de material ao final do processo. Essa adição periódica de nutrientes faz com que os problemas de inibição pelo substrato sejam minimizados, garantindo uma maior produtividade operacional (FERREIRA, 2008). Além disso, a concentração final de produto (2,3-BDO) tende a ser maior (RAMACHANDRAN *et al.*, 1990), uma vez que o tempo de fermentação é estendido, quando comparado à batelada. Estratégias de alimentação em sistemas de batelada alimentada têm sido investigadas por diferentes pesquisadores, com destaque a Ma *et al.* (2009) e Zhang *et al.* (2010b).

Já a condução contínua se caracteriza pela entrada e saída de material sem interrupções ao longo da fermentação, a uma vazão pré-definida, que permite uma constância no volume do meio de cultivo (FACCIOTTI, 2001). Essa configuração favorece uma elevada produtividade de 2,3-BDO, o que reflete em uma maior viabilidade econômica e operacional do processo (JI *et al.*, 2011). A maior produtividade pode ser justificada pelo fato de o sistema ser mantido em regime estacionário (*steady state*), cujas propriedades do sistema são invariáveis no tempo e em cada ponto do reator (MENEZES, 1980). A região estacionária é antecedida pela desaceleração do crescimento microbiano, momento em que muitos metabólitos são formados (BROCK, 1994). Apesar das vantagens, o sistema contínuo requer um controle mais sofisticado do processo e da estabilidade do micro-organismo, para que ele não sofra modificações ao longo do tempo de cultivo (ATALA *et al.*, 2000).

Diante das limitações encontradas em cada um dos modos tradicionais de operação, modificações foram propostas nos sistemas, como por exemplo, a adição de reciclo de células e o uso de células imobilizadas. Na primeira configuração, um dispositivo de separação (unidade de centrifugação ou sedimentação) é necessário para isolar as células do meio de cultivo, de modo que possam ser reintroduzidas no sistema (JI *et al.*, 2011). Já na segunda configuração, as células microbianas são confinadas em uma determinada região, normalmente sobre suportes sólidos, onde suas atividades metabólicas são mantidas, o que possibilita sua reutilização futura (COVIZZI *et al.*, 2007). Em ambos os casos, um aumento da produtividade pode ser observada. Além disso, no caso da imobilização celular, a recuperação do 2,3-BDO na etapa *downstream* é melhorada, bem como a manutenção dos equipamentos, uma vez que não são verificados problemas de adesão e obstrução aos eletrodos e tubos (COVIZZI *et al.*, 2007).

Portanto, o modo de operação do processo de cultivo influencia diretamente na produção de 2,3-BDO, desde sua obtenção até sua recuperação, que, por sua vez, só é economicamente viável se a concentração de 2,3-BDO for de pelo menos 80,0 g.L⁻¹, segundo Magee e Kosaric (1987). Dessa maneira, a escolha do melhor modo de operação é crucial para o sucesso econômico e operacional da produção de 2,3-BDO.

A Tabela 4 apresenta um resumo dos principais trabalhos encontrados na literatura sobre a produção de 2,3-BDO, com destaque ao modo de operação e o substrato usados em cada investigação.

Tabela 4: Modo operacional da fermentação e substrato usados na produção de 2,3-BDO, para as principais bactérias produtoras.

Espécie/Linhagem	Substrato	Modo de operação	Referência Bibliográfica
<i>Enterobacter cloacae</i> NRRL B-23289	Arabinose e fibra de milho	Batelada (frascos agitados)	SAHA e BOTHAST (1999)
<i>E. aerogenes</i> FMCC-10	Glicerol residual	Batelada (frascos agitados)	METSOVITI <i>et al.</i> (2012a)
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC-197	Glicerol residual	Batelada (frascos agitados)	METSOVITI <i>et al.</i> (2012b)
<i>Serratia</i> sp.	Celulose da palha de arroz	Batelada (frascos agitados)	HUANG <i>et al.</i> (2013)
<i>Klebsiella</i> sp. 1	Hemicelulose da palha de arroz	Batelada (frascos agitados)	HUANG <i>et al.</i> (2013)
<i>K. pneumonia</i> G31	Glicerol puro	Batelada alimentada (biorreator)	PETROV e PETROVA (2010)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DMS 365	Sacarose pura	Batelada alimentada (biorreator)	HÄBLER <i>et al.</i> (2012)
<i>P. polymyxa</i> CJX518	Glicose pura	Batelada e batelada alimentada (biorreator)	DAI <i>et al.</i> (2014)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Glicerol residual + sacarose (melaço)	Batelada alimentada (biorreator)	YANG <i>et al.</i> (2016)
<i>P. polymyxa</i> DMS 365	Glicose pura	Batelada alimentada (biorreator)	OKONKWO <i>et al.</i> (2017)

2.1.4.3.1. Batelada alimentada: estratégias de alimentação

A batelada alimentada é considerada uma estratégia eficiente de condução para processos fermentativos, uma vez que permite uma alta produtividade, ao mesmo tempo em que a inibição celular causada pela presença de altas concentrações de substrato no meio de cultivo é minimizada ou eliminada (BROCK, 1994). Por esse motivo, seu uso em escala industrial tem crescido e, como consequência, diferentes estratégias de alimentação têm sido desenvolvidas, com o intuito de melhorar ainda mais a produção de um determinado metabólito de interesse.

A batelada alimentada pode ser realizada por meio das seguintes estratégias: alimentação constante do substrato; alimentação em pulsos; alimentação crescente; e alimentação polinomial (SRIVASTAVA, 2011):

-Alimentação constante do substrato: consiste na adição de substrato ao processo fermentativo em uma concentração selecionada e a uma vazão constante ao longo do tempo. Esse tipo de configuração pode ser realizado sem a necessidade de um controle computacional externo, sendo capaz de melhorar o rendimento e a produtividade da fermentação, uma vez que os nutrientes são adicionados na fase exponencial do crescimento celular, quando as células apresentam uma atividade metabólica máxima. Um modelo matemático pode ser utilizado para prever o tempo de início e parada da alimentação. A principal vantagem desse método é o consumo quase completo do substrato ao final do cultivo.

-Alimentação em pulsos: consiste na adição de substrato ao meio de cultivo no momento em que ele se torna limitante ao processo. Um modelo matemático pode ser utilizado para prever o tempo em que o substrato deve ser adicionado ao processo, a uma concentração e uma taxa pré-definidas. Essa alimentação é considerada cíclica, uma vez que pode ocorrer várias vezes até que o limite volumétrico operacional seja alcançado. A melhor combinação entre tempo, concentração e taxa de alimentação pode ser realizada matematicamente, a fim de se otimizar a produção, garantindo, por consequência, uma alta produtividade.

-Alimentação crescente: consiste no aumento linear ou exponencial da alimentação em um momento pré-definido da fermentação. Normalmente, esse tipo de

configuração visa igualar as taxas de alimentação e consumo de substrato, de modo a garantir uma condição não-inibitória dos nutrientes.

-Alimentação polinomial: nesta configuração, um perfil polinomial de alimentação é concebido com base na regressão não-linear das variáveis fermentativas do sistema e na determinação do tempo de alimentação, de modo que os coeficientes desse perfil sejam obtidos. Junto a um modelo simulado do processo, o perfil polinomial é usado para determinar a concentração máxima do produto de interesse, conseguida, experimentalmente, no momento em que o volume do meio de cultivo alcança seu limite operacional. Por meio dessa máxima concentração de produto, a fermentação pode ser otimizada e, conseqüentemente, uma alta produtividade e um alto rendimento conseguidos.

2.1.5. Processo *downstream*

A etapa *downstream* do processo produtivo em escala industrial é considerada a mais custosa de todas as etapas, tanto no aspecto operacional, quanto no econômico. Por essa razão, uma especial atenção deve ser dada à recuperação do produto, sobretudo, quando se trabalha com processos biotecnológicos. Nesse tipo de processo, o material de partida consiste, muitas vezes, em uma mistura complexa de nutrientes, que, ao serem assimilados pelo micro-organismo, resultam em produtos cujas propriedades físico-químicas podem dificultar sua recuperação (JI *et al.*, 2011).

No caso do 2,3-BDO, seu elevado ponto de ebulição, em torno de 180°C, e sua grande afinidade com a água, associados à existência de particulados no meio fermentado, fazem com que sua recuperação seja especialmente difícil (JI *et al.*, 2011). Mesmo assim, alguns métodos têm sido investigados ao longo do tempo, incluindo alguns em escala piloto. Os principais exemplos são: a destilação a vácuo com membrana - piloto; a extração com solvente - laboratorial e a técnica de *salting-out* – laboratorial (GARCIA, 2006); além da osmose reversa (XIU e ZENG, 2008) – piloto.

A recuperação com auxílio de membranas se baseia no uso de membranas hidrofóbicas microporosas, por exemplo constituídas de politetrafluoretileno, que, sob um gradiente de temperatura, permite a passagem de vapor d'água, retendo o 2,3-BDO.

Já a metodologia de *solting-out* é caracterizada pelo uso de um sal solúvel em água e insolúvel em 2,3-BDO, como é o caso do carbonato de potássio. Após a dissolução do sal, sob aquecimento em torno de 40°C, há a formação de duas fases: a superior, contendo o diol; e a inferior, contendo a água e o sal. Dessa maneira, a recuperação do álcool é viabilizada (GARCIA, 2006).

Apesar de eficientes, essas metodologias ainda são pouco aplicadas em grande escala, sobretudo em razão da alta demanda de energia que apresentam. No entanto, nos últimos anos, melhorias nos métodos de recuperação foram realizadas, o que tem contribuído para um aumento das eficiências energética e operacional desses processos em larga escala. As mais recentes metodologias de recuperação investigadas são: a extração aquosa em duas fases (LI *et al.*, 2010); a recuperação *in situ* (ANVARI *et al.*, 2009); e a extração com solvente integrada à pervaporação (SHAO e KUMAR, 2009).

2.1.6. Economia e Mercado

A produção de 2,3-BDO, especialmente destinada à obtenção de derivados químicos, tem crescido e se tornado objeto de interesse de diversas economias. Segundo previsões, é esperada, para o ano de 2018, uma produção média de 74 Kton de 2,3-BDO (RADOŠ *et al.*, 2015), o que movimentará, aproximadamente, US\$74 milhões, uma vez que esse diol é considerado um *chemical building block* (produto químico de plataforma), cujo preço mínimo de mercado é superior a 1,00 US\$/Kg (BIAŁKOWSKA, 2016). Além disso, o 2,3-BDO pode ser usado como precursor de diferentes produtos químicos (ver seção 2.1.1. *Características e Aplicações* de 2,3-BDO), como os solventes metil-etil-cetona, gama-butirolactona e 1,3-PDO, cujo mercado global movimenta, comercialmente, cerca de 32 milhões de toneladas ao ano, com um rendimento de US\$43 bilhões em vendas (KÖPKE *et al.*, 2011).

Com uma taxa de crescimento de 4 a 7% ao ano (SYU, 2001), o aumento da demanda por esse produto é justificada por duas razões principais: aplicabilidade e benefícios ambientais. Além disso, sua obtenção pode ser conseguida a partir de fontes naturais, bem como resíduos (ver seção 2.1.4.2. *Fontes alternativas de nitrogênio e carbono*), cuja utilização configura uma gestão mais racional dos recursos ambientais,

contribuindo para o estabelecimento de processos de geração de energia mais sustentáveis (CELÍŃSKA e GRAJEK, 2009).

A comercialização de 2,3-BDO produzido industrialmente via fermentativa foi recentemente anunciada no website da empresa Lanzatech (www.lanzatech.com), que utilizou linhagens de *Clostridium* e gás residual monóxido de carbono como matéria-prima, em seu processo produtivo (produção de 57KL/ano, numa relação 1:1 de 2,3-BDO e etanol). Essa implementação industrial representa o primeiro passo para a consolidação, em larga escala, da produção microbiológica de 2,3-BDO, a qual poderá, no futuro, substituir completamente a fabricação baseada na rota química, principalmente se melhorias propostas para o processo forem efetivadas, como: uso de micro-organismos altamente produtores do diol (modificados ou não geneticamente); uso de substratos de baixo custo e de fontes renováveis de energia e nutrientes; e otimização dos processos de *downstream*, usados na recuperação do composto (BIAŁKOWSKA, 2016).

Dentro desse contexto mercadológico, o 2,3-BDO tem, ainda, contribuído com o desenvolvimento dos estudos da chamada Engenharia Metabólica. Esse emergente conhecimento científico tem ajudado a compreender o comportamento cinético das enzimas envolvidas na síntese de 2,3-BDO, bem como contribuído para o estabelecimento de estratégias que permitam a formação eficiente de isômeros puros desse diol, particularmente, a forma *levo*, em detrimento das misturas até então reportadas em muitos estudos. O domínio do genoma, a partir de ferramentas de bioinformática, tem favorecido e continuará a favorecer o conhecimento do processo, contribuindo, de maneira singular, na melhoria da produção industrial futura de 2,3-BDO (BIAŁKOWSKA, 2016).

Portanto, o processo biotecnológico pode ser considerado uma tecnologia eficiente, do ponto de vista econômico e produtivo, capaz de garantir a produção industrial de 2,3-BDO, considerado um composto promissor para o desenvolvimento de uma economia de baixo custo, altamente produtiva e embasada na sustentabilidade operacional (LI *et al.*, 2010), tão almejada nos dias de hoje.

2.1.7. Monitoramento Tecnológico

2.1.7.1. Importância das patentes

Dentro do contexto mercadológico no qual o 2,3-BDO se insere, a busca pelo controle de tecnologias é uma necessidade crescente por parte das organizações, sobretudo quando o objetivo delas é a manutenção de sua competitividade em ambientes considerados cada vez mais dinâmicos e globalizados. O conhecimento dos principais avanços do setor é fundamental para se estabelecer estratégias de atuação, de maneira que os interesses econômicos sejam favorecidos e os recursos viabilizados. O monitoramento dessas mudanças pode ser realizado de diferentes formas, sendo o levantamento de patentes uma opção viável e interessante (SANTOS, 2014a).

De acordo com Aguirre-Bastos e Gupta (2009), o acesso às informações sobre publicações científicas e patentes está mais fácil. Essa realidade tem contribuído para o desenvolvimento de formas inovadoras de se estudar e fazer ciência, ao mesmo tempo em que permite a identificação das lacunas existentes na relação pesquisa-indústria, o que ratifica a necessidade de se investir na formação técnica de pessoas envolvidas, direta ou indiretamente, nos processos de produção tecnológica, bem como de tornar a ciência mais aplicável ao dia-a-dia industrial. Diante disso, o mapeamento tecnológico surge como uma ferramenta estratégica necessária e fundamental para garantir e estimular o desenvolvimento científico de um país, tendo na análise de patentes sua base de monitoramento e controle (ERNST, 2003).

Diversas bases de dados podem ser utilizadas para a prospecção tecnológica. Alguns exemplos são as pertencentes às seguintes organizações: *European Patent Office – EPO (Espacenet)*, *World Intellectual Property Organization – WIPO*, *United States Patent and Trademark Office – USPTO*, Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, *Google Patents* e base de patentes de *Derwent*. Por meio delas, detalhes técnicos de patentes podem ser conseguidos e, então, aproveitados nos processos industriais. Apesar de essas serem as principais instituições que oferecem serviços e informações de natureza tecnológica, cada país possui seu próprio sistema de propriedade intelectual, no qual é possível realizar o monitoramento em estudo.

As patentes apresentam, ainda, significativa importância, devido às inovações comercializáveis que descrevem. As aplicações a elas associadas são protegidas pelo direito de invenção, o que dá respaldo aos seus criadores no contexto de ambientes competitivos de caráter tecnológico. O montante de patentes reflete a tendência das tecnologias, quanto aos seus avanços e retrocessos, ao longo do tempo, favorecendo o controle efetivo de políticas de investimento (ERNST, 2001). Por meio dessas, a sobreposição de gastos com P&D pode ser evitada e novas aplicações científico-industriais estimuladas (JOUNG e KIM, 2017).

Portanto, as patentes representam um importante objeto científico, capaz de fornecer informações de natureza tecnológica relevantes ao ambiente industrial e mercadológico de grandes companhias, em especial, das que trabalham com bioprocessos. O levantamento de patentes relacionados ao 2,3-BDO deve ser, dessa maneira, realizado, a fim de se promover e desenvolver essa indústria.

2.1.7.2. Metodologia de prospecção de patentes

O levantamento de patentes pode ser realizado com o auxílio de diferentes técnicas de captação de informações. Alguns exemplos são: mineração de texto, redução de dados, agrupamentos de palavras-chave e análise de rede (JOUNG e KIM, 2017). Dessas, o agrupamento é considerado uma das técnicas mais eficientes, cujas etapas foram esquematicamente representadas na Figura 6.

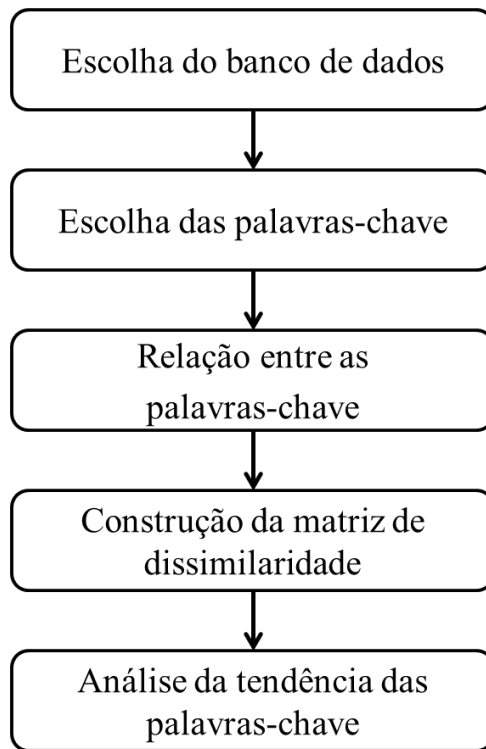


Figura 6: Esquema do método de agrupamento de patentes usado na prospecção tecnológica.

Fonte: baseado em Joung e Kim, 2017.

A Figura 6 apresenta as etapas do processo de agrupamento, usado na prospecção tecnológica de patentes. De acordo com Joung e Kim (2017), inicialmente é **escolhido o banco de dados** que servirá de base para a busca de informações durante todo o processo em estudo. Muitos desses bancos estão disponíveis aos usuários em suas versões livres, sendo facilmente acessados por meio da rede mundial de computadores (internet). No entanto, é possível utilizar *softwares* de busca, cujos bancos de informações estão acoplados aos seus sistemas. Posteriormente, é realizada a **escolha das palavras-chave** que serão utilizadas nas buscas. De acordo com Noh *et al.* (2015), a seleção das palavras-chave é a etapa mais importante do processo, sendo baseada no conhecimento de quem realiza a busca. A decisão das melhores palavras técnicas é conseguida mediante análise prévia de documentos científicos, de modo que a especificidade dos resultados a serem obtidos seja garantida. Muitos conhecedores do processo utilizam algoritmos para auxiliar na seleção das palavras e das relações entre elas, porém nem sempre essas ferramentas são suficientemente úteis (JOUNG e KIM,

2015). Depois de escolhidas as palavras-chave, é preciso **estabelecer a melhor relação** entre elas. Normalmente, são utilizados os termos “and”, “or” e “not”, de maneira que a busca se torne ainda mais refinada e específica. A etapa seguinte é a **construção da matriz de dissimilaridade**. Ela é usada para medir a semelhança semântica existente entre duas patentes, em termos de seus dados, especificamente, de suas palavras-chave (MOEHRLE, 2010). Por meio dela, é possível selecionar por tamanho e características os dados que melhor se adequam aos objetivos da busca. Por fim, a **análise da tendência das palavras-chave** é realizada. Esse procedimento é responsável por identificar tecnologias emergentes inovadoras com potencial de aplicação, a partir do agrupamento de patentes com similaridade semântica. Esses agrupamentos são denominados de *clusters*. Cada *cluster* contém um conjunto de palavras-chaves, que podem ou não corresponder às tecnologias emergentes, encontradas nas patentes. O exame sequencial desses termos é então realizado, de modo que sejam selecionadas as produções técnicas de maior potencial em se tratando de tecnologias emergentes, havendo rejeição das menos pertinentes aos objetivos da prospecção em questão.

Alguns *softwares* implementam, automaticamente, muitas dessas etapas. Essa ação está acoplada à escolha da melhor relação entre os termos técnicos, bem como dos critérios de similaridade, que são usados na seleção das patentes. Exemplos desses sistemas são o *AlchemyTM* e o *Orbit*. Este último necessita apenas das entradas das palavras-chave e das relações que se esperam avaliar. As etapas 4 e 5 são implementadas pelo próprio programa.

A fim de tornar mais eficiente cada uma das etapas anteriormente apresentadas, algumas estratégias podem ser realizadas, de maneira a viabilizar a seleção de patentes mais adequadas a um determinado estudo. A Tabela 5 apresenta um resumo dos principais trabalhos encontrados na Literatura, envolvendo diferentes mecanismos de ação, cujo objetivo foi a otimização do processo de mapeamento tecnológico.

Tabela 5: Estratégias de melhoria usadas no levantamento de patentes em trabalhos encontrados na literatura.

Estratégia de melhoria	Referência Bibliográfica
Uso de algoritmo <i>k-Means</i> , aplicado nas matrizes de palavras-chave das patentes, para a seleção de fluxos tecnológicos e padrões emergentes.	KIM <i>et al.</i> (2008)
Uso de redes baseadas nas relações SAO (sujeito-ação-objeto) para a identificação das tendências tecnológicas.	CHOI <i>et al.</i> (2011)
Uso de uma abordagem baseada em análise de conceito formal, aplicada nas matrizes de palavras-chave das patentes, para a seleção de fluxos tecnológicos e padrões emergentes.	LEE <i>et al.</i> (2011)
Uso de uma técnica de detecção de novidades, aplicada nas matrizes de palavras-chave das patentes, para a seleção de fluxos tecnológicos e padrões emergentes.	GEUM <i>et al.</i> (2013)
Uso de roteiros de tecnologia baseados nas relações SAO (sujeito-ação-objeto) para a compreensão das tendências de desenvolvimento tecnológicas.	WANG <i>et al.</i> (2015)
Uso de algoritmos avançados para a seleção das palavras-chave, aplicando uma função denominada <i>TF-IDF</i> (<i>term frequency - inverse document frequency</i>), que avalia e distingue os termos técnicos cruciais, e para a quantificação das relações entre pares de palavras-chave.	JOUNG e KIM (2017)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar a utilização de fontes alternativas de carbono e energia por *Paenibacillus polymyxa* PM 3605 (bactéria não-patogênica), com destaque ao glicerol e ao melaço residuais (funcionando como substrato e co-substrato, respectivamente), para a produção eficiente de (2R,3R)-butanodiol, em frascos agitados.

3.2. Objetivos Específicos

Para que o objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

-Estabelecer a concentração inicial de inóculo que fosse capaz de metabolizar eficientemente o substrato e os demais nutrientes presentes no meio de cultivo, visando à produção de 2,3-BDO;

-Selecionar um meio de cultivo que fosse composto por fontes de carbono e de nitrogênio de interesse econômico e ambiental, com destaque ao glicerol residual e ao extrato de levedura do LaBiM, com potencial para proporcionar bons rendimentos e boa produção de 2,3-BDO;

-Verificar a capacidade produtiva de dois tipos distintos de glicerol residual (glicerina loira com e sem sebo), selecionando a opção que reportasse um melhor rendimento de 2,3-BDO e uma melhor assimilação por parte do micro-organismo;

-Estabelecer a concentração inicial de glicerol residual que garantisse um máximo rendimento de 2,3-BDO (em frascos agitados - modo batelada);

-Investigar os efeitos da suplementação nutricional por melaço de cana-de-açúcar funcionando como co-substrato, e selecionar a condição que permitisse

melhorias no processo, especialmente, em relação à assimilação do substrato principal e à produção de 2,3-BDO;

-Produzir o *levo*-isômero de 2,3-BDO em detrimento das demais formas enantioméricas (alta seletividade de produção) e de ácidos orgânicos que poderiam ser juntamente sintetizados com esse isômero;

- E realizar o monitoramento de patentes para investigar a maturidade e o potencial tecnológico de obtenção de 2,3 BDO por via microbiana, usando glicerol e *P. polymyxa*.

Com base nos resultados encontrados em frascos agitados, objetivou-se por fim:

-Realizar testes preliminares em biorreator de bancada para verificar a produção de 2,3-BDO, considerando os efeitos advindos da aeração e da agitação adotadas, sobretudo relacionados à disponibilidade de oxigênio no meio;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

A bactéria *Paenibacillus polymyxa* PM 3605, previamente isolada da rizosfera de milho (genótipo CSM36), plantado em solo de cerrado (EMBRAPA-CNPMS, Sete Lagoas, MG), foi usada para a produção de 2,3-BDO. Essa estirpe foi gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Lucy Seldin, do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sendo mantida em estoque a -80°C , em meio TSB (17 g.L^{-1} de caseína; $3,0\text{ g.L}^{-1}$ de peptona de soja; $5,0\text{ g.L}^{-1}$ de NaCl; $2,5\text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 e $2,5\text{ g.L}^{-1}$ de glicose), contendo 30 % (v/v) de glicerol estéril.

A Figura 7 ilustra as células de *P. polymyxa* PM 3605 usadas neste estudo.



Figura 7: Imagem microscópica das células de *P. polymyxa* PM 3605, após incubação em frascos agitados por 16h, 37°C e 200 rpm, em meio contendo glicose como substrato. As células representadas foram observadas em lâminas a fresco, com um aumento de 40x (sem inserção em óleo) em microscópio de luz.

4.2. Meios de cultivo

4.2.1. Ativação e manutenção da cultura

Uma alíquota de 100 μL do estoque de glicerol-TSB foi adicionada em 10,0 mL de meio líquido TSB, em frasco de *Erlenmeyer* de 50,0 mL. Após 16h de cultivo em frascos agitados, a 37°C e 200 rpm, as células foram plaqueadas por diluição em TSB-ágar 2,0 % (m/v) e, então, mantidas a 4°C, para futura utilização.

4.2.2. Pré-Inóculo

Dois pré-inóculos distintos foram utilizados neste estudo. Cada um foi destinado a um determinado ensaio fermentativo: frascos agitados e biorreator, tendo sido preparados das seguintes formas:

- Para os ensaios em frascos agitados, células da placa mantida a 4°C foram inoculadas em 120 mL de meio YPD, constituído por 10,0 g.L^{-1} de extrato de levedura, 20,0 g.L^{-1} de peptona e 20,0 g.L^{-1} de glicose, presentes em frasco de *Erlenmeyer* de 250 mL. As células foram crescidas por 16h, a 37°C e 200 rpm. Após esse período, 4,1 g.L^{-1} de biomassa, correspondente à fase exponencial do crescimento microbiano, foram obtidas. Essa concentração celular correspondeu a uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 4,5 (ver Anexo I). O processo foi, então, repetido, usando uma nova colônia da placa, de maneira a se obter uma duplicata biológica do pré-inóculo. As células produzidas não foram submetidas a nenhum processo, como centrifugação ou lavagem. O pH inicial do meio foi próximo de 7,0.

- Já para os ensaios preliminares em biorreator, novamente uma colônia da placa mantida a 4°C foi utilizada, sendo crescida em frasco agitado a 37°C e 200 rpm. Contudo, agora, ela foi inoculada em frasco de *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 100 mL de um meio proposto por Adlakha e Yazdani (2015). Esses autores realizaram um estudo de otimização (planejamento experimental *Plackett-Burman*), cujo resultado levou à seguinte composição: 15,0 g.L^{-1} de extrato de levedura (fonte de nitrogênio); 0,5

g.L^{-1} de KH_2PO_4 e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (como agentes tamponantes); $0,0225 \text{ g.L}^{-1}$ de MnSO_4 e $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de KCl (como fontes de íons Mn^{2+} e K^+ , respectivamente). A fonte de carbono utilizada foi o glicerol presente na glicerina loira com $10,0 \text{ \% (v/v)}$ de sebo, com pureza de $81,0 \text{ \% (v/v)}$. A concentração de glicerol foi de $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ (considerando sua pureza no resíduo). O cultivo foi realizado por 22h, gerando $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, correspondente à fase exponencial do crescimento microbiano, e equivalente a uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 2,5 (ver Anexo I). O processo foi realizado em duplicata biológica, sem centrifugação e lavagem das células. O pH inicial foi próximo de 6,5.

4.2.3. Meio de fermentação

Para a produção de 2,3-BDO, o meio de fermentação utilizado foi o proposto por Adlakha e Yazdani (2015), cuja composição foi anteriormente apresentada (sessão 4.2.2. *Pré-Inóculo*).

Foram investigadas diferentes fontes de carbono: glicose comercial (controle), glicerol comercial, glicerina loira sem sebo (resíduo contendo $84,0 \text{ \% (v/v)}$ de glicerol) e glicerina loira com $10,0 \text{ \% (v/v)}$ de sebo (resíduo contendo $81,0 \text{ \% (v/v)}$ de glicerol). A glicerina loira foi gentilmente cedida pelo Centro de Pesquisa da Petrobrás (CENPES), que a obteve da empresa BSBios – Energia Sustentável, localizada em Passo Fundo e Marialva, no Rio Grande do Sul, como resíduo do processo de produção de biodiesel.

Em todos os ensaios, a concentração do substrato foi de $20,0 \text{ g.L}^{-1}$. Essa concentração foi escolhida com o intuito de encurtar o tempo de cultivo, a fim de se estabelecer a cinética do processo com maior rapidez e facilidade.

A fonte de nitrogênio investigada foi o extrato de levedura, de dois tipos distintos: um comercial e outro *home made*. O extrato não-comercial foi produzido pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM), sendo por isso denominado extrato de levedura LaBiM. De acordo com sua caracterização prévia, esse extrato apresentava composição nutricional semelhante ao extrato comercial, porém sua produção, por ser *home made*, é considerada mais barata. Sendo assim, o extrato de levedura LaBiM foi usado para a economia do processo, visando a um escalonamento futuro da produção de 2,3-BDO.

Além desses compostos, melação residual da indústria de açúcar e álcool foi utilizado. O objetivo foi investigar a influência de outras fontes de carbono junto à assimilação do substrato principal, por parte das células microbianas, de maneira a verificar o efeito de sua presença sobre o metabolismo de 2,3-BDO, em termos de rendimento, produção e produtividade. O melação usado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Centro de Pesquisa da Petrobrás (CENPES), que o obteve da Usina Cruz Alta da Guarani - Tereos Açúcar & Energia Brasil, localizada na Zona Rural de Olímpia, São Paulo, como resíduo sucro-alcooleiro.

Como as composições dos extratos e das fontes de carbono eram semelhantes, a relação carbono/nitrogênio (C/N=8,5) foi mantida sem a necessidade de correções. Além disso, o grau de pureza de glicerol nos resíduos de glicerina loira foi levado em consideração durante o preparo dos meios.

4.3. Condições operacionais das fermentações

Os parâmetros fermentativos pH, temperatura, agitação e aeração foram definidos com base nos resultados encontrados por Adlakha e Yazdani (2015), para uma linhagem de *P. polymyxa*. Além desse trabalho, outros estudos, como os de Häbler *et al.* (2012), e Okonkwo *et al.* (2017), foram usados para justificar os seguintes valores adotados: pH de 6,3 (biorreator); temperatura de 37°C (frascos agitados e biorreator); agitação de 200 rpm (frascos agitados) e 500 rpm (inicial – biorreator); e aeração de 0,5 vvm.

Embora esses parâmetros sejam específicos de cada linhagem celular, assim como do tipo de substrato utilizado na fermentação (KOUTINAS *et al.*, 2014), conforme já apresentado na Fundamentação Teórica deste trabalho, as diferentes linhagens de *P. polymyxa* utilizadas pelos autores supracitados apresentaram um comportamento de assimilação de substrato e produção de 2,3-BDO similar nas condições investigadas, não havendo, portanto, diferenças capazes de alterar, significativamente, os resultados das fermentações. Sendo assim, por consideração e por simplicidade experimental, as condições operacionais apresentadas foram adotadas como ideais para a bactéria *P. polymyxa* PM 3605.

4.4. Procedimento de fermentação

4.4.1. Seleção do meio de fermentação em frascos agitados

Para a seleção do meio de cultivo, em relação às fontes de carbono e de nitrogênio, diferentes fermentações foram realizadas utilizando substratos e nutrientes comerciais e residuais, em frascos agitados. Os parâmetros fermentativos de produção, rendimento e produtividade de 2,3-BDO foram usados como base para a escolha das melhores fontes.

Inicialmente, um controle foi realizado com glicose e extrato de levedura comerciais, compostos convencionalmente utilizados na produção de 2,3-BDO via rota biotecnológica. O objetivo desse controle foi fornecer informações sobre o comportamento cinético de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605, bem como o de produção de 2,3-BDO, a fim de servir de base de comparação para as demais fontes nutricionais.

Em seguida, as fontes de carbono e de nitrogênio foram substituídas, sendo realizados três ensaios: 1) usando extrato de levedura do LaBiM; 2) usando glicerol comercial; 3) usando extrato de levedura do LaBiM e glicerol comercial. Todos as fermentações, incluindo o controle, foram conduzidas em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, tendo o mesmo pré-inóculo de 16h, em duplicata biológica. A DO_{600nm} inicial foi padronizada em aproximadamente 0,5, correspondendo a $0,44 \text{ g.L}^{-1}$ de células (ver Anexo I). Esses experimentos foram conduzidos por um período de tempo que variou de 30h a 75h, de acordo com a fonte de carbono investigada (tempo para o máximo consumo do substrato), em frascos de *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 150 mL de meio de cultivo. Essa proporção volumétrica favoreceu um ambiente de microaerobiose, condição necessária à produção metabólica de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, ao mesmo tempo em que permitiu a coleta de amostras em uma quantidade suficiente para a construção das curvas cinéticas do processo. A curva de crescimento microbiano foi construída a partir do acompanhamento da DO_{600nm} ao longo do tempo.

Depois de se conhecer a cinética de produção de 2,3-BDO em glicerol comercial, a cinética em glicerol residual foi investigada. Para isso, a glicerina loira com

e sem 10,0 % (v/v) de sebo foi utilizada. Dois ensaios, em duplicata biológica, foram realizados nas mesmas condições e configurações das fermentações anteriores. A glicerina loira com 10,0 % (v/v) de sebo foi selecionada como fonte de carbono.

Então, um teste de concentração inicial de glicerol foi realizado, usando glicerina loira com 10,0 % (v/v) de sebo. Os ensaios foram realizados da mesma forma que os anteriormente citados. Os seguintes teores iniciais de substrato foram investigados: 50,0; 70,0; e 85,0 g.L⁻¹. Esse estudo foi feito para se determinar a concentração limite de glicerol, a partir da qual a fermentação sofreria os efeitos da inibição celular, resultante do excesso da fonte de carbono no meio.

Por fim, um estudo da influência do co-substrato sobre a cinética de produção de 2,3-BDO foi realizado. Para tanto, três concentrações de melação residual foram investigadas, considerando o melhor teor de glicerol, obtido do teste de concentração inicial anteriormente apresentado. Os ensaios envolveram: 5,0; 10,0; e 20,0 g.L⁻¹ de melação, tendo sido conduzidos em duplicata biológica, da mesma forma que os demais ensaios supracitados.

4.4.2. Biorreator

Depois de selecionadas as fontes de carbono e de nitrogênio, as fermentações foram conduzidas em biorreator de 2,0 L da marca New Brunswick (modelo BIOFLO[®] & CELLIGEN[®] 310), com um volume de trabalho inicial de 1,0 L. Esse biorreator é caracterizado por apresentar uma geometria do tipo fluxo radial, em que o líquido é dirigido à parede do reator ao longo do raio do tanque. Ele continha sensores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e anti-espumante, além de um sistema de bombas, responsável pela entrada de ácido, base, meio (em conduções alimentadas) e anti-espumante, sempre que necessário. Logo, esse equipamento permitia um grande controle operacional do processo.

Em relação às condições de cultivo, o pH e a temperatura foram mantidos em torno de 6,3 e 37°C, respectivamente (ADLAKHA e YAZDANI, 2015). O pH foi controlado automaticamente pela adição de ácido sulfúrico 5,0M e/ou de hidróxido de sódio 6,0M. A aeração e a agitação iniciais foram de 0,2 vvm e 500 rpm (HÄBLER *et*

al., 2012), respectivamente, embora tenha sido necessária uma mudança de estratégia, a fim de garantir a condição de microaerobiose, necessária à produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605.

A Figura 8 ilustra o biorreator usado neste experimento.



Figura 8: Batelada convencional, conduzida no biorreator da BIOFLO® & CELLIGEN® 310, para a produção de 2,3-BDO.

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Concentração celular

A concentração celular (C_x) foi determinada por meio de medidas de absorvância (em comprimento de onda de 600nm) em espectrofotômetro de luz UV (Biospectro SP-22), que foram correlacionadas à biomassa celular por meio de curvas de peso seco (ver Anexo I). Uma curva foi construída para o pré-inóculo crescido em glicose e outra para o pré-inóculo crescido em glicerol (biorreator).

4.5.2. Quantificação de biomoléculas

Para a quantificação dos produtos gerados na fermentação de 2,3-BDO, foram realizadas as seguintes operações:

-Inicialmente, as células foram separadas do meio de cultivo por centrifugação (10000g / 10 min) à temperatura ambiente, em centrífuga de microtubo (MiniSpin® - Eppendorff). O sobrenadante, rico em substrato e nos produtos da fermentação, foi diluído dez vezes com água Milli-Q e filtrado em membrana de 0,22 μm (2202213 100CW - Analítica).

-Em seguida, as concentrações de substrato (glicose e glicerol) e dos produtos da fermentação (2,3-BDO – *levo* e *meso* isômeros; etanol; acetoína; ácidos lático, succínico e acético) foram, então, analisados usando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC (*Agilent Technologies*), equipado com coluna HPX-87H (*BioRad* – 300 mm x 7,8 mm). Uma solução 0,01 M de ácido sulfúrico foi usado como eluente, a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹ a 45°C. O volume de amostra injetado foi de 20,0 μL . Os padrões utilizados na análise apresentaram curvas de calibração com coeficiente de correlação (R^2) superiores a 0,99, sendo aplicados na determinação do tempo de retenção de cada produto.

4.5.3. Reprodutibilidade experimental

Os experimentos foram realizados em duplicata biológica, como já mencionado anteriormente. Optou-se por esse tipo de réplica, pelo fato de ela garantir independência experimental e reprodutibilidade de resultados futuros. Por meio da réplica, foi possível, também, determinar a média e o desvio-padrão dos resultados, a fim de se explicitar o nível de coerência dos ensaios fermentativos. Os resultados foram apresentados sob a forma de: média da duplicata \pm desvio-padrão.

4.5.4. Softwares utilizados

Para o tratamento dos dados experimentais, os seguintes *softwares* foram utilizados: *Microsoft Excel 2010* – para o cálculo dos parâmetros fermentativos do processo, da média e do desvio-padrão; e *SigmaPlot 12.0* (*Systat Software Inc.*, Califórnia/USA) para a construção dos gráficos.

O *software ChemSketch 12.01* (*ACD – Advanced Chemistry Development*), versão livre, foi utilizado como ferramenta de desenho, para a construção das rotas metabólicas e estruturas químicas apresentadas nas figuras da fundamentação teórica deste trabalho.

4.6. Parâmetros fermentativos

Os seguintes parâmetros fermentativos foram calculados a fim de se conhecer a cinética de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605: rendimento de 2,3-BDO a partir do substrato ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica (P_V) e eficiência fermentativa (E_f).

4.6.1. Rendimento ($Y_{P/S}$)

O rendimento do produto a partir do substrato ($Y_{P/S}$) foi calculado conforme a Equação 1.

$$Y_{P/S} (\text{g produto. g}^{-1} \text{ substrato}) = \frac{P-P_0}{S_0-S}$$

(Eq.1)

Em que:

P= concentração final de 2,3-BDO (g.L^{-1});

P₀= concentração inicial de 2,3-BDO (g.L^{-1});

S₀= concentração inicial de substrato (g.L^{-1});

S= concentração final de substrato (g.L^{-1}).

4.6.2. Produtividade volumétrica (P_V)

A produtividade volumétrica (P_V) do produto a partir do substrato foi calculada conforme a Equação 2.

$$P_V (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = \frac{P_{\text{máx}}}{t_{\text{MP}}}$$

(Eq.2)

Em que:

P_{máx}= máxima concentração de 2,3-BDO (g.L^{-1});

t_{MP} = tempo de cultivo de máxima produção de 2,3-BDO (h).

4.6.3. Eficiência da fermentação (E_f)

A eficiência fermentativa (E_f) indica o quanto de produto (em termos de rendimento) foi gerado em relação à quantidade teórica máxima possível, dado um determinado substrato. No caso da glicose, a quantidade de 2,3-BDO gerada corresponde a 0,5g de 2,3-BDO. g⁻¹ glicose, enquanto para o glicerol o valor é de

0,489g de 2,3-BDO. g⁻¹ de glicerol. A Equação 3 apresenta a relação matemática desse parâmetro.

$$E_f (\%) = \frac{Y_{P/S}^P}{Y_{P/S}^P \text{teórico}} \times 100\%$$

(Eq.3)

Em que:

$Y_{P/S}$ = rendimento experimental de 2,3-BDO a partir do substrato (g de 2,3-BDO. g⁻¹ de substrato);

$Y_{P/S}^{\text{teórico}}$ = rendimento estequiométrico de 2,3-BDO a partir do substrato (g de 2,3-BDO. g⁻¹ de substrato).

4.7. Monitoramento Tecnológico

O monitoramento tecnológico foi realizado com auxílio do *software Orbit*, de licença não-livre, da empresa *Questel*. Essa ferramenta abrange mais de 100 milhões de patentes e mais de 100 autoridades emissoras, possuindo cerca de 84 registros de marcas, 9 milhões de estruturas químicas indexadas e publicações científicas de 1960 até o ano em vigor. Apresenta, ainda, litígio nos Estados Unidos da América, China, Alemanha e França, seguindo padrões como ISO (*International Organization for Standardization*) e ANSI (*American National Standards Institute*).

A técnica utilizada foi a de agrupamento de palavras-chave, sendo o escopo metodológico composto pelos seguintes termos técnicos: *butanediol*, *BDO*, *BD*, *BDL*, *glycerol*, *glucose*, *polymyx*. Os termos foram correlacionados pelos conectivos *and* e *or*, sendo usados para seleção da produção científica indexada no mundo entre 1997 e 2017, cujas bases de dados correspondem às vinculadas ao *Orbit*. A coleta de informações foi baseada nos títulos, resumos e descrições das patentes, em que os documentos reportados faziam referência a tecnologias de processos e produtos protegidas e correlatas.

A interpretação dos dados foi feita de maneira individualizada a partir das patentes encontradas. As informações extraídas dos bancos de dados foram categorizadas de acordo com o país, a classificação IPC (*International Patent Classification*) e a instituição cessionária depositante. A evolução anual do depósito das patentes de interesse e das publicações científicas foi também estabelecida.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Concentração inicial de inóculo

Duas concentrações iniciais de inóculo, 3,75 %(v/v) e 10,0 %(v/v), foram investigadas com o intuito de se verificar o efeito desse parâmetro fermentativo sobre a produção de 2,3-BDO, a partir de quatro diferentes meios de cultivo, contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio, definidos como: M1 – glicose e extrato de levedura comerciais (controle ou meio base); M2 – glicose comercial e extrato de levedura LaBiM; M3 - glicerol e extrato de levedura comerciais; e M4 – glicerol comercial e extrato de levedura LaBiM. As DO_{600nm} dessas concentrações iniciais de inóculo foram medidas, sendo iguais 0,2 e 0,5, respectivamente. Uma correlação linear foi estabelecida por meio de uma curva-padrão de peso seco para células, a partir da qual as concentrações de inóculo, em termos de biomassa, foram calculadas, sendo iguais a 0,17 e 0,44 $g.L^{-1}$, respectivamente (ver Anexo I – pré-inóculo crescido em glicose).

Em diversos estudos, a concentração inicial de 10,0 %(v/v) de inóculo foi considerada suficiente para garantir a aclimatização microbiana no meio, o que favorece a geração de biomassa celular para a produção de 2,3-BDO (HÄBLER *et al.*, 2012; OKONKWO *et al.*, 2017). No entanto, o tamanho ideal de inóculo é dependente das condições e meios fermentativos, bem como do micro-organismo utilizado. Além disso, está associado à redução de custos, principalmente, em processos conduzidos em larga escala (PRIYA *et al.*, 2016). Por essas razões, a investigação da concentração inicial de inóculo mais adequada ao meio de cultivo utilizado é necessária para melhorar a taxa de formação de 2,3-BDO, garantindo, assim, melhores rendimentos do produto.

As cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e da produção de 2,3-BDO foram estabelecidas para cada concentração inicial de inóculo. As Figuras 9 a 12 ilustram os resultados encontrados para 3,75 %(v/v) – gráficos “a”, e 10,0 %(v/v) – gráficos “b”.

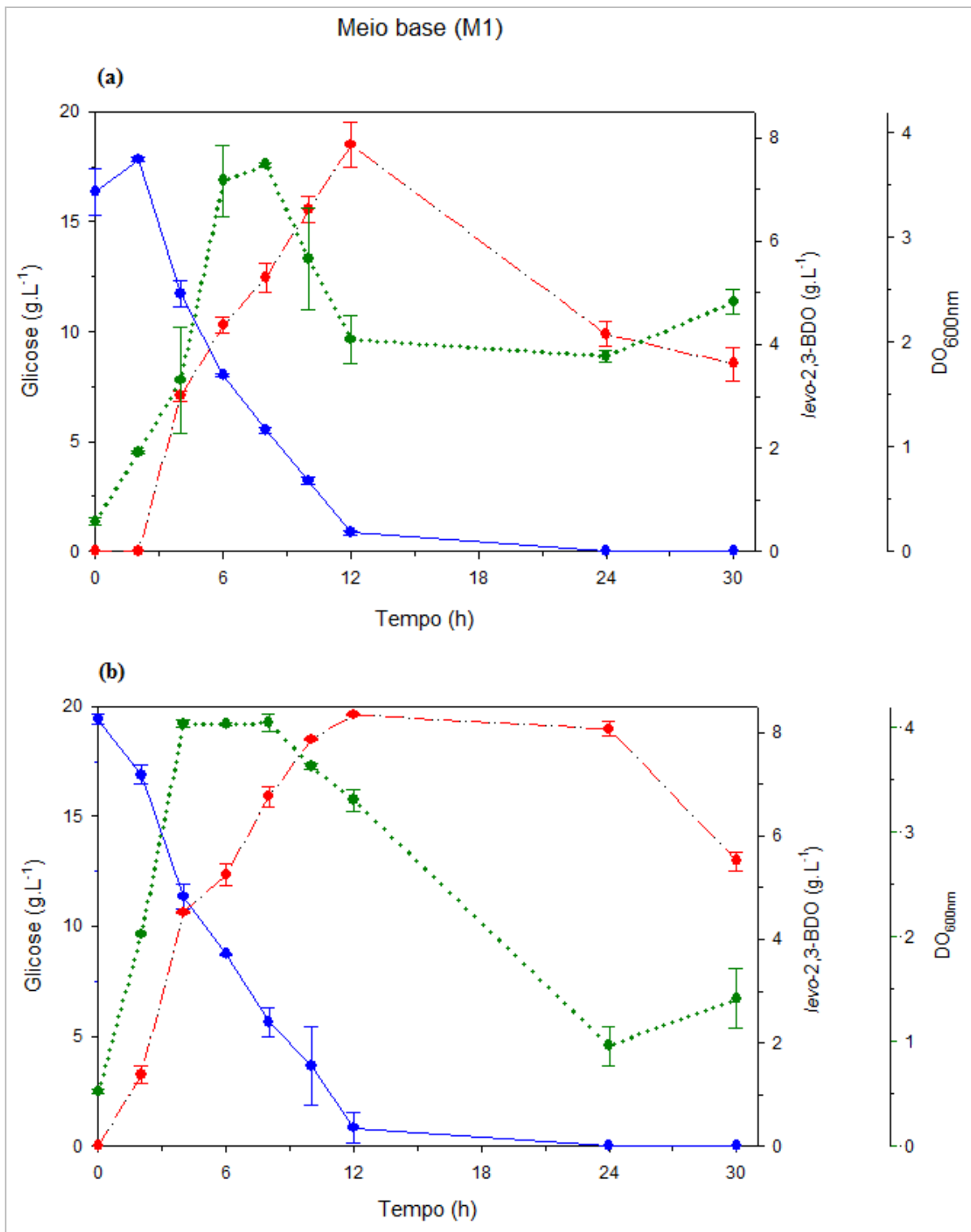


Figura 9: Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, usando glicose comercial como substrato.

Concentração inicial do inóculo: (a) 3,75 % (v/v); (b) 10,0 % (v/v).

—●— Glicose comercial; -.-●- 2,3-BDO; e -.-●- DO_{600nm}.

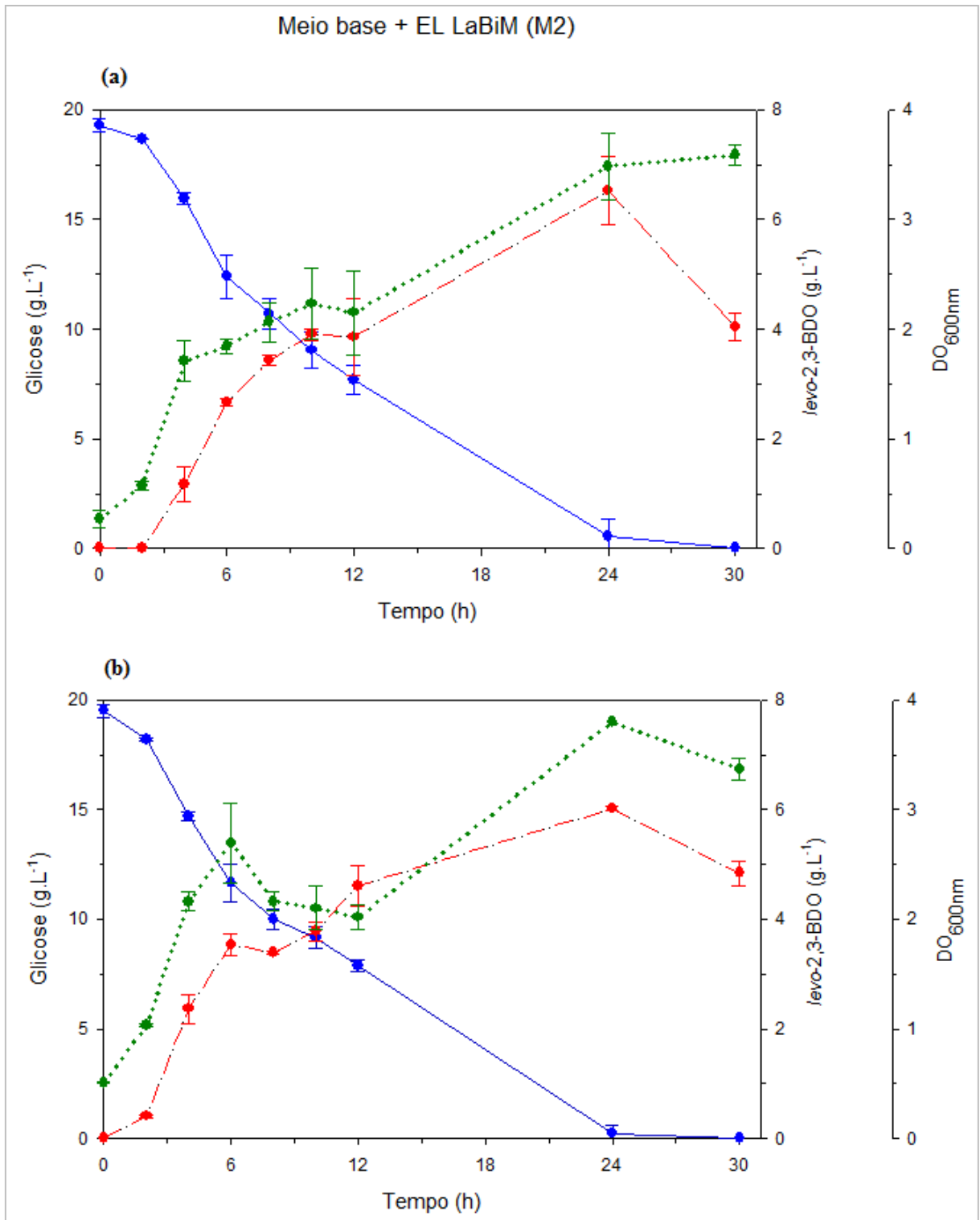


Figura 10: Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, usando glicose comercial como substrato e extrato de levedura LaBiM como fonte de nitrogênio.

Concentração inicial do inóculo: (a) 3,75 % (v/v); (b) 10,0 % (v/v).

—●— Glicose comercial; - - -●- - 2,3-BDO; e - - -●- - DO_{600nm}.

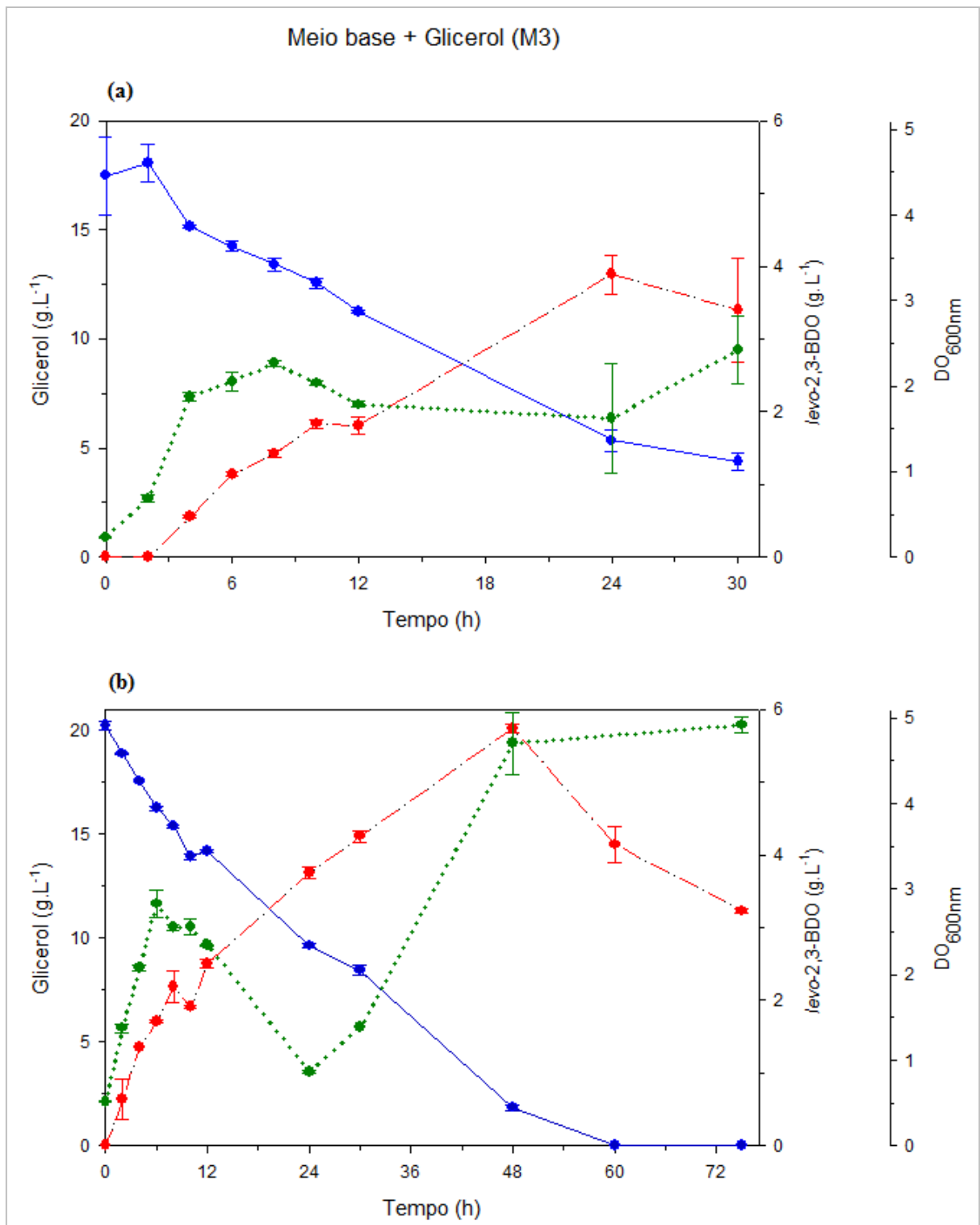


Figura 11: Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, usando glicerol comercial como substrato.

Concentração inicial do inóculo: (a) 3,75 % (v/v); (b) 10,0 % (v/v).

—●— Glicerol comercial; - -●- - 2,3-BDO; e ···●··· DO_{600nm}.

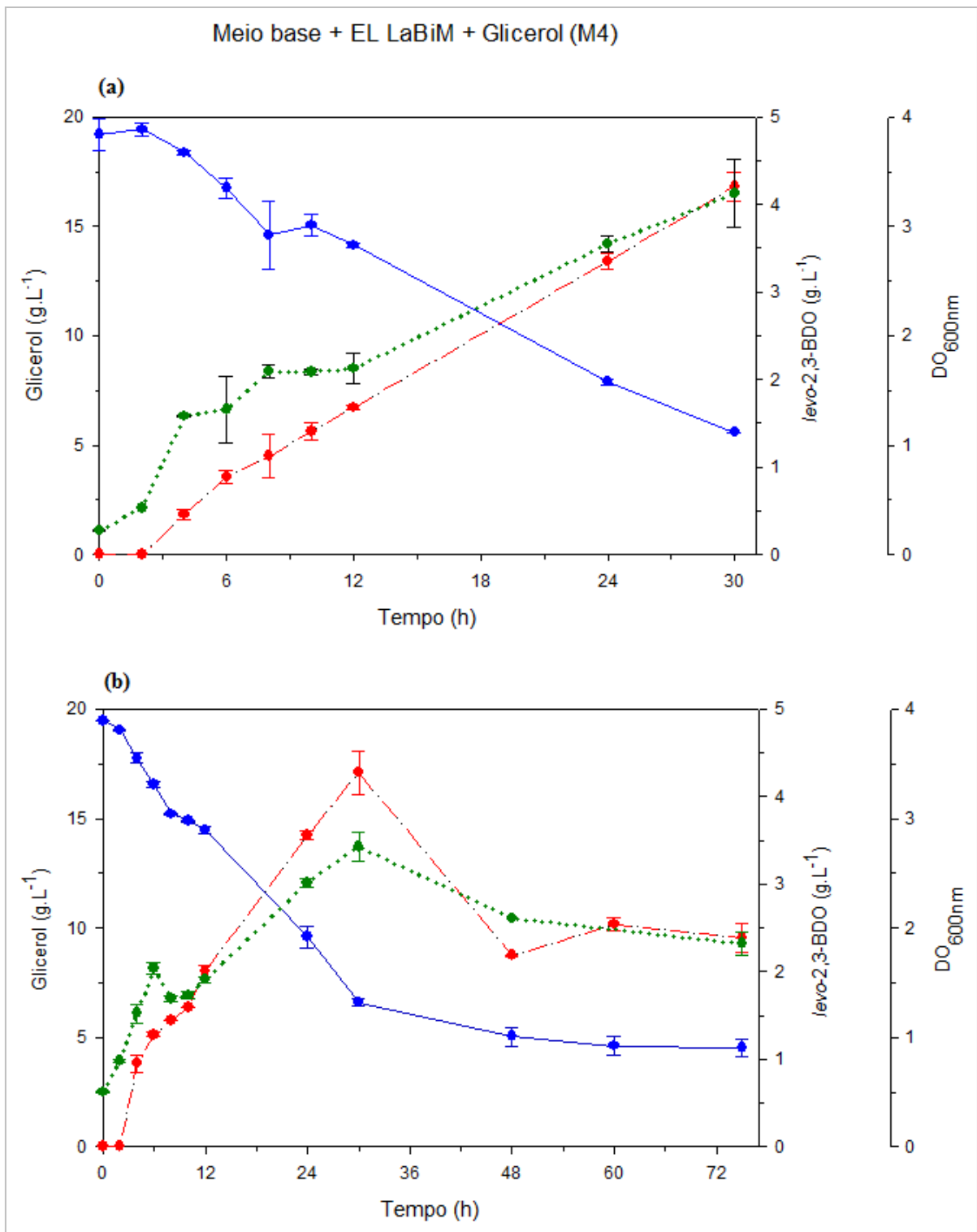


Figura 12: Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, usando extrato de levedura LaBiM e glicerol comercial como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente.

Concentração inicial do inóculo: (a) 3,75 % (v/v); (b) 10,0 % (v/v).

—●— Glicerol comercial; - - -●- - 2,3-BDO; e - - -●- - DO_{600nm}.

Inicialmente, as cinéticas foram conduzidas com 3,75 % (v/v) de inóculo por 30h (Figuras 9a a 12a). Para os meios contendo glicose (Figuras 9a e 10a), o tempo de 30h permitiu um consumo de substrato superior a 95,0%. Por outro lado, para os meios contendo glicerol como fonte de carbono (Figuras 11a e 12a), esse tempo não foi suficiente para consumir todo o substrato. Esse comportamento pode ser justificado metabolicamente pelo fato de a glicose participar diretamente da glicólise, liberando piruvato para seguir a rota de formação de 2,3-BDO. No caso do glicerol, a conversão a piruvato segue uma via diferente, que depende de enzimas distintas (ver seção 2.1.4.2.1.1. *Metabolismo microbiano do glicerol*) e, por esse motivo, as condições de pH e a disponibilidade de NADH/NAD⁺ podem tornar a conversão mais lenta.

Com exceção do meio M4, todos os demais meios apresentaram uma queda na concentração de *levo*-2,3-BDO, quando 3,75 % (v/v) de inóculo foi utilizado. No caso dos meios contendo glicose (Figuras 9a e 10a), essa queda foi acompanhada do aumento de biomassa, no momento em que o substrato havia sido quase completamente consumido. Isso sugere que na baixa disponibilidade de carbono glicosídico, a bactéria *P. polymyxa* PM 3605 pode utilizar o próprio produto diólico como fonte de carbono. No entanto, como será discutido na seção 5.2. *Seleção do meio de fermentação*, o 2,3-BDO pode sofrer isomeria, como estratégia metabólica para manutenção da atividade celular. Esse comportamento foi verificado pela presença de quantidades significativas de *meso*-2,3-BDO (dados não mostrados nas Figuras 9 a 12), além do *levo*-2,3-BDO quantificado. Ademais, nos meios contendo glicerol, apesar da presença residual do substrato, a queda de *levo*-2,3-BDO foi observada (Figura 11a), o que comprova que o produto não foi consumido pelo micro-organismo em questão, uma vez que esse consumo ocorre, normalmente, quando a fonte de carbono é totalmente assimilada do meio de cultivo.

Em relação ao crescimento microbiano, os meios contendo extrato de levedura comercial e 3,75 % (v/v) de inóculo (Figuras 9a e 11a) apresentaram um perfil semelhante entre si. O mesmo pode ser observado para os meios contendo extrato de levedura LaBiM e 3,75 % (v/v) de inóculo (Figuras 10a e 12a). É possível perceber que o extrato de levedura LaBiM permitiu um crescimento celular mais próximo do esperado (sem quedas ao longo da curva), provavelmente em razão de sua composição química, ainda que essa seja semelhante à do extrato comercial.

Para as fermentações usando 10,0 %(v/v) de inóculo, os meios contendo glicose (Figuras 9b e 10b) foram conduzidos, novamente, por 30h, tempo no qual cerca de 96,0% do substrato foi consumido. Esse resultado demonstrou que o aumento da concentração inicial de inóculo de 3,75 %(v/v) para 10,0 %(v/v) não afetou a assimilação do carbono, uma vez que anteriormente o consumo foi de 95,0%. Portanto, o aumento de inóculo pode ser considerado indiferente aos processos usando glicose como substrato, em termos de melhoria no seu consumo. Para os meios contendo glicerol (Figuras 11b e 12b), os ensaios fermentativos foram conduzidos por 75h, de maneira que o substrato pudesse ser praticamente exaurido do meio. Pela análise da Figura 11b, é possível perceber uma melhoria no consumo do glicerol, em relação ao comportamento observado na Figura 11a. Contudo, para o meio M4 (Figura 12b), o aumento do inóculo não resultou em melhoria na assimilação do substrato e, assim como para os meios M1 e M2, esse aumento pode ser novamente considerado indiferente ao processo.

Assim como para 3,75 %(v/v) de inóculo, a 10,0 %(v/v), uma queda na concentração de *levo*-2,3-BDO produzido foi observada, porém agora para todos os meios - M1 a M4. Como já mencionado anteriormente, essa queda ocorreu em função do surgimento da forma *meso* de 2,3-BDO (dados não mostrados nas Figuras 9 a 12), evidenciando o fenômeno de isomeria (ver seção 5.2. *Seleção do meio de fermentação*).

O comportamento celular também foi caracterizado por uma queda nas curvas de crescimento nos quatro meios estudados. Com exceção do meio M3 (Figura 11b), as quedas observadas foram acompanhadas pela diminuição do substrato (Figuras 9 e 10b) ou pelo aumento da dificuldade de assimilação microbiana (Figura 12b), demonstrando a existência de uma relação entre a biomassa e o consumo da fonte de carbono.

O meio M3 (Figura 11b) apresentou um comportamento atípico para o crescimento celular, provavelmente em razão da fonte de carbono utilizada. Devido à natureza reduzida do glicerol, a geração de NADH é favorecida (YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Esse composto é aproveitado na síntese de 2,3-BDO, direcionando preferencialmente o carbono para essa via metabólica em detrimento da via de geração de biomassa. Essa seria, então, uma possível explicação para a queda observada no meio M3, uma vez que apesar da diminuição da quantidade celular ter sido verificada, a formação de 2,3-BDO continuou ocorrendo ao longo das primeiras 48h. Inclusive, um

aumento de 2,3-BDO pôde ser observado entre 6h e 24h, onde a queda de biomassa foi mais acentuada. Outra explicação seria o metabolismo inerente das células de *P. polymyxa* PM 3605 em relação às fontes de carbono, com destaque ao glicerol. Possivelmente, essa linhagem de *P. polymyxa* apresenta um comportamento específico frente à uma determinada condição fermentativa, o que pode justificar, dessa forma, uma cinética de crescimento característica como a observada neste estudo.

Como apresentado anteriormente, o meio M3 (Figuras 11a e 11b), foi o único que apresentou melhoria na assimilação do carbono com o aumento da concentração inicial de inóculo. A fim de se comprovar as vantagens fermentativas da concentração de 10,0 %(v/v) de inóculo sobre a fermentação de 2,3-BDO para o meio M3, além de se comprovar a influência sobre os demais meios, os seguintes parâmetros cinéticos foram determinados: Concentração máxima de 2,3-BDO (C_{BDO}); Rendimento de produto a partir do substrato ($Y_{P/S}$); Eficiência da fermentação (E_f); Produtividade volumétrica (P_V); e Consumo de substrato. A Tabela 6 reúne os dados calculados.

Tabela 6: Parâmetros cinéticos de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, a partir de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Meio de cultivo - concentração inicial de inóculo %(v/v)	C_{BDO} ($g \cdot L^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($g \cdot g^{-1}$)	E_f (%)	t_{MP} (h)	P_V ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	Consumo
						do substrato (%)
M1 – 3,75	7,86± 0,44	0,463± 0,020	92,7± 4,2	12	0,655± 0,040	95,1± 0,6
M2 – 3,75	6,53± 0,61	0,349± 0,010	66,7± 2,4	24	0,272± 0,020	97,1± 2,1
M3 – 3,75	3,89± 0,27	0,306± 0,030	66,5± 6,5	24	0,162± 0,010	70,4± 1,3
M4 – 3,75	4,20± 0,17	0,304± 0,005	66,0± 1,2	30	0,140± 0,005	71,2± 0,5
M1 – 10,0	8,34± 0,01	0,449± 0,022	89,8± 4,4	12	0,695± 0,001	95,7± 3,7
M2 – 10,0	6,02± 0,03	0,312± 0,002	62,5± 0,5	24	0,251± 0,001	98,8± 1,7
M3 – 10,0	5,74± 0,05	0,313± 0,001	68,0± 0,4	48	0,120± 0,001	90,9± 0,6
M4 – 10,0	4,28± 0,25	0,333± 0,015	72,3± 3,3	30	0,143± 0,008	66,1± 0,8

C_{BDO} : concentração máxima produzida de 2,3-BDO; $Y_{\text{P/S}}$: rendimento de 2,3-BDO a partir do substrato; E_f : eficiência da fermentação - quantidade de 2,3-BDO produzida em relação ao máximo teórico (razão entre $Y_{\text{P/S}}$ e $Y_{\text{P/S}}^{\text{teórico}}=0,500\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - glicose e $0,489\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - glicerol); t_{MP} : tempo corresponde à máxima produção de 2,3-BDO; e P_v : produtividade volumétrica de 2,3-BDO.

1: meio base com glicose comercial; 2: meio base com glicose comercial e extrato de levedura LaBiM; 3: meio base com glicerol comercial; 4: meio base com glicerol comercial e extrato de levedura LaBiM.

Pela análise da Tabela 6, os meios M3 e M4, contendo glicerol como substrato, apresentaram melhorias, ainda que pequenas, nos parâmetros C_{BDO} e consumo de substrato (M3), e $Y_{\text{P/S}}$ e E_f (M4), com o aumento da concentração inicial de inóculo. Segundo Nilegaonkar *et al.* (1996), o aumento do tamanho do inóculo tem um efeito positivo sobre o rendimento de 2,3-BDO. O mesmo foi sugerido por Anvari e Motlagh (2011), que comprovaram a influência do inóculo na produção final de 2,3-BDO. No entanto, quando analisados os meios M1 e M2, essas melhorias não foram observadas de maneira geral, ratificando a não influência do aumento de inóculo na produção de 2,3-BDO quando a glicose foi utilizada. Como já discutido, a glicose é um açúcar de fácil metabolização por parte dos micro-organismos, quando comparado ao glicerol. Dessa maneira, os efeitos da presença de maiores quantidades de biomassa podem ser mais facilmente percebidos sobre as fontes mais difíceis de serem assimiladas, já que a influência sobre elas é mais significativa.

Em relação às produtividades, não foram constatadas melhorias significativas para nenhum dos meios, principalmente os que continham glicerol como substrato (M3 e M4). Esse resultado era esperado, visto que a bactéria *P. polymyxa* PM 3605 gastou um tempo maior para consumir o glicerol e produzir o máximo de 2,3-BDO. Ao contrário do que foi observado neste estudo, Perego *et al.* (2003) sugerem que o aumento da concentração de biomassa favorece a produtividade média de 2,3-BDO. Contudo, essa afirmação depende do tipo de micro-organismo empregado, bem como das condições de fermentação adotadas.

Os meios contendo extrato de levedura comercial, M1 e M3, apresentaram um aumento na produção de 2,3-BDO (C_{BDO}), com o aumento da concentração inicial de inóculo. Nessas condições, os maiores valores de 2,3-BDO foram obtidos, dado o tipo de substrato utilizado: $8,34\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para glicose (aumento de 6,1%) e $5,74\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para

glicerol (aumento de 47,6%). Priya *et al.* (2016) observaram um aumento de aproximadamente 40,0% na produção de 2,3-BDO, além de 69,0% no rendimento desse produto, quando a concentração inicial de inóculo foi dobrada, passando de 1,0 para 2,0 %(v/v). Para teores maiores, de até 5,0 %(v/v), nenhuma diferença significativa foi observada.

Diante dos resultados encontrados, o tamanho inicial de inóculo de 10,0 %(v/v) foi escolhido como a concentração inicial celular para todas as fermentações (em frascos agitados e em biorreator), visto que a produção de 2,3-BDO e o consumo de carbono, importantes parâmetros fermentativos, apresentaram uma tendência geral de elevação para o inóculo mais alto, principalmente, nos meios contendo glicerol, substrato de interesse desta investigação.

5.2. Seleção do meio de fermentação

A escolha do meio de fermentação a ser utilizado neste estudo, principalmente em biorreator, foi realizada mediante dois fatores: economia e produção. De acordo com esse requisito, os meios contendo glicose comercial foram desconsiderados, uma vez que o uso de fontes de carbono de baixo custo tem sido a prioridade de diversos estudos, que buscam tornar o meio de cultivo mais econômico, como já discutido na seção 2.1.4.2. *Fontes alternativas de nitrogênio e carbono.*

Diante disso, os meios contendo glicerol, M3 e M4, foram, inicialmente, selecionados, sendo comparados quanto aos parâmetros cinéticos de produção de 2,3-BDO, apresentados na Tabela 6. Esses resultados foram rerepresentados na Figura 13, a fim de facilitar suas comparações.

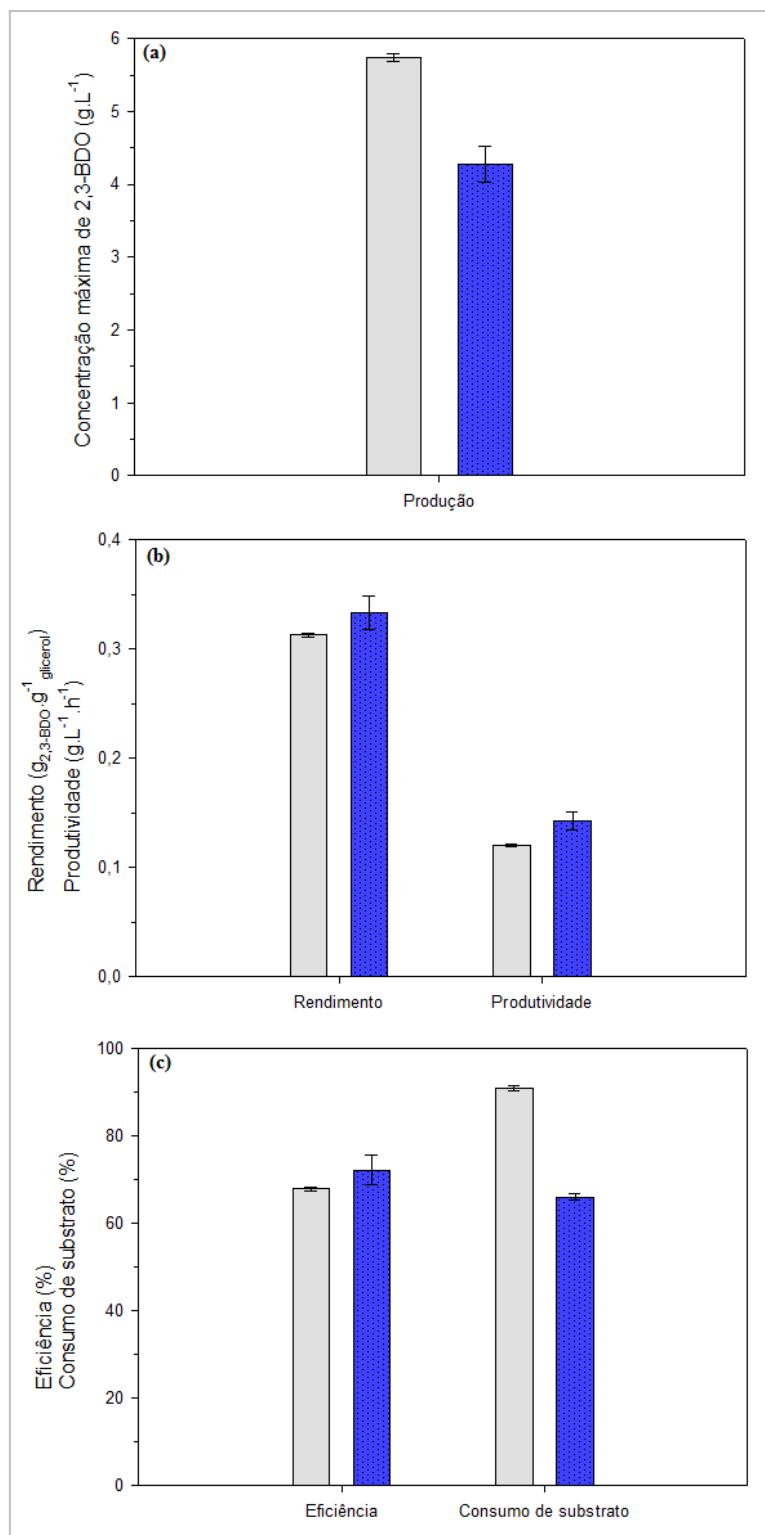


Figura 13: Parâmetros cinéticos da fermentação de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM3605, a 37°C, 200 rpm, em frascos agitados, usando 10,0 % (v/v) de inóculo: (a) Produção máxima; (b) Rendimento e produtividade; (c) Eficiência da fermentação e consumo de substrato. M3 – glicerol comercial; M4 – extrato de levedura LaBiM e glicerol comercial.

A partir da Figura 13, é possível perceber que o meio M3 apresentou resultados mais significativos para a concentração máxima de 2,3-BDO e para o consumo de glicerol que o meio M4, enquanto os demais parâmetros não apresentaram grandes diferenças entre cada condição, ainda que para o meio M4, seus valores tenham sido um pouco maiores. Como a fonte de carbono do meio M4 não foi completamente consumida (apenas 66% de carbono foi assimilado), a produção de 2,3-BDO foi menor que a encontrada para o meio M3. Seria, então, necessário um tempo de fermentação superior ao empregado, 75h, para que o consumo de glicerol fosse melhorado. No entanto, sabe-se que o próprio produto, 2,3-BDO, causa, nas etapas finais da fermentação, uma redução na taxa de utilização do substrato, refletindo diretamente no seu consumo, bem como diminuindo a taxa de crescimento da bactéria (OKONKWO *et al.*, 2017). Logo, o aumento do tempo dessa fermentação não necessariamente implicaria em uma melhoria no consumo de glicerol do meio M4 e, como consequência, a concentração de 2,3-BDO provavelmente não aumentaria.

Diante disso, o meio M3 foi pré-selecionado. Apesar dos bons resultados encontrados para os parâmetros fermentativos, esse meio apresentou uma queda na concentração de 2,3-BDO, a partir de 48h de fermentação (Figura 11b), como já mencionado anteriormente. Com o objetivo de compreender esse comportamento, uma cinética mais detalhada do processo foi estabelecida, na qual a forma isomérica *meso* de 2,3-BDO foi representada. A Figura 14 ilustra os resultados observados.

É possível perceber, na Figura 14, a presença do isômeros *meso* de 2,3-BDO, a partir de 48h de fermentação. O aumento da forma enantiomérica *meso* foi acompanhado pela diminuição da forma *levo*, ainda que a produção de 2,3-BDO total (soma de *levo* e *meso*) tenha aumentado. Esse comportamento evidencia o fenômeno de isomerismo, em que o arranjo molecular de um composto é alterado, mantendo-se o conjunto e a estrutura atômicos.

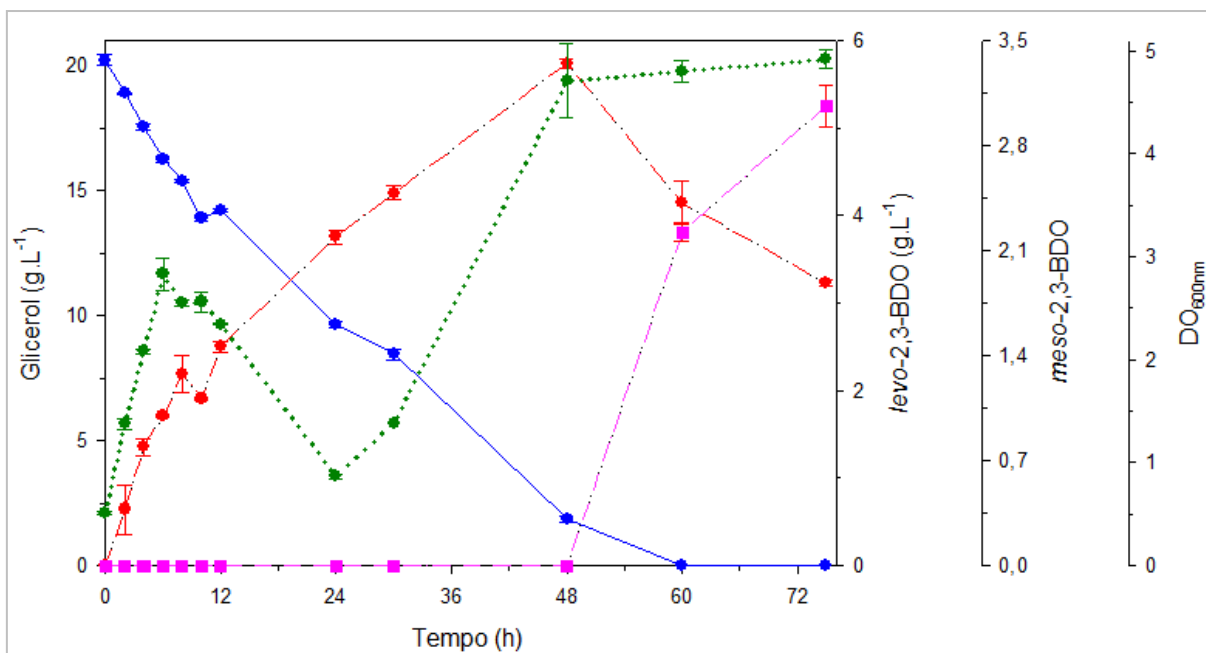


Figura 14: Isomerismo de 2,3-BDO - Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em frascos agitados a 37°C e 200 rpm, usando glicerol comercial como substrato. —●— Glicerol comercial; —●— *Levo*-2,3-BDO; —■— *Meso*-2,3-BDO; e —●— DO_{600nm}

Segundo Okonkwo *et al.* (2017), o 2,3-BDO produzido pela espécie *P. polymyxa* é capaz de sofrer isomerismo, passando da forma *levo* para a *meso*, em razão da baixa toxicidade que este isômero apresenta em relação àquele. O aumento do enantiômero *meso* no meio, apesar da espécie microbiana produzir quase exclusivamente a forma *levo*, consiste em uma estratégia metabólica de alívio de estresse, o qual é gerado pela presença de *levo* em quantidades consideradas tóxicas ao micro-organismo de trabalho, normalmente em longos períodos de fermentação. Um comportamento similar foi também verificado por Gao *et al.* (2010), ao utilizarem uma linhagem de *P. polymyxa*.

O mecanismo responsável pela interconversão das formas *levo* e *meso* ainda é pouco conhecido, porém, sabe-se que, em altas concentrações de *levo*-2,3-BDO, a enzima BDH (2,3-BDO desidrogenase) oxida esse isômero, gerando R-acetoína. Esta, por sua vez, limita a atividade da enzima ALDC (α -cetolactato descarboxilase), o que leva à conversão espontânea de α -cetolactato a diacetil. O diacetil é, então, convertido a

S-acetoína, que, pela ação da enzima BDH, se transforma em *meso*-2,3-BDO (Okonkwo *et al.*, 2017).

Além dessas conversões, também é possível que o 2,3-BDO tenha sofrido uma reação reversa, voltando ao seu precursor acetoína, a partir da saturação de 2,3-BDO no meio de cultivo. Segundo Okonkwo *et al.* (2017), a acetoína, assim como o *meso*-2,3-BDO, é uma forma metabólica menos inibitória que o *levo*-isômero. Os autores constataram a toxicidade dos compostos por meio de bioensaios. Apesar da possibilidade de reação reversa, não foi possível, neste trabalho, verificar seus efeitos sobre a cinética de 2,3-BDO, uma vez que não foram coletados dados referentes à acetoína.

É possível, por fim, que o 2,3-BDO seja consumido por parte da bactéria *P. polymyxa*, como elucidado por Ji *et al.* (2011). Segundo esses pesquisadores, na indisponibilidade de outra fonte de carbono e energia, ou no esgotamento do substrato usado em uma dada fermentação, o 2,3-BDO pode ser utilizado durante a fase estacionária, pelo micro-organismo responsável por sua produção, para que as atividades metabólicas celulares continuem a ocorrer. Apesar da existência desse comportamento, o consumo de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605 não foi observado neste estudo, quando glicerol foi utilizado como substrato.

Diante do exposto, considerando a produção de 2,3-BDO, o consumo de substrato e o tempo de fermentação para o surgimento de isomerismo e demais fenômenos cinéticos, o meio M3 foi selecionado como o meio de fermentação a ser utilizado nos ensaios realizados neste estudo, objetivando a formação de *levo*-2,3-BDO.

5.3. Comparação com a Literatura

A fim de se verificar a viabilidade produtiva do meio M3, usando a bactéria *P. polymyxa* PM 3605, uma busca na literatura foi realizada, de modo a identificar estudos semelhantes a este, que também utilizassem glicerol como fonte de carbono e energia. O resultado dessa busca evidenciou a ausência de trabalhos utilizando *P. polymyxa* e glicerol para a produção de 2,3-BDO, o que representa uma oportunidade de investigação científica.

No entanto, foram encontrados, na patente de Martinez *et al.* (2015), alguns dados comparativos entre diferentes bactérias, incluindo duas linhagens de *P. polymyxa*, todas utilizando glicerol como substrato. Os resultados dessa patente foram organizados na Tabela 7. A patente em questão não apresentou uma investigação profunda acerca de *P. polymyxa*. Os dados obtidos pelos autores foram, aparentemente, gerados somente para justificar as vantagens fermentativas das bactérias por eles investigadas.

Tabela 7: Comparativo dos parâmetros fermentativos de produção de 2,3-BDO, para diferentes linhagens de *P. polymyxa*, utilizando glicerol como substrato. Todos os dados correspondem à condução batelada em frascos agitados.

Estirpe	Meio	Glicerol inicial (g.L ⁻¹)	C _{BDO} (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (g.g ⁻¹)	Consumo de Glicerol (%)	Condições de cultivo	Fonte
<i>P. polymyxa</i> PM 3605	M3	20,0	5,74 (48h)	0,313	90,9	37°C e 200rpm	Este trabalho
<i>P. polymyxa</i> ATCC12321	MB	60,0	4,60	0,142	55,0	30°C e 100rpm	Martinez <i>et al.</i> (2015)
<i>P. polymyxa</i> DSM356			4,70	0,226	35,5		

M3- meio base contendo glicerol comercial; MB – composição por litro: 60,0 g de glicerol; 5,0 g de extrato de levedura; 5,0 de triptona, 7,0 g de KH₂PO₄; 7,0 g de KH₂PO₄; 1,0 g de (NH₄)₂SO₄; 0,25 g de MgSO₄·7H₂O; 0,12 g de NaMoO₄·7H₂O; 0,021 g de CaCl₂·2H₂O; 0,029 g de CoCl₂·6H₂O; 0,039 g de Fe(NH₂)₂SO₄·6H₂O; 2,0 mg de ácido nicotínico, 0,17 mg de Na₂SeO₃; 0,02 mg de NiCl₂; e 10,0 mL de uma solução de microelementos (por litro: 0,5 g de Na₂EDTA; 0,5 g de MnCl₂·4H₂O; 0,1 g de H₃BO₃; 1,0 mg de CuCl₂·2H₂O).

Pela análise da Tabela 7, é possível perceber que *P. polymyxa* PM 3605 apresenta um desempenho superior em relação às demais linhagens, demonstrando ser uma bactéria produtora potencial de 2,3-BDO, a partir de glicerol. A produção e o rendimento desse diol encontrados neste estudo foram, em média, 23,0% e 70,0% maiores, respectivamente, que os encontrados na patente, para uma quantidade inicial de glicerol três vezes menor. Além disso, aproximadamente 91,0% da fonte de carbono e energia foram consumidas nesta fermentação, indicando a alta capacidade de

assimilação de glicerol por *P. polymyxa* PM 3605, em conduções realizadas em frascos agitados, nas condições utilizadas.

É importante destacar que uma possível justificativa para os resultados superiores deste estudo seria a condução do processo fermentativo sob condições consideradas ótimas para a espécie *P. polymyxa*: 37°C e 200 rpm. Estudos anteriores, como os de Dai *et al.* (2014), mostraram que a temperatura de 37°C favorece a máxima utilização do substrato por parte de *P. polymyxa*, com maior formação de 2,3-BDO, em detrimento de outros produtos, como etanol e os ácidos orgânicos láctico, acético e succínico. Outro importante trabalho é o de Adlakha e Yazdani (2015), que realizaram a otimização do meio usado neste trabalho nas condições de 37°C e 200 rpm, o que dá respaldo à utilização dessa temperatura e dessa agitação, nos ensaios com *P. polymyxa* PM 3605.

Outro ponto a ser destacado é o fato de a produção de 2,3-BDO apresentada na Tabela 7 para *P. polymyxa* PM 3605 corresponder somente à forma *levo* do diol, enquanto que na patente essa informação não é explicitada. Em muitos estudos, os parâmetros cinéticos de 2,3-BDO são baseados não somente na forma *levo*, como também na *meso* e até no precursor acetoína. Exemplos são o trabalhos de Dai *et al.* (2014); Priya *et al.* (2016); e Okonkwo *et al.* (2017). Portanto, é possível que os resultados encontrados neste estudo sejam ainda mais promissores, o que ratifica a utilização da linhagem *P. polymyxa* PM 3605 como micro-organismo para a produção de 2,3-BDO (em frascos agitados).

Por fim, vale ressaltar a economia associada ao meio de cultivo usado neste estudo. Sua composição é claramente menos complexa que a utilizada no meio MB da patente. Isso se deve provavelmente à composição adequada de nutrientes proposta para o meio M3 por Adlakha e Yazdani (2015), que conseguiram identificar os compostos necessários à produção de 2,3-BDO, em quantidades ideais do ponto de vista nutricional-microbiano, sem que houvesse comprometimento produtivo. Diante disso, o meio M3 foi considerado eficiente e econômico, sendo, portanto, uma opção vantajosa ao processo fermentativo.

5.4. Glicerol residual

Depois de verificada a eficiência do glicerol como fonte de carbono e energia para a produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, deu-se início à investigação das formas residuais desse composto, visando à economia do processo.

Dois resíduos de glicerol foram investigados, ambos “não refinados”: glicerina loira sem a presença de sebo animal e glicerina loira com 10,0 % (v/v) de sebo animal. O sebo presente no resíduo de glicerol está associado ao uso de gordura animal, além dos óleos vegetais, no processo de transesterificação que dá origem ao biodiesel. Trata-se de uma impureza adicional, comumente presente nos resíduos de biodiesel das indústrias brasileiras. Já o “não refinamento” da glicerina indica que demais contaminantes típicos, como o metanol, os ácidos orgânicos pesados (oleico e linoleico) e os sais KCl e K₂SO₄ (VENKATARAMANAN *et al.*, 2012), provavelmente estavam presentes no resíduo.

Inicialmente, o crescimento celular de *P. polymyxa* PM 3605 foi investigado, uma vez que, segundo Venkataramanan *et al.* (2012), a presença dos ácidos orgânicos, oleico e linoleico, no glicerol residual, foi capaz de inibir o crescimento e o metabolismo de uma linhagem de *C. pasteurianum*. Por outro lado, os sais e o metanol não apresentaram efeitos negativos sobre o comportamento cinético da bactéria em questão. A Figura 15 ilustra o perfil de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605, considerando o uso de glicerol puro e residual.

Os perfis apresentados na Figura 15 indicaram uma concentração final de biomassa de *P. polymyxa* PM 3605, em termos absolutos de DO_{600nm}, menor para o glicerol residual, em relação ao glicerol comercial. Provavelmente, a presença de impurezas orgânicas ácidas contribuiu para esse comportamento, embora não seja crítica a quantidade desses compostos no meio, uma vez que os perfis cinéticos foram semelhantes para os três tipos de glicerol investigados.

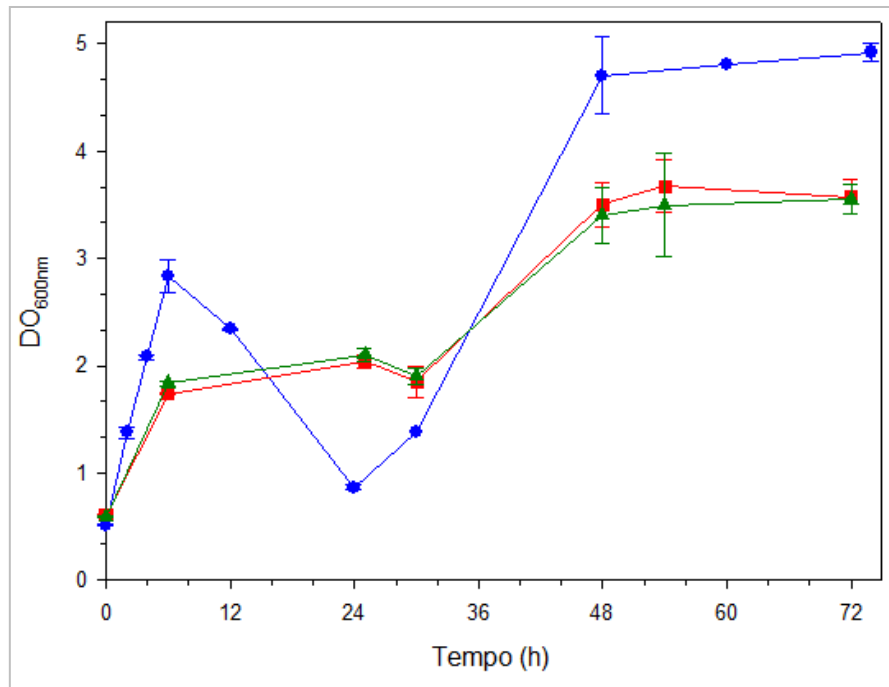


Figura 15: Perfis de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 em diferentes tipos de glicerol, em frascos agitados a 37°C e 200rpm:

—●— Glicerol comercial; —■— Glicerina loira sem sebo; e —▲— Glicerina loira com 10,0 % (v/v) de sebo.

Em relação às gliceras entre si, o sebo não apresentou atividade interferente no crescimento da bactéria. Ambas as curvas apresentaram valores bem próximos, dentro do intervalo do erro experimental (curvas vermelha —■— e verde —▲— da Figura 15). Yang *et al.* (2013), utilizando *Bacillus amyloliquefaciens*, em ensaios conduzidos em frascos agitados, também perceberam que tipos distintos de glicerol não afetaram o comportamento cinético das células.

No entanto, é notória a presença de duas regiões de crescimento nas três curvas apresentadas, típicas do fenômeno de diauxia, no qual o micro-organismo apresenta dois perfis de crescimento em razão do consumo não simultâneo das fontes de carbono presentes no meio de cultivo. Contudo, como já discutido anteriormente, para a curva de glicerol comercial, a queda acentuada de biomassa, seguida de crescimento, foi atribuída ao micro-organismo empregado e à sua capacidade metabólica de assimilação de glicerol, visto que a glicose e o glicerol presentes em M3 foram consumidos

paralelamente. Logo, não é possível afirmar que o fenômeno de diauxia tenha acontecido com o glicerol comercial.

Ao contrário, para as curvas de glicerol residual, o fenômeno diáuxico parece ter ocorrido, uma vez que o glicerol e a glicose foram consumidos não simultaneamente por *P. polymyxa* PM 3605. Na Figura 16 é possível perceber que o glicerol praticamente não foi consumido nas 6 primeiras horas de fermentação. Esse tempo coincidiu com o início da fase *lag* observada na Figura 15. Yang *et al.* (2013) observaram diauxia quando investigaram glicerol residual na presença de outros substratos, usando *B. amyloliquefaciens*. Eles denominaram o fenômeno de “segundo crescimento” e atribuíram à glicose a responsabilidade por esse comportamento, pois, segundo eles, somente após esse substrato ter sido completamente consumido é que o glicerol começou a ser assimilado pelas células. Além disso, eles não observaram esse fenômeno na presença de outros açúcares, como, por exemplo, a sacarose e o melão de beterraba, que também foram investigados em seus estudos, na presença de glicerol.

No caso deste trabalho, a diauxia foi provavelmente decorrente da presença de glicose residual do pré-inóculo usado nos ensaios fermentativos, uma vez que as células não foram submetidas a etapas prévias de centrifugação e lavagem. A glicose foi, primeiramente, consumida por *P. polymyxa* PM 3605, enquanto a concentração de glicerol permaneceu praticamente constante nas 6 primeiras horas de cultivo para ambos os tipos de glicerina (Figura 16). O consumo de glicose não foi acompanhado por uma fase *lag*, uma vez que as células provavelmente já se encontravam adaptadas às condições do meio no intervalo entre 0h e 6h (Figura 15). Com a exaustão da glicose em 6h, as células tiveram que se adaptar à nova condição do meio, agora rico em glicerol, que passou a ser consumido, até o final do processo, em 72h (Figura 16). Uma região *lag* foi, então, observada, entre 6h e 30h, resultante dessa condição adaptativa por parte das células (Figura 15). Posteriormente, um novo crescimento foi verificado, seguido de estabilização celular, a partir de 54h de cultivo. Considerando-se, portanto, as curvas de crescimento da Figura 15 e tomando-se como início $t=24h$, foi possível identificar as fases típicas do crescimento celular para os dois tipos de glicerol residual, conforme esperado teoricamente: fase *lag* – de adaptação ao meio nutricional (6-30h); fase *log* - de crescimento exponencial (30-54h) e fase estacionária - de estabilidade celular (54-72h).

O uso do pré-inóculo diretamente no meio de cultivo, apesar de ter levado ao fenômeno de diauxia, foi justificado em razão da economia do processo. Em processos de larga escala, a redução da quantidade de operações unitárias é desejada, desde que não afete a qualidade e eficiência produtivas do processo. Assim, visando a um escalonamento futuro da produção de 2,3-BDO, essa estratégia foi adotada neste estudo.

Depois de avaliada a cinética de crescimento microbiano, a cinética de produção de 2,3-BDO foi analisada. Os perfis de consumo de glicerol e produção de 2,3-BDO para os meios contendo glicerol na forma residual foram construídos, sendo apresentados na Figura 16.

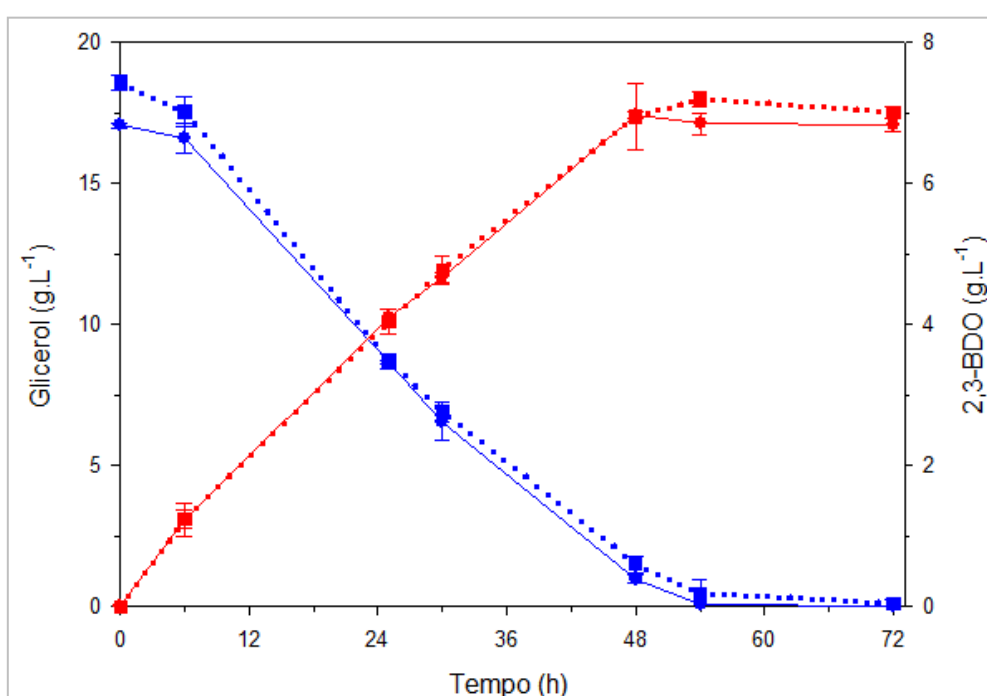


Figura 16: Cinética de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, usando glicerol residual, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm:

—●— Glicerol originado da glicerina sem sebo; —■— Glicerol originado da glicerina com 10,0 % (v/v) de sebo; —●— 2,3-BDO produzido da glicerina sem sebo; e —■— 2,3-BDO produzido da glicerina com 10,0 % (v/v) de sebo.

Assim como para a cinética de crescimento, a cinética de produção de 2,3-BDO apresentou um comportamento bastante semelhante para ambos os resíduos de glicerol,

conforme ilustrado na Figura 16. Novamente, a não interferência do sebo no processo em estudo pôde ser comprovada. O mesmo foi observado por Yang *et al.* (2013), em que o tipo de glicerol residual não foi capaz de afetar a formação de 2,3-BDO. Metsoviti *et al.* (2012a), por sua vez, testarem três tipos diferentes de glicerol residual, usando uma linhagem de *Klebsiella oxytoca*. Esses autores perceberam que as impurezas presentes no resíduo de glicerol, como sais e metanol, não foram capazes de impactar, negativamente, a assimilação do glicerol por parte do micro-organismo, tampouco a formação do diol.

A fim de se comprovar matematicamente a semelhança na produção de 2,3-BDO a partir dos dois tipos de resíduos de glicerol e, ao mesmo tempo, compará-los com a produção advinda do glicerol comercial, os seguintes parâmetros cinéticos foram calculados: Produção máxima de 2,3-BDO (C_{BDO}); Rendimento de produto a partir de substrato ($Y_{P/S}$); Eficiência da fermentação (E_f); Produtividade (P_V); e Consumo de substrato. A Tabela 8 reúne os parâmetros calculados.

Tabela 8: Parâmetros cinéticos de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, usando diferentes tipos de glicerol como substratos.

Substrato	C_{BDO} (g.L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	E_f (%)	t_{MP} (h)	P_V (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Consumo do substrato (%)
Glicerol Comercial	5,74±0,05	0,313±0,001	68,0±0,4	48	0,120±0,001	90,9±0,6
Glicerina Loira sem sebo	6,97±0,05	0,434±0,003	88,7±0,7	48	0,145±0,001	94,3±0,8
Glicerina Loira com 10,0% (v/v) sebo	7,19±0,11	0,398±0,001	81,3±0,3	54	0,133±0,002	97,5±2,5

C_{BDO} : concentração máxima produzida de 2,3-BDO; $Y_{P/S}$: rendimento de 2,3-BDO dado o substrato; E_f : eficiência da fermentação - quantidade de 2,3-BDO produzida em relação ao máximo teórico (razão entre $Y_{P/S}$ e $Y_{P/S}^{teórico}=0,489\text{g.g}^{-1}$); t_{MP} : tempo corresponde à máxima produção de 2,3-BDO; e P_V : produtividade volumétrica de 2,3-BDO.

Os parâmetros cinéticos para ambos os resíduos de glicerol, de acordo com a Tabela 8, foram bastante semelhantes, comprovando matematicamente que as cinéticas de produção de 2,3-BDO não sofreram influência pelo tipo residual de glicerol usado. Comparando-se todos os parâmetros fermentativos, apesar da existência de pequenas variações nos valores calculados, é possível afirmar que não houve diferenças significativas na produção de 2,3-BDO a partir dos resíduos empregados. Logo, a escolha do tipo residual de glicerol a ser utilizado neste estudo foi baseada no seguinte aspecto: aproveitamento de glicerol residual “menos puro possível”. Neste caso, o interesse se deu em razão da importância econômica e ambiental desse tipo de material, já que ao mesmo tempo em que se objetivou agregar valor ao resíduo, o problema de disposição a ele associado pôde ser solucionado, sem que fossem demandados gastos adicionais com o seu refinamento.

Ao contrário, quando os resultados fermentativos de glicerol residual foram contrastados com os do glicerol comercial, foi possível notar diferenças nos valores de C_{BDO} , $Y_{P/S}$ e E_f . Em relação ao glicerol comercial, os parâmetros em destaque sofreram um aumento de, aproximadamente, 25%; 27% e 20%, nesta ordem, quando a glicerina loira com sebo foi empregada como substrato. Observações semelhantes foram verificadas por Ripoll *et al.* (2016), ao investigarem dois tipos distintos de glicerol residual (55,0 e 85,0 % (v/v) de pureza), além do comercial puro, usando linhagens de *Raoultella planticola* e *R. terrigena*, em frascos agitados e em biorreator. Os autores verificaram cinéticas de produção de 2,3-BDO e de crescimento celular próximas para os diferentes tipos de glicerol, porém com rendimentos um pouco superiores para as formas residuais, de maneira geral.

Do ponto de vista produtivo e econômico, os resultados encontrados foram bastante interessantes, pois indicam a eficiência do resíduo de glicerol na produção de 2,3-BDO, em termos de concentração máxima e rendimento. De acordo com a literatura, rendimentos em torno de $0,4 \text{ g.g}^{-1}$ foram alcançados em estudos utilizando glicose, o que evidencia a vantagem do glicerol residual como substrato eficiente para a geração de 2,3-BDO. Dessa maneira, a substituição da fonte de carbono comercial por uma residual foi considerada viável nos processos fermentativos realizados neste trabalho.

Além do aproveitamento biológico do glicerol residual, outros processos têm sido reportados na literatura, como é o caso dos estudos de Stelmachowski *et al.* (2014), que aplicaram o método de fotocatalise para converter glicerol em hidrogênio, e de Đurišić-Mladenović *et al.* (2016), que propuseram a co-gaseificação do glicerol com outras biomassas para a produção de gás de síntese.

Em todos os casos, o aproveitamento desse tipo de glicerol residual pode ser realizado sem grandes problemas, sendo considerado um composto potencialmente econômico e produtivo para diferentes aplicações.

Portanto, diante dos resultados alcançados, a glicerina loira com 10,0 %(v/v) de sebo foi selecionada como substrato residual eficiente, sendo destinada aos ensaios fermentativos preliminares em biorreator.

5.5. Influência da concentração inicial do substrato

Antes de se partir para os ensaios em biorreator, a concentração inicial de glicerol residual, presente em glicerina loira com 10,0 %(v/v) de sebo, foi investigada, com o intuito de selecionar a condição que garantisse melhor rendimento de 2,3-BDO. Assim, três diferentes concentrações foram analisadas, além da concentração de 20,0 g.L⁻¹ já avaliada neste estudo: 50,0; 70,0; e 85,0 g.L⁻¹.

O tempo de condução dos ensaios em questão foi arbitrariamente definido como sendo igual a 144h, o dobro do tempo utilizado na cinética do meio M3 (Figura 11). Era esperado, com isso, que a viabilidade celular no sistema fosse mantida.

Inicialmente, as cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 em cada condição foram determinadas. Os perfis encontrados foram apresentados na Figura 17.

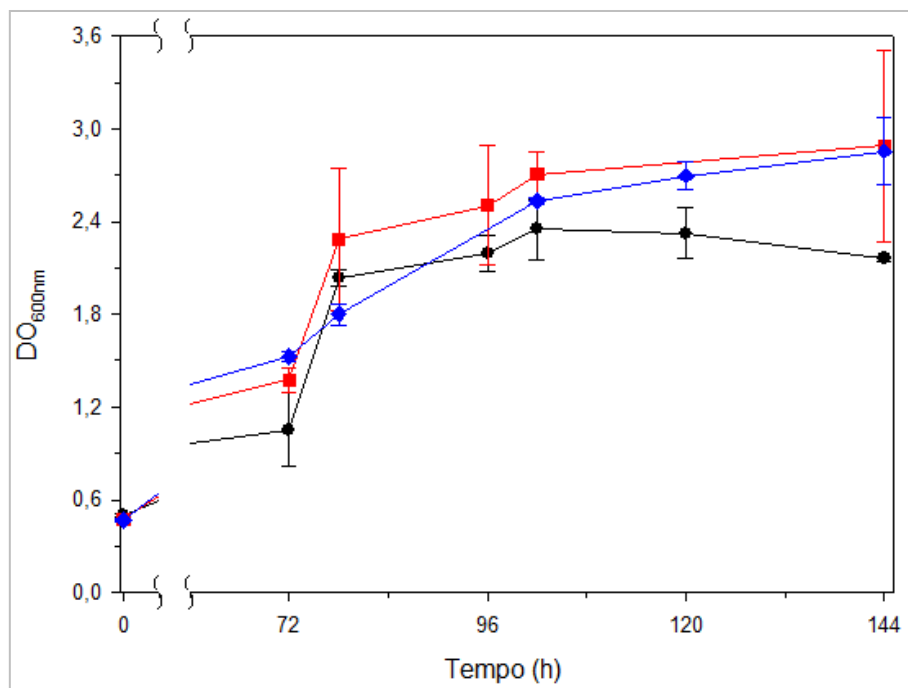


Figura 17: Perfis cinéticos de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605, para diferentes concentrações iniciais de glicerol residual, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm:

—●— 50,0 g.L⁻¹; —■— 70,0 g.L⁻¹; e —◆— 85,0 g.L⁻¹.

De acordo com a Figura 17, os perfis cinéticos de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 foram semelhantes para as três concentrações iniciais de glicerol residual investigadas. Em todos os casos, uma região exponencial pode ser verificada no intervalo entre 72h e 102h. A partir desse instante, os perfis passaram a apresentar um menor crescimento (70,0 e 85,0 g.L⁻¹) ou mesmo uma pequena redução da biomassa celular (50,0 g.L⁻¹), indicando o início de uma possível fase estacionária.

Os valores amostrados ponto a ponto não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre cada condição, quando seus intervalos de erros (desvios-padrão) foram levados em consideração. Na realidade, esses valores foram praticamente iguais entre si. Isso sugere, portanto, que as concentrações iniciais de glicerol residual investigadas foram equivalentes e, como consequência, os efeitos cinéticos promovidos por elas sobre o crescimento celular acabaram sendo similares, de modo geral. Dessa forma, em termos de biomassa, não foi possível determinar qual das condições foram mais vantajosas para as células de *P. polymyxa* PM 3605.

A cinética de produção de 2,3-BDO foi também determinada para cada uma das condições em estudo. A Figura 18 ilustra os resultados encontrados.

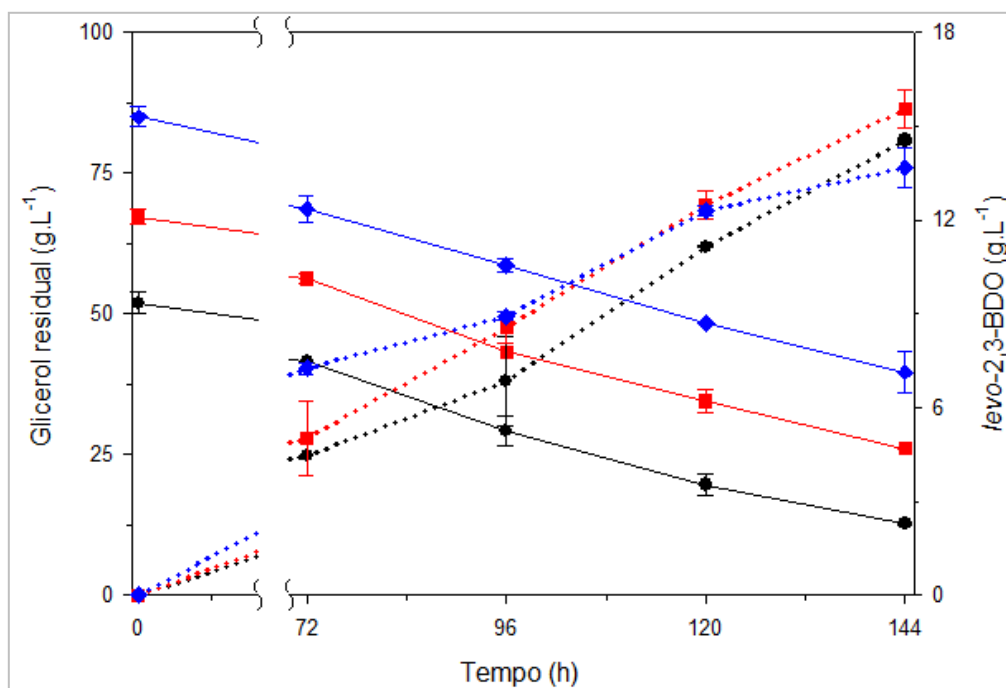


Figura 18: Cinética de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, para diferentes concentrações iniciais de glicerol residual, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm:

—●— 50,0 g.L⁻¹; —■— 70,0 g.L⁻¹; e —◆— 85,0 g.L⁻¹ (Glicerol)
 ●●● 50,0 g.L⁻¹; ■■■ 70,0 g.L⁻¹; e ◆◆◆ 85,0 g.L⁻¹ (2,3-BDO)

Novamente, uma similaridade cinética foi observada para as três concentrações iniciais de glicerol residual, conforme verificado na Figura 18. As curvas de produção de 2,3-BDO apresentaram valores amostrais estatisticamente semelhantes. Esse comportamento já era esperado, uma vez que o 2,3-BDO é um produto do metabolismo primário e, por esse motivo, sua síntese está associada ao crescimento microbiano (RIPOLL *et al.*, 2016). Como esse crescimento foi equivalente para todas as condições investigadas, conforme discutido anteriormente, as produções de 2,3-BDO também deveriam ser, como pôde ser observado.

Em relação ao consumo de glicerol (Figura 18), uma mesma tendência de assimilação foi observada para cada uma das concentrações iniciais investigadas, o que ratifica a não influência da quantidade inicial de carbono sobre a produção de 2,3-BDO, pelo menos no intervalo adotado de 144h, para as condições avaliadas. Em termos de taxa de consumo de glicerol, as concentrações de 50,0; 70,0 e 85,0 g.L⁻¹ apresentaram, respectivamente, os seguintes valores: 0,29; 0,35; e 0,36 g_{glicerol}.L⁻¹.h⁻¹, ao final de 144h. O menor valor de taxa para 50,0 g.L⁻¹ pode justificar a pequena redução da quantidade de biomassa observada na Figura 17, ao final do processo. Provavelmente, a dificuldade na assimilação do substrato nessa condição, ainda que apenas ligeiramente maior se comparada às demais, fez com que uma menor quantidade de carbono fosse direcionada à geração de células. Conseqüentemente, uma condição estacionária foi estimulada e a biomassa passou a apresentar um comportamento de estabilidade quantitativa, caracterizado pela DO_{600nm} quase constante no tempo (Figura 17). A Figura 19 apresenta as taxas de consumo de glicerol residual, para cada condição avaliada, ao longo do tempo.

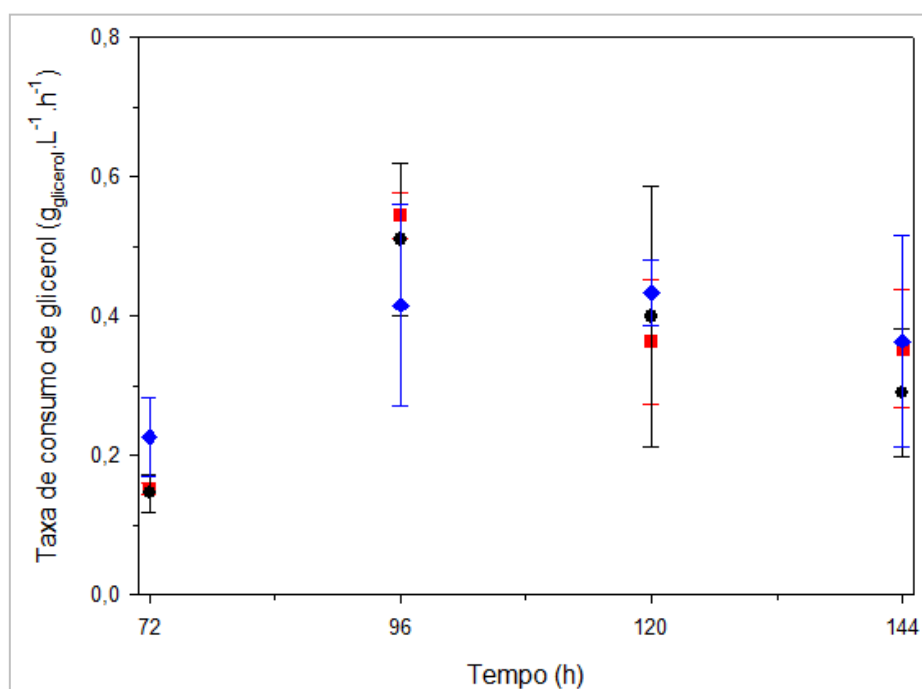


Figura 19: Taxas de consumo de glicerol, para diferentes concentrações iniciais:

—●— 50,0 g.L⁻¹; —■— 70,0 g.L⁻¹; e —◆— 85,0 g.L⁻¹.

A partir da Figura 19, é possível notar que a taxa de assimilação de glicerol apresentou um comportamento inicial de crescimento, seguido por uma redução, à medida que o tempo de cultivo foi aumentando. Para os meios com 50,0 e 70,0 g.L⁻¹ de glicerol iniciais, a máxima taxa foi alcançada em 96h de cultivo, enquanto que para o meio com 85,0 g.L⁻¹, em 120h. A partir desses instantes, a assimilação de glicerol começou a decair, alcançando um valor mais baixo em 144h. Das condições avaliadas, a concentração de 50,0 g.L⁻¹ apresentou um comportamento de queda do consumo de glicerol mais acentuado (praticamente linear). Isso pode ser justificado pela própria quantidade de carbono disponibilizada ao micro-organismo. Nessa condição, o substrato é mais rapidamente consumido que nas demais, assim como os nutrientes do meio, já que suas quantidades são menores (logo há um menor efeito inibitório, se comparado às outras concentrações). Além disso, o acúmulo de produtos indesejados no meio se dá mais rapidamente, criando, assim, um ambiente de redução da atividade celular. Logo, em períodos superiores a 96h, o consumo de glicerol passou a ser comprometido.

Metsoviti *et al.* (2012a) observaram uma redução no consumo de glicerol em concentrações iniciais superiores a 120 g.L⁻¹, ao trabalharem com *K. oxytoca*, em frascos agitados, sem controle de pH. Esses autores colocaram em discussão a possibilidade de o acúmulo de impurezas, advindas de altas concentrações de resíduo de glicerol, e a capacidade de crescimento do micro-organismo, na presença de elevados teores desse substrato, serem os possíveis responsáveis pela diminuição do consumo de glicerol.

A não assimilação eficiente de substrato do meio é considerada, portanto, um fator crítico do processo, que dificulta, inclusive, o seu escalonamento. Normalmente, ela é intensificada com o aumento da concentração inicial do carbono empregado, devido ao efeito de inibição causado pelo substrato e à presença de impurezas, também de caráter inibitório. Por essa razão, o controle da concentração inicial de glicerol é considerado crucial, a fim de se garantir uma produção adequada de 2,3-BDO. No entanto, neste estudo, como já mencionado, o aumento de glicerol inicial não afetou significativamente as cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM3605 e produção de 2,3-BDO. Logo, seu efeito não foi considerado crítico, nas condições avaliadas.

Para confirmar matematicamente as observações realizadas a partir das curvas cinéticas apresentadas acima, os seguintes parâmetros fermentativos foram calculados:

Concentração de 2,3-BDO (C_{BDO}); Rendimento de produto a partir do substrato ($Y_{\text{P/S}}$); Eficiência da fermentação (E_f); e Produtividade volumétrica (P_v). A Tabela 9 reúne os dados calculados.

Tabela 9: Parâmetros cinéticos de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605 em diferentes concentrações iniciais de glicerol residual. Os parâmetros foram calculados após 144h de processo.

$C_{\text{GL-OH}}$ (g.L^{-1})	$C_{\text{GL-OH}}^{\text{inicial}}$ (g.L^{-1})	C_{BDO} (g.L^{-1})	$Y_{\text{P/S}}$ (g.g^{-1})	E_f (%)	P_v ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
50,0	51,9 ± 1,9	14,5 ± 0,1	0,37 ± 0,02	75,8 ± 3,6	0,100 ± 0,001
70,0	67,2 ± 1,4	15,6 ± 0,6	0,38 ± 0,03	77,1 ± 5,4	0,108 ± 0,004
85,0	85,0 ± 1,8	13,7 ± 0,6	0,30 ± 0,02	61,5 ± 4,6	0,095 ± 0,004

$C_{\text{GL-OH}}$: concentração teórica de glicerol residual; $C_{\text{GL-OH}}^{\text{inicial}}$: concentração inicial de glicerol residual determinada por HPLC; C_{BDO} : concentração de 2,3-BDO; $Y_{\text{P/S}}$: rendimento de 2,3-BDO a partir do substrato; E_f : eficiência da fermentação - quantidade de 2,3-BDO produzida em relação ao máximo teórico (razão entre $Y_{\text{P/S}}$ e $Y_{\text{P/S}}^{\text{teórico}}=0,489\text{g.g}^{-1}$); e P_v : produtividade volumétrica de 2,3-BDO.

De acordo com a Tabela 9, os parâmetros fermentativos calculados podem ser considerados equivalentes para os três teores iniciais de glicerol residual investigados, ainda que, para a concentração de 85,0 g.L^{-1} , seus valores tenham sido um pouco menores que os das demais condições. Esses resultados confirmaram a não influência da concentração inicial de substrato para a produção de 2,3-BDO dentro do intervalo de 144h estudado. Esse comportamento difere de trabalhos da literatura, como os de Li *et al.* (2014), que observaram os efeitos da concentração inicial de glicerol residual sobre a produção de 2,3-BDO.

A escolha da condição a ser empregada em biorreator foi baseada, portanto, na economia do processo. Dessa maneira, optou-se por utilizar a concentração inicial de glicerol residual de 50,0 g.L^{-1} , uma vez que foi possível obter uma mesma quantidade de 2,3-BDO, usando, inicialmente, menos substrato. Além disso, como o glicerol utilizado era originado da glicerina loira com sebo (não refinada), a presença de

impurezas seria menor em quantidades menores desse resíduo, o que reduziria possíveis complicações na síntese de 2,3-BDO.

Ripoll *et al.* (2016) verificaram uma produção máxima de 2,3-BDO em concentração inicial de 90,0 g.L⁻¹ de glicerol residual, ao empregarem duas linhagens de *Raoultella*. Priya *et al.* (2016), por sua vez, obtiveram melhores rendimentos para o 2,3-BDO, ao utilizarem glicose em concentrações inferiores a 60,0 g.L⁻¹ e *Enterobacter cloacae* como micro-organismo de trabalho.

Na condição de 50,0 g.L⁻¹ de glicerol residual, o rendimento de 2,3-BDO foi de 0,37 g.g⁻¹, considerado um resultado potencialmente produtivo e econômico. A produção crescente de 2,3-BDO ao longo das 144h pode explicar esse rendimento elevado. De acordo com as Figuras 20 e 21, o 2,3-BDO foi produzido não somente na fase exponencial de crescimento celular, como também na região estacionária (a partir de 102h), apesar de sua produção ser associada ao crescimento. Segundo Celińska e Grajek (2009) e Ji *et al.* (2011), o 2,3-BDO pode ser usado como forma de estocagem de carbono e energia, sobretudo na fase estacionária, quando o substrato se encontra em pequenas quantidades no meio. Além disso, a geração de 2,3-BDO é capaz de prevenir a acidificação intracelular, por se tratar de um composto neutro, bem como regular a razão NADH/NAD⁺ no interior das células, condição necessária para uma adequada atividade metabólica. Logo, a presença de 2,3-BDO foi observada ao longo de todo o processo fermentativo, o que refletiu nos bons resultados encontrados para os parâmetros fermentativos apresentados na Tabela 9.

Os resultados encontrados neste estudo foram comparados com a literatura. A Tabela 10 apresenta um resumo de alguns trabalhos que utilizaram glicerol residual como substrato. Informações de produção, rendimento, produtividade e eficiência fermentativa de 2,3-BDO, bem como concentração inicial de substrato e grupo de risco das linhagens microbianas utilizadas, podem ser visualizadas. Em todos os casos, as fermentações foram conduzidas em bateladas simples (frascos agitados ou biorreator), sob condições adequadas de cultivo para cada tipo celular empregado.

Tabela 10: Resumo dos principais trabalhos encontrados na literatura para a produção de 2,3-BDO, em batelada simples – frascos agitados e biorreator, utilizando diferentes concentrações iniciais de glicerol residual.

Micro-organismo	Fator de risco	$C_{\text{Gl-OH inicial}}$ (g.L ⁻¹)	C_{BDO} (g.L ⁻¹)	$Y_{\text{P/S}}$ (g.g ⁻¹)	E_f (%)	P_v (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Referência Bibliográfica
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	40,0	4,80 ^a	0,18	36,8	0,10	Metsoviti <i>et al.</i> , 2012a
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	55,0	22,0 ^b	0,40	64,5	0,42	Metsoviti <i>et al.</i> , 2012b
<i>Raoultella planticola</i>	1	90,0	27,5 ^b	0,31	50,0	0,23	Ripoll <i>et al.</i> , 2016
<i>Raoultella terrigena</i>	1	90,0	33,6 ^b	0,38	61,3	0,35	Ripoll <i>et al.</i> , 2016

a: frascos agitados; b: biorreator.

Fator de risco: corresponde ao nível de segurança do micro-organismo – 1: segura; 2: risco à saúde humana; $C_{\text{Gl-OH inicial}}$: concentração inicial de glicerol residual; C_{BDO} : concentração máxima produzida de 2,3-BDO; $Y_{\text{P/S}}$: rendimento de 2,3-BDO; E_f : eficiência da fermentação - quantidade de 2,3-BDO produzida em relação ao máximo teórico (razão entre $Y_{\text{P/S}}$ e $Y_{\text{P/S,teórico}}=0,489\text{g.g}^{-1}$); e P_v : produtividade volumétrica de 2,3-BDO.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a capacidade de produção de 2,3-BDO por parte de *P. polymyxa* PM 3605 frente a outras espécies produtoras do diol. Isso pode ser comprovado por meio dos resultados encontrados para *P. polymyxa* PM 3605 utilizando 50,0 g.L⁻¹ de glicerol residual (Tabela 9) e para *K. oxytoca* usando 40,0 g.L⁻¹ de glicerol residual (Tabela 10). Em ambos os casos, os ensaios fermentativos foram conduzidos em frascos agitados. Enquanto 14,5 g.L⁻¹ de 2,3-BDO foram produzidas por *P. polymyxa* PM 3605, a um rendimento de 0,37 g.g⁻¹ e uma produtividade de 0,10 g.L⁻¹.h⁻¹ (Tabela 9), cerca de 4,8 g.L⁻¹ de 2,3-BDO, a um rendimento de 0,18 g.g⁻¹ e produtividade similar, foram produzidos por *K. oxytoca*, (Tabela 10). Isso demonstra que o processo de produção de 2,3-BDO em frascos agitados, baseado em *P. polymyxa* e glicerol, é promissor e, portanto, sua investigação em escalas maiores pode ser justificada.

5.6. Efeito do co-substrato na produção de 2,3-butanodiol

Depois de selecionada a concentração inicial de glicerol para a produção de 2,3-BDO em biorreator, correspondente a $50,0 \text{ g.L}^{-1}$, a influência da adição de co-substrato na assimilação do glicerol foi investigada. Para isso, melaço residual do processo de obtenção de etanol, a partir da cana-de-açúcar, foi utilizado. Três concentrações distintas foram investigadas: $5,0$; $10,0$; e $20,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Inicialmente, as cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 em cada condição foram determinadas, tendo sido investigadas ao longo de 144h. Os perfis encontrados foram apresentados na Figura 20. O comportamento da taxa de consumo de glicerol foi também representado.

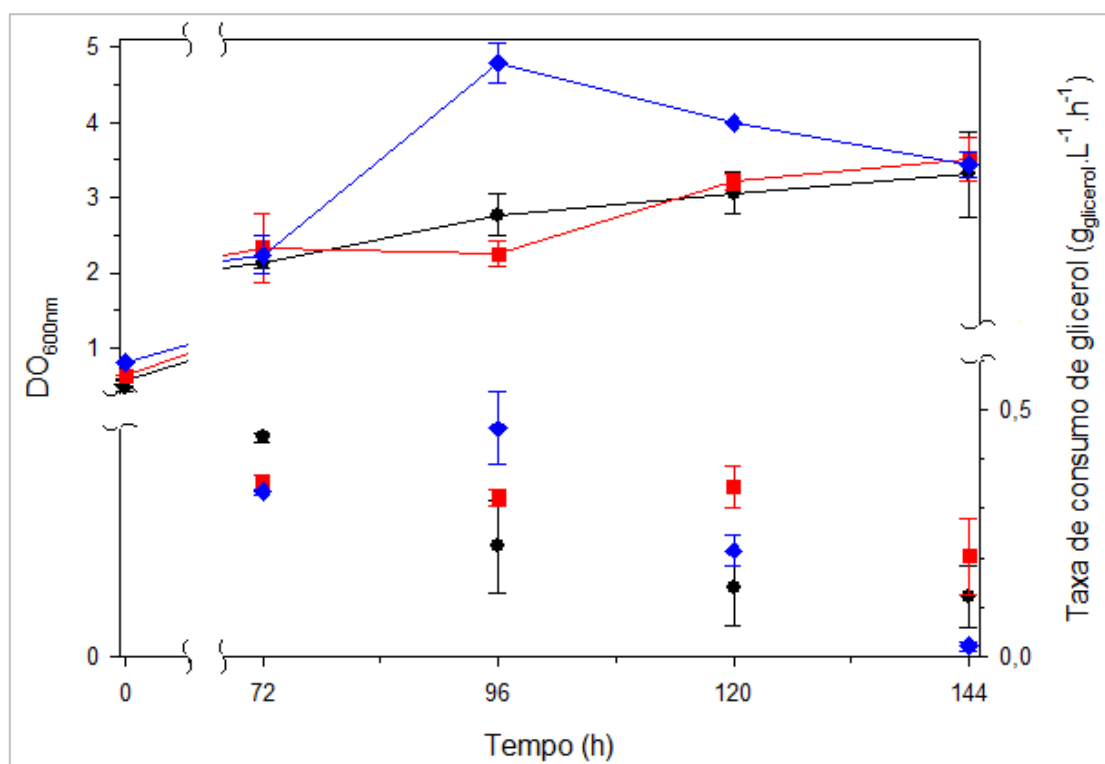


Figura 20: Perfil cinético de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e taxas de consumo de glicerol diárias, para diferentes concentrações de melaço residual usado como co-substrato, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm:

—●— $5,0 \text{ g.L}^{-1}$; —■— $10,0 \text{ g.L}^{-1}$; e —◆— $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ ($\text{DO}_{600\text{nm}}$)
● $5,0 \text{ g.L}^{-1}$; ■ $10,0 \text{ g.L}^{-1}$; e ◆ $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ (Taxas)

Pela análise da Figura 20, é possível compreender o comportamento cinético de *P. polymyxa* PM 3605 na presença de melaço atuando como co-substrato, a partir das taxas de consumo de glicerol calculadas ao longo de 144h de cultivo. Apesar de não estar claramente definidas as fases que constituem a curva cinética de crescimento microbiano, em razão da limitação de pontos amostrais, é possível perceber que a produção de biomassa celular acompanhou, de maneira geral, a assimilação de glicerol. As taxas correspondentes a 5,0 g.L⁻¹ de melaço apresentaram uma tendência de consumo de substrato decrescente e pouco acentuada, se comparada com à das demais condições. Isso possivelmente explica o crescimento praticamente constante de *P. polymyxa* PM 3605 no intervalo entre 96 e 144h. Já as taxas correspondentes a 10,0 e 20,0 g.L⁻¹ de melaço, por sua vez, apresentaram um aumento inicial de consumo de glicerol (até 120 e 96h, respectivamente), seguido de decréscimo, resultante da exaustão do glicerol no meio de cultivo. No caso da condição de 20,0 g.L⁻¹ de melaço, o fim da fonte de carbono refletiu na queda de biomassa celular presente no meio, conforme observado pelos pontos azuis (losangos) da Figura 20. O crescimento celular para 10,0 g.L⁻¹ de melaço foi crescente e pouco acentuado a partir de 120h de cultivo, quando o glicerol se encontrava praticamente todo assimilado. Sendo assim, em termos da geração de biomassa absoluta, a condição de 20,0 g.L⁻¹ foi considerada a mais eficiente, pois em 96h de fermentação, a máxima concentração celular foi alcançada.

A fim de confirmar os resultados observados acima, em termos produtivos de 2,3-BDO, a cinética de produção desse composto foi determinada para cada uma das concentrações de melaço residual em análise, ao longo de 144h de fermentação. A Figura 21 ilustra os resultados encontrados.

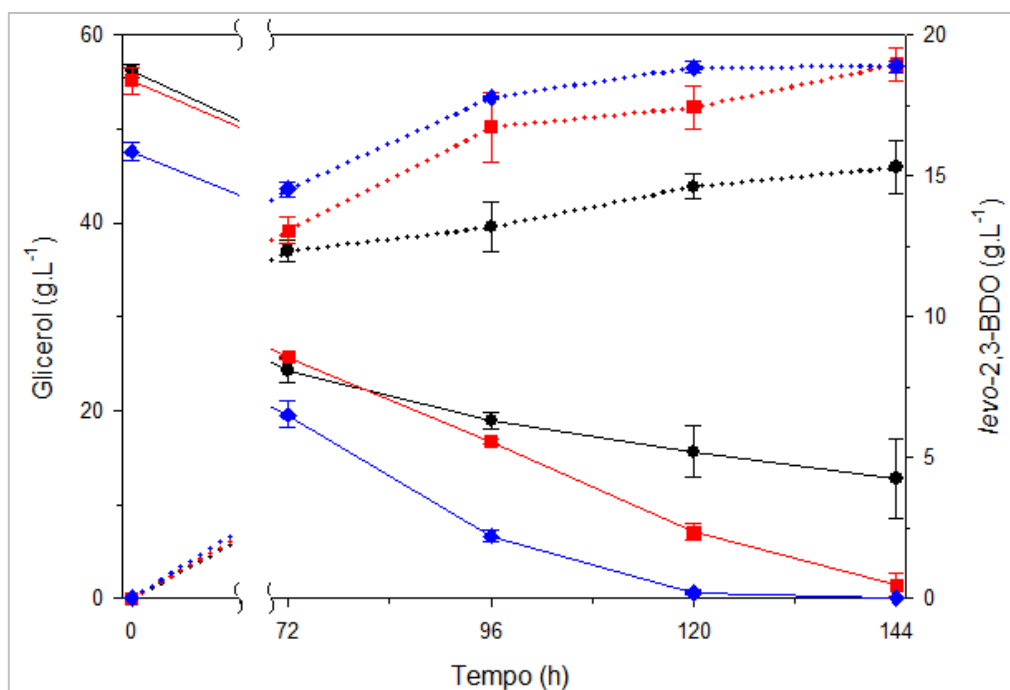


Figura 21: Cinética de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, para diferentes concentrações de melação residual usado como co-substrato, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm:

—●— 5,0 g.L⁻¹; —■— 10,0 g.L⁻¹; e —◆— 20,0 g.L⁻¹ (Glicerol)
 ●●●● 5,0 g.L⁻¹; ■■■■ 10,0 g.L⁻¹; e ◆◆◆◆ 20,0 g.L⁻¹ (levo-2,3-BDO)

De acordo com as curvas representadas na Figura 21, as concentrações de 10,0 e 20,0 g.L⁻¹ de melação residual adicionadas no meio de cultivo favoreceram a assimilação do carbono por parte de *P. polymyxa* PM 3605, que praticamente consumiu todo o glicerol. Portanto, um efeito positivo da presença de co-substrato pôde ser verificado. Em relação à produção de 2,3-BDO, essas condições resultaram em concentrações finais próximas entre si e superiores às encontradas para 5,0 g.L⁻¹. Considerando-se os intervalos de erros experimentais, pode-se dizer que essas condições foram estatisticamente equivalentes e mais eficientes ao processo que a condição de 5,0 g.L⁻¹.

A fim de se comprovar matematicamente as observações realizadas acima, os seguintes parâmetros fermentativos foram calculados: Concentração de 2,3-BDO (C_{BDO}); Rendimento de produto a partir do substrato (Y_{P/S}); Eficiência da fermentação

(E_f); Produtividade volumétrica (P_V); e Consumo de substrato. A Tabela 11 reúne os dados calculados, bem como o valor de referência (meio sem adição de melão).

Tabela 11: Efeito da adição de melão, usado como co-substrato, sobre os parâmetros cinéticos de produção de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, usando 50,0 g.L⁻¹ de glicerol residual inicial.

$C_{\text{Melão}}^{-I}$ (g.L ⁻¹)	$C_{\text{GL-OH}}^{\text{inicial}}$ (g.L ⁻¹)	Consumo substrato (%)	C_{BDO}^{-I} (g.L ⁻¹)	$Y_{P/S}^{-I}$ (g.g ⁻¹)	E_f (%)	$P_V^{-I, -I}$ (g.L ⁻¹ h ⁻¹)
0,0	51,9±1,9	75,6±0,3	14,5±0,1	0,37±0,02	75,8±3,6	0,100±0,001
5,0	56,2±0,7	77,4±7,8	15,3±0,9	0,35±0,02	71,9±3,7	0,106±0,006
10,0	55,1±1,5	97,5±2,3	18,9±0,6	0,39±0,07	72,2±1,4	0,132±0,004
20,0	47,6±1,0	100±0,0	18,9±0,2	0,40±0,01	81,2±2,5	0,131±0,001

$C_{\text{Melão}}$: concentração de melão residual adicionado no meio de cultivo; $C_{\text{GL-OH}}^{\text{inicial}}$: concentração inicial de glicerol residual determinada em HPLC; C_{BDO} : concentração de 2,3-BDO produzida; $Y_{P/S}$: rendimento de 2,3-BDO a partir do substrato; E_f : eficiência da fermentação - quantidade de 2,3-BDO produzida em relação ao máximo teórico (razão entre $Y_{P/S}$ e $Y_{P/S}^{\text{teórico}}=0,489\text{g.g}^{-1}$); e P_V : produtividade volumétrica de 2,3-BDO.

Pela análise da Tabela 11, é possível perceber que a adição de 5,0 g.L⁻¹ de melão ao meio contendo glicerol residual não foi suficiente para melhorar a produção de 2,3-BDO, de maneira significativa. Considerando o intervalo de erros experimentais, pode-se perceber que os parâmetros apresentaram resultados semelhantes aos encontrados para o meio controle (sem a presença de melão). Em relação às concentrações de 10,0 e 20,0 g.L⁻¹ de melão, porém, a produção de 2,3-BDO foi melhorada, assim como a assimilação do glicerol. Nessas condições, o teor de diol ao final de 144h de fermentação foi aproximadamente 30,0% maior, assim como o consumo do substrato e a produtividade. Isso confirma as expectativas em torno dos açúcares usados como co-substratos, de que eles favorecem o crescimento microbiano, contribuindo para o consumo do carbono principal e, conseqüentemente, para uma maior produção de um determinado metabólito de interesse. O melão, portanto, permitiu a geração de uma maior quantidade de biomassa celular, que passou a consumir o glicerol de maneira mais eficiente, justificando, dessa maneira, os resultados

encontrados. O rendimento de 2,3-BDO e a eficiência fermentativa foram estatisticamente semelhantes para todas as condições avaliadas.

O melão, usado neste estudo, era composto, majoritariamente, por sacarose, além de glicose e frutose (Ver Anexo II). Como as concentrações adicionadas de melão foram relativamente pequenas, as quantidades de cada um desses açúcares também foram pequenas no meio, embora a presença de sacarose tenha sido preponderante em relação aos demais açúcares. Por exemplo, para 20,0 g.L⁻¹ de melão, cerca de 15,1 g.L⁻¹ correspondiam à sacarose, 2,58 g.L⁻¹ à glicose e 2,32 g.L⁻¹ à frutose. Dessa forma, a sacarose influenciou mais significativamente os parâmetros fermentativos calculados (Tabela 11). Assim como observado em outros trabalhos, a presença de sacarose não dificultou a assimilação de glicerol por parte do micro-organismo. Ao contrário, ela favoreceu o seu consumo, como já justificado anteriormente para as adições de 10,0 e 20,0 g.L⁻¹ de melão no meio de cultivo. A glicose, por sua vez, prejudicou a produção de diois, como observado por Metsoviti *et al.* (2012a). Esses autores investigaram a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e 2,3-BDO por *K. oxytoca*, usando glicerol na presença de glicose como co-substrato. Biebl e Marten (1995) também constaram o efeito prejudicial da glicose como co-substrato na produção de 1,3-PDO, usando *Clostridium butyricum*. Os autores observaram a geração de acetato e CO₂, com redução de NADH, composto responsável pelo rendimento de 1,3-PDO, quando a glicose atuou como co-substrato. Portanto, considerando os resultados encontrados e a literatura em questão, a sacarose parece ser um co-substrato mais promissor do que a glicose para a geração de diois, o que justifica o uso de melão nos processos de produção de 2,3-BDO deste estudo.

Em relação às condições de 10,0 e 20,0 g.L⁻¹, ambas foram estatisticamente semelhantes (Tabela 11). Então, a escolha da condição a ser usada em biorreator foi feita com base na relação custo-benefício do processo. A adição de 10,0 g.L⁻¹ de melão ao meio contendo glicerol apresentou desempenho similar à condição de 20,0 g.L⁻¹, porém usando uma menor quantidade de sacarose. Portanto, a condição de 10,0 g.L⁻¹ de melão foi definida como sendo a concentração ideal de co-substrato, a partir da qual a produção de 2,3-BDO foi favorecida. Yang *et al.* (2013) observaram um aumento de 16,8 (frascos agitados) para 33,9 g.L⁻¹ (biorreator) de 2,3-BDO ao adicionarem cerca de

15,0 g.L⁻¹ de melão de beterraba em meio de cultivo contendo 80,0 g.L⁻¹ de glicerol residual.

5.7. Formação de sub-produtos

Além da síntese de 2,3-BDO, a formação de sub-produtos foi investigada no meio suplementado com 10,0 g.L⁻¹ de melão residual. A Figura 22 apresenta os resultados encontrados nesse ensaio fermentativo.

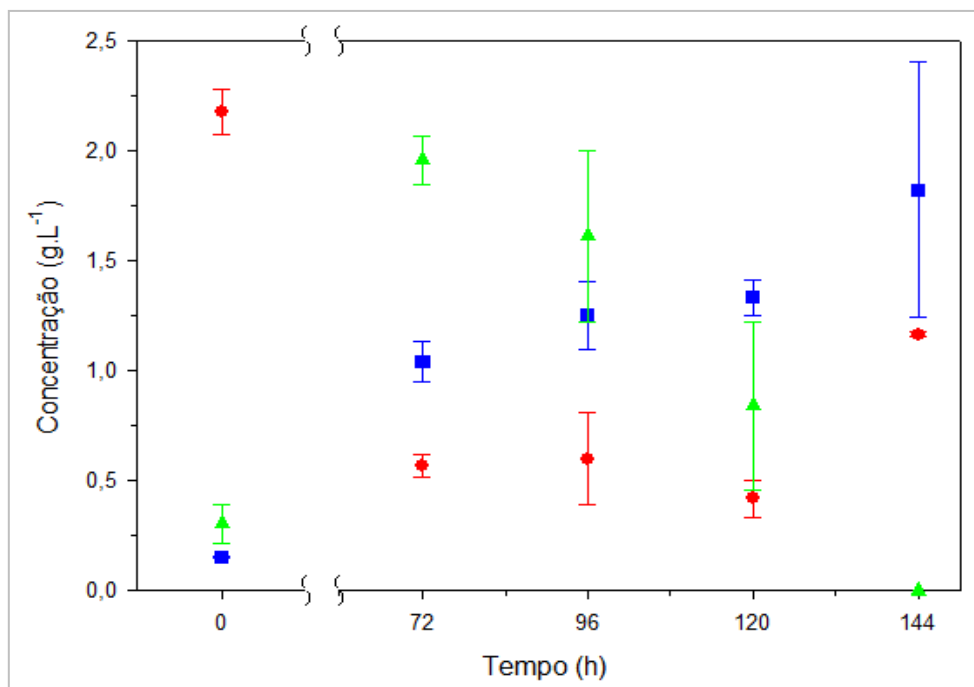


Figura 22: Produção dos sub-produtos da fermentação de 2,3-BDO, em meio contendo 50,0 g.L⁻¹ de glicerol residual e 10,0 g.L⁻¹ de melão. Os ensaios foram conduzidos por 144h, em frascos agitados a 37°C e 200 rpm.

● Ácido Succínico; ■ Ácido Lático; e ▲ Ácido Fórmico.

Um dos ácidos mais importantes do metabolismo de 2,3-BDO é o ácido acético, visto sua influência sobre o rendimento desse produto. Neste trabalho, um acúmulo de ácido acético no meio suplementado com melão e conduzido em frascos agitados não foi detectado, como pode ser verificado na Figura 22. Esse resultado é considerado

vantajoso, do ponto de vista fisiológico, para *P. polymyxa* PM 3605, uma vez que a inibição causada pelo acetato é evitada (DE MAS *et al.*, 1988; HÄBLER *et al.*, 2012). Uma possível explicação para a ausência de ácido acético seria a baixa atividade enzimática de fosfo-transacetilase e/ou de acetato quinase, principais enzimas responsáveis pela síntese de acetato (JI *et al.*, 2011). Outra razão seria a presença de ácido succínico, embora ambos os ácidos possam ser produzidos juntos. Segundo Lee *et al.* (2001), o ácido succínico pode ser sintetizado a partir de glicerol sob reduzida formação de ácido acético.

De maneira geral, os ácidos formados (succínico, láctico e fórmico) foram detectados no tempo 0h em razão do uso de pré-inóculo não lavado. Já sua presença ao longo do processo foi atribuída, metabolicamente, à disponibilidade de oxigênio no meio. O lactato, por exemplo, é produzido mais eficientemente sob condições micro-aeróbicas, uma vez que o piruvato é convertido a lactato em ambiente com baixa concentração de oxigênio (JI *et al.*, 2011).

A tendência ascendente dos perfis encontrados para os ácidos succínico e láctico evidencia a necessidade de se controlar os parâmetros de agitação e aeração do meio, a fim de que a produção de 2,3-BDO seja favorecida e, assim como o ácido fórmico, esses sub-produtos sejam minimizados ao final da fermentação.

5.8. Condução em biorreator

5.8.1. Testes preliminares

O meio anteriormente selecionado contendo 50,0 g.L⁻¹ de glicerol residual, originado da glicerina loira com 10,0 %(v/v) de sebo, e 10,0 g.L⁻¹ de melaço como co-substrato, foi definido como o meio de cultivo para a produção de 2,3-BDO em frascos agitados. A fim de testá-lo em biorreator, ensaios preliminares foram realizados. Esses experimentos não foram realizados em duplicatas nem em condições ótimas para *P. polymyxa* PM 3605, servindo, portanto, como testes prévios para o conhecimento do

processo fermentativo e do comportamento microbiano em biorreator, a partir de informações obtidas da literatura.

Assim, inicialmente, as fermentações foram conduzidas a 500 rpm e 0,5 vvm (HÄBLER *et al.*, 2012), com 50,0 g.L⁻¹ de glicerol residual. No entanto, para as células de *P. polymyxa* PM 3605, essa condição não permitiu o crescimento celular, tampouco a produção de 2,3-BDO. Uma possível explicação para isso foi o provável estresse oxidativo a que essa bactéria foi submetida, uma vez que nas conduções em frascos agitados, a disponibilidade de oxigênio era menor, se comparada a do biorreator. Logo, um ambiente micro-aeróbico, condição necessária para a síntese de 2,3-BDO (DAI *et al.*, 2014), acabou não sendo conseguido no biorreator.

A baixa disponibilidade de oxigênio pode ser conseguida por meio de uma baixa agitação e de uma baixa aeração. Nessa condição, a enzima α -acetolactato sintase é ativada, passando, então, a produzir 2,3-BDO (JI *et al.*, 2011). A fim de tornar o meio micro-aeróbico, a agitação foi, então, reduzida para 200 rpm, tendo sido mantida a aeração de 0,5 vvm, por limitação operacional do equipamento utilizado. A concentração inicial de glicerol residual foi ajustada para ~20,0 g.L⁻¹, a fim de encurtar o cultivo e testar com maior rapidez a nova condição de suprimento de oxigênio. Novamente, as células apresentaram dificuldades de crescimento. Então, a aeração foi desligada e uma cascata de aeração foi estabelecida, levando em consideração o valor de 0,5 vvm. Dessa maneira, as células responderam bem, passando a consumir o oxigênio disponível no meio de fermentação, que se encontrava, até então, saturado com O₂. Quando a concentração de oxigênio dissolvido alcançou um valor próximo a 15,0% da saturação do ar, a aeração foi, automaticamente, ligada, permanecendo constante até o final da fermentação. A Figura 23 ilustra a cinética de produção de 2,3-BDO e de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 encontrada para o ensaio em questão.

Apesar de as células de *P. polymyxa* PM 3605 terem conseguido crescer nessa condição, não sofrendo inibição por estresse oxidativo, a assimilação do glicerol residual não foi eficiente, como é possível perceber na Figura 23, para um período de 25h de fermentação, e, conseqüentemente, a produção de 2,3-BDO foi baixa. Como discutido na seção 2.1.3.1. *Oxigênio dissolvido*, a baixa disponibilidade de oxigênio favorece o rendimento de 2,3-BDO sob condições de baixo consumo de substrato, uma vez que baixa biomassa celular é formada (CONVERTI *et al.*, 2003). Os resultados

encontrados podem ser justificados, então, pela disponibilidade inadequada de oxigênio, revelando, dessa maneira, a necessidade de se realizar a otimização das condições de aeração e agitação para *P. polymyxa* PM 3605, de modo a estabelecer o ambiente ideal para seu crescimento e para a produção de 2,3-BDO. Callow e Pirt (1961) já haviam sugerido a existência de uma relação entre a produtividade de 2,3-BDO e a biomassa celular, que, por sua vez, é dependente de uma correta disponibilidade de oxigênio. Portanto, era necessário investigar a relação agitação/aeração para *P. polymyxa* PM 3605, a fim de se estabelecer o equilíbrio entre os processos de crescimento celular e produção de 2,3-BDO. No entanto, neste trabalho, essa investigação não foi realizada.

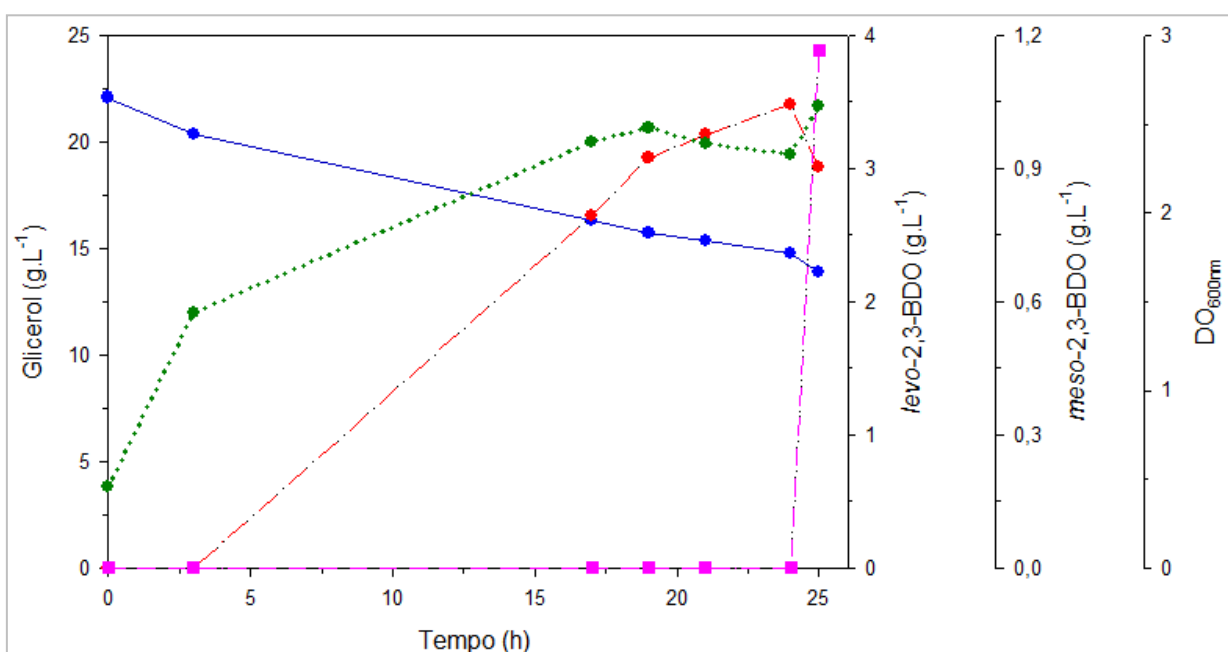


Figura 23: Cinéticas de crescimento de *P. polymyxa* PM 3605 e de produção de 2,3-BDO em biorreator a 37°C, 200 rpm e cascata de aeração (0,5 vvm), em meio contendo 20,0 g.L⁻¹ de glicerol residual e 10,0 g.L⁻¹ de melação.

—●— Glicerol residual; —●— *Levo*-2,3-BDO; —■— *Meso*-2,3-BDO; e
 ●●●●● DO_{600nm}

A relação existente entre a agitação e a aeração ajuda a entender, ainda, a seletividade de *levo*-2,3-BDO frente aos sub-produtos da fermentação e à forma isomérica *meso*. De acordo com Häßler *et al.* (2012), a baixa quantidade de oxigênio favorece uma alta seletividade de *levo*-isômero. Pela análise da Figura 24, é possível

perceber uma produção de *meso*-2,3-BDO após 25h de fermentação, com redução da concentração de *levo*-2,3-BDO. Do ponto de vista metabólico, o oxigênio favorece a conversão espontânea de α -acetolactato a diacetil, que, por sua vez, pode ser convertido em qualquer uma das duas formas enantioméricas de 2,3-BDO (NAKASHIMADA et al., 1998, citado por HÄBLER et al., 2012).

O resultado anterior confirmou, então, que a condição de 200 rpm e 0,5 vvm não foi adequada para a síntese de 2,3-BDO, com destaque à forma isomérica de interesse (*levo*-2,3-BDO), para *P. polymyxa* PM 3605. Priya et al. (2016) observaram uma diminuição no rendimento de *levo*-2,3-BDO com o aumento da agitação, da aeração e da temperatura. Eles sugeriram o controle do suprimento de oxigênio, por meio de sua diminuição moderada no meio, a fim de que a linhagem de *P. polymyxa* que eles utilizaram pudesse produzir a forma *levo*-2,3-BDO com maior pureza. Um controle da razão NADH/NAD⁺ foi também proposto pelos autores, a fim de garantir a alta seletividade de *levo*-2,3-BDO, por meio da conversão de acetoína a 2,3-BDO, quando essa razão era aumentada, pela diminuição de oxigênio disponível no meio (WANG et al., 2013).

A seletividade encontrada neste trabalho foi de 72,1 % de *levo*-2,3-BDO, em 25h de fermentação, conduzida em batelada. Häbler et al. (2012) encontraram uma seletividade de aproximadamente 98,0% de *levo*-2,3-BDO, após 24h de fermentação em batelada alimentada, 500 rpm e 0,2 vvm. Dai et al. (2014), por sua vez, obtiveram uma seletividade de aproximadamente 92,6% de *levo*-2,3-BDO para uma fermentação batelada de 24h, 300 rpm e 0,2 vvm. Portanto, o estabelecimento da condição ótima para a relação aeração/agitação foi considerado novamente necessário para os ensaios fermentativos envolvendo *P. polymyxa* PM 3605 e o glicerol residual.

Outra maneira de se realizar o controle do oxigênio disponível no meio de cultivo é realizar as conduções fermentativas em duplo estágio de pH e de agitação. Nessa configuração, a razão de NADH/NAD⁺ intracelular é ajustada, de maneira que a conversão de acetoína a 2,3-BDO seja favorecida e o rendimento e a produtividade do diol, como consequência, melhorados (WANG et al., 2013; DAI et al., 2014; PRIYA et al., 2016).

Outro importante aspecto fermentativo investigado foi a identificação dos subprodutos gerados no bioprocessamento em estudo. Por meio da análise desses compostos, foi possível compreender o comportamento metabólico de *P. polymyxa* PM 3605, a partir da determinação das rotas bioquímicas para as quais o carbono foi direcionado. Com esses resultados, é possível estabelecer estratégias que garantam a produção eficiente de 2,3-BDO em detrimento de seus subprodutos. O gráfico da Figura 24 apresenta os principais ácidos identificados junto à síntese de 2,3-BDO.

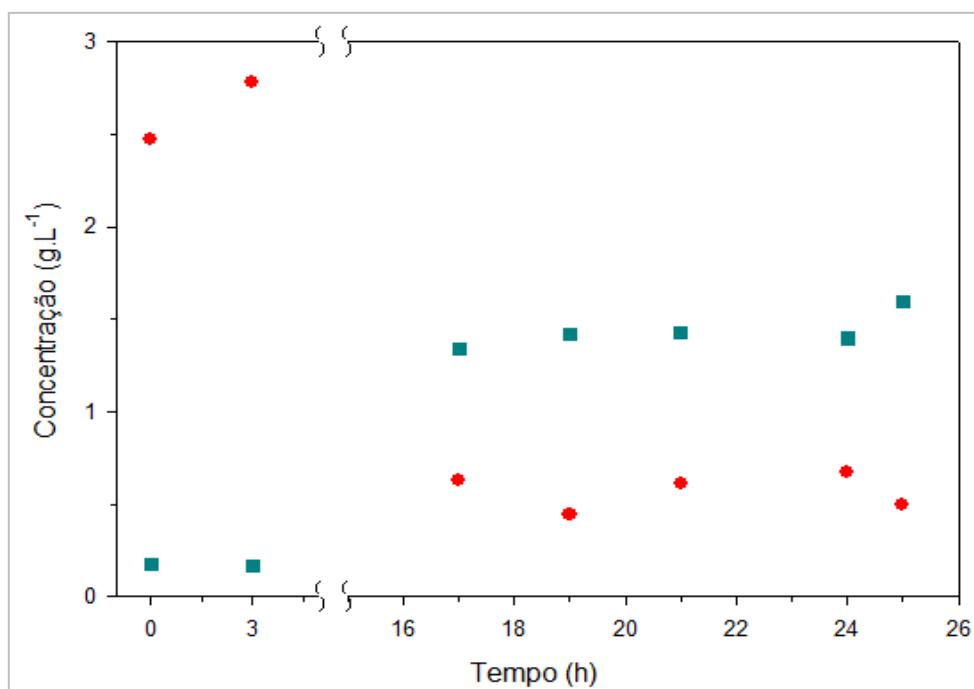


Figura 24: Produção dos subprodutos da fermentação de 2,3-BDO, em meio contendo 20,0 g.L⁻¹ de glicerol residual e 10,0 g.L⁻¹ de melaço. Os ensaios foram conduzidos por 25h em biorreator a 37°C, 200 rpm e cascata de aeração (0,500 vvm).

● Ácido Succínico; e ■ Ácido Acético.

De acordo com a Figura 24, a quantidade de ácidos orgânicos formada foi significativa, dada a concentração final de 2,3-BDO obtida, especialmente sob a forma de *levo*-isômero. Aproximadamente 1,5 g.L⁻¹ de ácido acético e 0,5 g.L⁻¹ de ácido succínico foram produzidas, para uma concentração final de cerca de 3,0 g.L⁻¹ de *levo*-2,3-BDO. Isso demonstrou, novamente, que as condições utilizadas nesse ensaio fermentativo não foram adequadas à produção do diol, sobretudo devido ao relativo

favorecimento dos sub-produtos ácidos. Petrov e Petrova (2009) observaram um comportamento semelhante quando conduziram fermentações de 2,3-BDO, usando uma linhagem de *K. pneumoniae*, em regime batelada alimentada, com controle de pH. No entanto, quando não fixaram o pH ao longo do processo, a produção de 2,3-BDO foi favorecida frente aos ácidos láctico, succínico e acético.

O favorecimento de 2,3-BDO em ambiente sem controle de pH sugere a existência de um mecanismo celular de autocontrole desse parâmetro, responsável pela liberação de metabólitos não inibitórios na cultura microbiana. Segundo Zeng *et al.* (1990), apesar de ser possível a formação de cinco diferentes produtos a partir do catabolismo de glicerol, o único composto não inibidor formado é o 2,3-BDO. Logo, sua presença em maiores quantidades no meio de cultivo sem controle de pH pode ser justificada. Diante disso, o baixo teor de 2,3-BDO encontrado neste trabalho pode estar associado, também, com o controle de pH realizado em biorreator, em que a manutenção de pH igual a 6,3 ao longo de todo o processo pode não ter sido eficiente para a síntese de 2,3-BDO.

Em relação aos ácidos, a produção de ácido acético é mais significativa, uma vez que apresenta vantagens do ponto de vista metabólico: sua formação está relacionada à regeneração de NAD^+ e à reciclagem da coenzima A. Essas condições são alcançadas com o catabolismo de glicerol, que promove a redução de equivalentes de NADH e os disponibiliza à biossíntese de metabólitos (ácidos e 2,3-BDO), dos quais o ácido acético é formado preferencialmente, dependendo das condições de trabalho. Além disso, há um maior lucro energético na formação desse ácido quando comparado aos ácidos láctico e succínico, o que reitera a vantagem produtiva do ácido acético e justifica as quantidades finais encontradas para cada um dos ácidos formados (SYU, 2001), no ensaio em biorreator deste estudo.

Diante dos resultados encontrados, é possível perceber uma limitação, em termos de eficiência produtiva, nas fermentações de 2,3-BDO conduzidas em biorreator, usando glicerol como substrato, sobretudo, devido à lentidão e às dificuldades encontradas na conversão desse composto a 2,3-BDO (PETROV e PETROVA, 2010). Portanto, para tornar o processo viável do ponto de vista produtivo e econômico, a otimização dos parâmetros da fermentação, sobretudo o pH e o oxigênio disponível, é fundamental e necessária, pois somente por meio de um controle adequado e minucioso

do bioprocesso em relação a todas as variáveis e a todas as condições consideradas críticas, é que a formação de 2,3-BDO poderá ser priorizada, frente à síntese dos co-produtos ácidos, e, por consequência, a eficiência produtiva do processo aumentada (PRIYA *et al.*, 2016).

5.9. Formação de exopolissacarídeos (EPS)

Os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares, produzidos por micro-organismos, como as bactérias e os fungos, que podem ser secretados sob a forma de limo ou estarem aderidos à superfície das células (SUTHERLAND, 1998). Quando secretados no meio, os EPSs formam grumos e dificultam o processo de produção de 2,3-BDO, uma vez que o carbono é direcionado à síntese desses compostos. Por esse motivo, sua presença é considerada crítica na fermentação de 2,3-BDO.

Durante as fermentações conduzidas com glicerol residual, e também as suplementadas com melaço, a presença de grumos, bem como o aumento da viscosidade do meio de cultivo, não foram, visualmente, identificados, no intervalo de tempo investigado. Isso pode significar a ausência ou a baixa concentração de compostos do tipo exopolissacarídeos (EPS), o que representa uma vantagem ao processo de síntese de 2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, a partir de glicerol. No entanto, como a quantificação de EPS não foi realizada neste trabalho, não foi possível confirmar essa observação visual.

Uma possível justificativa para a baixa formação de EPS foi o valor da temperatura adotado neste trabalho, igual a 37°C. Segundo Häßler *et al.* (2012), a formação de EPS diminui com o aumento da temperatura. Os autores verificaram esse comportamento ao investigarem a cinética de produção de 2,3-BDO por uma linhagem de *P. polymyxa*, em um intervalo de temperatura que variava de 30 a 41,5°C. Eles então concluíram que a 40°C os teores de EPS eram mantidos em baixos níveis, em torno de 10,0 g.L⁻¹, concentração que não era capaz de alterar, significativamente, as fermentações.

Além da temperatura, o uso de glicerol pode explicar a não produção de EPS em quantidades visualmente identificáveis. Segundo Macedo *et al.* (2002), a produção de

EPS está associada não somente às condições de cultivo de uma fermentação, como também às fontes de carbono e de nitrogênio usadas no bioprocesso. Nesse sentido, alguns autores atribuem aos seguintes compostos a responsabilidade pela síntese de EPS: glicose, sacarose, maltose, lactose, frutose, xilose, xilitol, manitol e inositol. Desses, a glicose e a sacarose são os substratos mais utilizados em estudos envolvendo a produção de EPS, de maneira desejada ou não (BARBOSA et al., 2004). Neste estudo, como o glicerol foi a fonte principal de carbono e os açúcares, advindos do melaço, se encontravam em concentrações muito baixas para promoverem a formação de EPS, principalmente em longos períodos de cultivo (144h), em que esses açúcares possivelmente já havia sido completamente consumidos, a síntese de EPS não foi favorecida. Consequentemente, não foram percebidas alterações na cinética de produção de 2,3-BDO pela presença de EPS.

Dessa maneira, foi assumida, também, neste estudo, a hipótese de dependência entre *P. polymyxa* PM 3605, temperatura e glicerol, junto à formação de EPS. Logo, a temperatura de 37°C e o uso de glicerol parecem ter sido relevantes para a não detecção visual de EPS no meio fermentativo.

5.10. Monitoramento Tecnológico

Inicialmente, a busca de patentes foi feita de acordo com a seguinte relação de palavras-chaves:

<i>Glycerol AND Polymyxa AND Butanediol OR BDL OR BDO OR BD</i>

A escolha dos termos técnicos foi feita com base em um estudo prévio das publicações científicas e tecnológicas relacionadas com a produção de 2,3-BDO, a partir de glicerol, por *Paenibacillus polymyxa*. Por essa razão, a busca foi considerada refinada e bastante específica, envolvendo poucas palavras-chave. Apesar de ter sido feita uma pesquisa avançada, tendo como fonte a FAMPAT (família de patentes) do *Orbit*, nenhum resultado foi encontrado. Essa resposta evidencia uma oportunidade de trabalho científico, uma vez que revela o caráter inovador envolvendo o 2,3-BDO, o glicerol e a bactéria *P. polymyxa*, à medida que reflete as limitações da tecnologia envolvendo esses três fatores, cujo estudo se faz necessário para promover seu

desenvolvimento. Portanto, esse resultado “negativo” pode ser usado para justificar a realização do presente trabalho, dando respaldo à continuação do processo investigativo a ele associado.

Posteriormente, uma nova busca foi realizada, a fim de se verificar a existência de trabalhos similares ao deste manuscrito. Para isso, as seguintes palavras-chave foram relacionadas:

Glucose AND Polymyxa AND Butanediol OR BDL OR BDO OR BD

Novamente, uma pesquisa avançada, tendo como fonte a FAMPAT (família de patentes) do *Orbit*, foi implementada. Porém, agora, cinco patentes foram encontradas. Elas correspondem ao intervalo de tempo de 1997 a 2017, o que indica poucos avanços na tecnologia envolvendo o 2,3-BDO, a glicose e a bactéria *P. polymyxa*. A Figura 25 ilustra a evolução anual das patentes selecionadas.

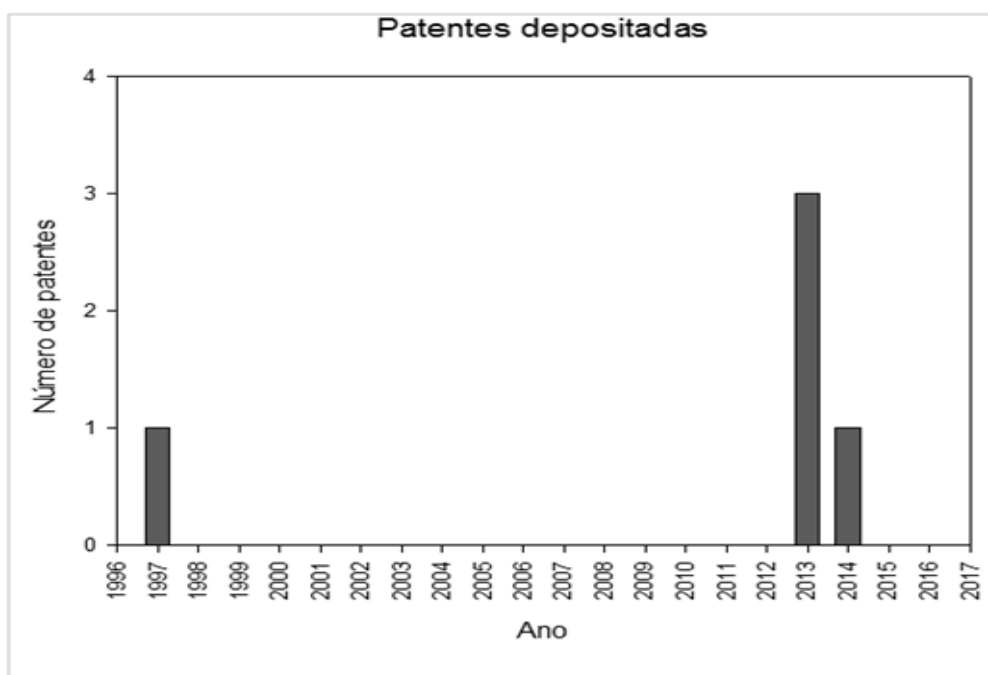


Figura 25: Evolução anual das patentes relacionadas à produção de 2.3-BDO por *P. polymyxa*, usando glicose como substrato.

É possível perceber, na Figura 25, a ausência de patentes em um intervalo de tempo considerável, começando em 1998 e se estendendo até 2012. Essa configuração é, provavelmente, resultante do desinteresse da produção de 2,3-BDO por parte tanto da indústria quanto da academia, assim como da pouca importância ou desvalorização, até então, da rota biotecnológica de produção desse diol. No entanto, a partir da segunda década dos anos 2000, essa realidade foi modificada, possivelmente, em razão do aumento das preocupações ambientais e econômicas relacionadas ao uso das tradicionais fontes de energia. A busca por alternativas energéticas, capazes de aliar produtividade e lucro, com o mínimo de interferência ambiental possível, pode justificar o surgimento de novas tecnologias nesse período, dentro do qual estão inseridas os 80,0% da produção técnica (4 patentes) encontrada para o 2,3-BDO, a glicose e *P. polymyxa*. A ausência recorrente nos últimos três anos de patentes sobre o assunto sugere, novamente, uma oportunidade tecnológica de estudo, a partir do qual o desenvolvimento de um processo eficiente de geração de 2,3-BDO pode resultar em vantagens econômicas e produtivas ao detentor dessa tecnologia.

Dentre as cinco patentes verificadas, quatro pertencem à China e uma ao Japão. Esse resultado evidencia a supremacia asiática sobre essa tecnologia, justificando a necessidade de o Brasil desenvolver um estudo mais aprofundado na área, visto que o interesse na produção de 2,3-BDO é cada vez maior, em razão de sua versatilidade de aplicações e seu aproveitamento em diferentes segmentos industriais (JI *et al.*, 2011). Além disso, o uso de glicerina loira brasileira para a produção de 2,3-BDO, resultante da indústria de biodiesel, é uma ação econômica e ambientalmente interessante ao país, à medida que gera valor agregado a um material residual, antes considerado um problema no contexto da disposição de resíduos.

A responsabilidade pelas produções técnico-científicas está, normalmente, atrelada a indústrias ou centros de pesquisa, de universidades e do Governo. No caso das cinco patentes em estudo, a tecnologia está, basicamente, sob controle dos institutos de ciência e tecnologia das universidades, como pode ser observado na Figura 26.

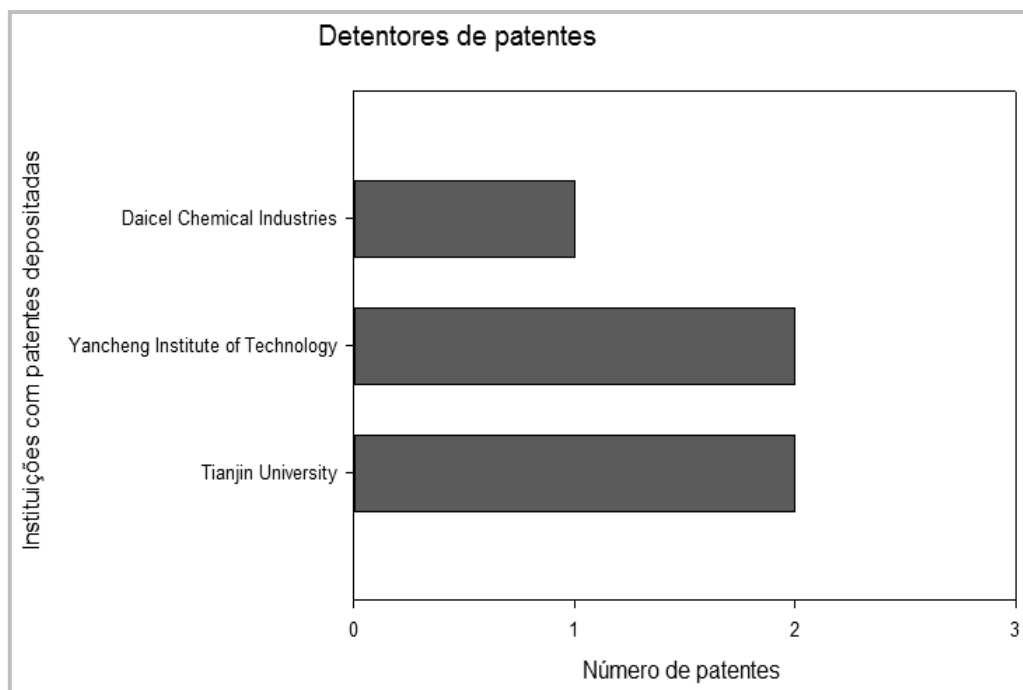


Figura 26: Detentores tecnológicos das patentes avaliadas neste estudo.

De acordo com a Figura 26, 80,0% da produção investigada pertence às universidades chinesas, cujos trabalhos científicos na área de moléculas bifuncionais, obtidas de resíduos agroindustriais e com potencial aplicação no setor energético nacional, são considerados referência mundial no contexto da investigação técnica. Isso pode ser comprovado por estudos prévios de produção científica, na qual a supremacia chinesa é perceptível. Os 20,0% restantes está sob domínio industrial japonês, demonstrando seu interesse mercadológico sobre o 2,3-BDO resultante de processos biotecnológicos. Essa realidade era esperada para o Japão, uma vez que é um dos países que mais aplicam ciência na indústria, investindo cerca de 3,4% de seu PIB em pesquisa e desenvolvimento, segundo informações apresentadas na Revista Exame, da editora Abril, em setembro de 2016 (EXAME, 2016). Conseqüentemente, as inovações não são dependentes, quase exclusivamente, da academia, como ocorre no Brasil, em que ciência e indústria apresentam pouca interação. Apesar de, nos últimos anos, o país ter tentado diminuir essa distância, por meio da regulamentação da Lei de Inovação, a qual visa aproximar as empresas da realidade tecnológica, por meio de cooperações entre as Instituições de Ciência e Tecnologia (ICTs) e o setor produtivo nacional. É esperada,

dessa maneira, a ampliação da capacidade tecnológica do Brasil, pelo favorecimento de parcerias que favoreçam a pesquisa e o desenvolvimento nacionais (SANTOS, 2014b).

As patentes encontradas foram, ainda, classificadas de acordo com a *International Patent Classification (IPC)*, como ilustrada na Figura 27.

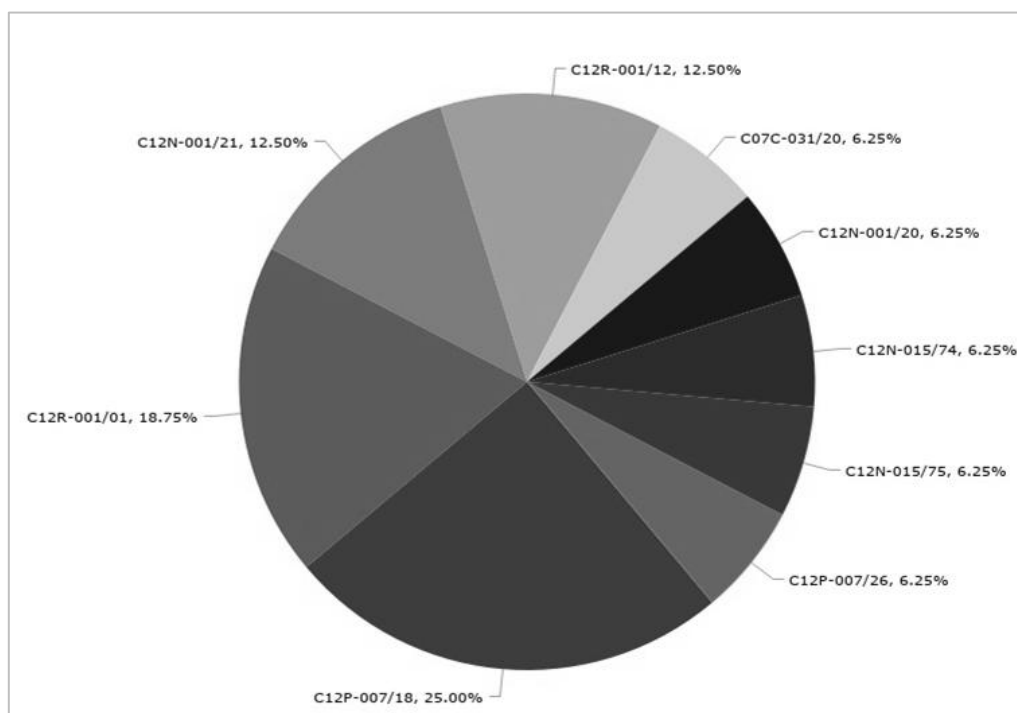


Figura 27: Classificação Internacional de Patentes para as patentes selecionadas na prospecção tecnológica em estudo. *Fonte: Orbit.*

Conforme apresentada na Figura 27, a classificação internacional das patentes é caracterizada por um sistema de símbolos (letras e números) que refletem uma hierarquia de linguagem, na qual cada conjunto de caracteres corresponde a uma determinada área tecnológica. A separação das produções por assunto e abrangência facilita sua busca, além de favorecer o agrupamento de trabalhos por similaridade e relevância. A Figura 28 ilustra cada um dos níveis classificatórios desse sistema, bem como a forma como são categorizados.

Classificação Geral		
+	A	HUMAN NECESSITIES
+	B	PERFORMING OPERATIONS; TRANSPORTING
+	C	CHEMISTRY; METALLURGY
+	D	TEXTILES; PAPER
+	E	FIXED CONSTRUCTIONS
+	F	MECHANICAL ENGINEERING; LIGHTING; HEATING; WEAPONS; BLASTING
+	G	PHYSICS
+	H	ELECTRICITY

Classificação categorizada		
-	A	HUMAN NECESSITIES
		AGRICULTURE
D	+	A01 AGRICULTURE; FORESTRY; ANIMAL HUSBANDRY; HUNTING; TRAPPING; FISHING
		FOODSTUFFS; TOBACCO
-	A21	BAKING; EQUIPMENT FOR MAKING OR PROCESSING DOUGHS; DOUGHS FOR BAKING [2006.01]
-	A21B	BAKERS' OVENS; MACHINES OR EQUIPMENT FOR BAKING (domestic baking equipment A47J 37/00; combustion apparatus F23; domestic stoves or ranges being wholly or partly ovens F24B, F24C)
-	A21B 1/00	Bakers' ovens [2006.01]
-	A21B 1/02	• characterised by the heating arrangements [2006.01]
	A21B 1/04	•• Ovens heated by fire before baking only [2006.01]
-	A21B 1/06	•• Ovens heated by radiators [2006.01]
	A21B 1/08	••• by steam-heated radiators [2006.01]
	A21B 1/10	••• by radiators heated by fluids other than steam [2006.01]
	A21B 1/14	••• Arrangement of radiators [2006.01]
	A21B 1/22	••• by electric radiators (A21B 2/00 takes precedence; electric heating elements H05B) [2006.01]

Figura 28: Níveis hierárquicos da IPC – *International Patent Classification*.

Fonte: WIPO (<http://www.wipo.int/portal/en/>)

Com base na Figura 28, os trabalhos envolvendo o 2,3-BDO, a glicose e *P. polymyxa* fizeram referência aos níveis C07C, C12N, C12P e C12R. O significado de cada código foi apresentado a seguir:

C - Química; Metalurgia.
 07 - Química Orgânica.
 C - Componentes Acíclicos ou Carbocíclicos.

C - Química; Metalurgia.
 12 – Bioquímica; Cerveja; *Spirits*; Vinho; Vinagre; Microbiologia; Enzimologia; Mutação ou Engenharia Genética.
 N – Micro-organismos ou Enzimas; Composições dessas.

C - Química; Metalurgia.

12 – Bioquímica; Cerveja; *Spirits*; Vinho; Vinagre; Microbiologia; Enzimologia; Mutação ou Engenharia Genética.

P – Fermentação ou Procedimentos de utilização de enzimas para síntese de composto químico desejado ou Composição ou Separação de isômeros ópticos de uma mistura racêmica.

C - Química; Metalurgia.

12 – Bioquímica; Cerveja; *Spirits*; Vinho; Vinagre; Microbiologia; Enzimologia; Mutação ou Engenharia Genética.

R – Sistema de indexação associado às subclasses C12C-C12Q, relacionado a micro-organismos.

Cerca de 25,0% das produções selecionadas pertencem a estudos de fermentação e separação de isômeros (Figura 27). Essa informação possui grande relevância, uma vez que pode ser utilizada para guiar futuras buscas de levantamento tecnológico relacionadas ao 2,3-BDO. É possível, dessa maneira, o acesso à informação de produções correlacionadas, cujo aproveitamento pode ser viável a um determinado estudo.

Diante dos resultados reportados, neste estudo, é possível perceber que o Brasil se encontra em uma posição de “atraso tecnológico”, em se tratando da produção de 2,3-BDO, por rota biotecnológica segura e usando fontes residuais de carbono, com destaque ao glicerol da indústria de biodiesel, uma vez que não apresenta nenhum depósito de patente nacional. Essa realidade é reflexo da desvalorização em pesquisa e desenvolvimento, por parte, sobretudo, do Governo, embora o país tenha passado a incluir, explicitamente, a promoção da ciência em seus objetivos políticos, a partir de 1990 (VIOTTI, 2008). De toda maneira, é preciso que os incentivos sejam oferecidos continuamente e que a relação empresa-ciência seja ainda mais estimulada e promovida, a fim de que o país consiga, de fato, se desenvolver tecnologicamente e, como consequência, alcançar o sucesso econômico advindo dessa relação.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

Por meio deste trabalho, foi possível verificar a eficiência de substratos alternativos como fontes de carbono e energia para a síntese de *levo*-2,3-BDO por *P. polymyxa* PM 3605, especialmente, em ensaios fermentativos conduzidos em frascos agitados. Além disso, por meio de testes preliminares em biorreator, foi possível conhecer previamente como o comportamento metabólico microbiano se relaciona com os parâmetros fermentativos aeração, agitação e pH, de modo a garantir uma produção eficiente de 2,3-BDO.

De maneira geral, as seguintes constatações puderam ser feitas:

-Em termos produtivos, o extrato de levedura do LaBiM não contribuiu para um rendimento satisfatório de 2,3-BDO. O glicerol, por sua vez, apresentou resultados interessantes enquanto substituinte da glicose em ensaios em frascos agitados;

-A concentração inicial de inóculo selecionada foi de 10,0 % (v/v) ($DO_{600nm} = 0,5$ e concentração em massa celular seca de $0,44 \text{ g.L}^{-1}$ - pré-inóculo crescido em glicose - e $0,30 \text{ g.L}^{-1}$ - pré-inóculo crescido em glicerol - ver Anexo I), uma vez que garantiu melhores resultados para o rendimento e produção de 2,3-BDO, bem como para a assimilação de carbono;

-O *levo*-2,3-BDO produzido a partir de glicerol sofreu isomerismo, tanto nos ensaios em frascos agitados, quanto em biorreator. Esse fenômeno consistiu em uma estratégia metabólica de alívio de estresse por parte de *P. polymyxa* PM 3605, em que a forma *meso*-2,3-BDO, de menor toxicidade às células, foi favorecida;

-*P. polymyxa* PM 3605 foi considerado um micro-organismo com elevada capacidade de assimilação de glicerol em frascos agitados, o que resultou em um rendimento e uma produtividade de 2,3-BDO considerados relativamente superiores aos reportados na literatura para outras linhagens e espécies microbianas;

-A glicerina loira, principal forma residual do glicerol, foi eficientemente assimilada por *P. polymyxa* PM 3605. Um rendimento de $0,4 \text{ g.g}^{-1}$ foi alcançado para uma concentração inicial de $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol presente na glicerina loira, em frascos agitados. Esse resultado foi considerado promissor, uma vez que rendimentos similares foram alcançados com glicose comercial;

-A glicerina com 10,0 % (v/v) de sebo foi selecionada como fonte de glicerol por uma questão ambiental e econômica, de valorização da forma residual menos pura, uma vez que seus parâmetros produtivos não apresentaram grandes diferenças com os da glicerina sem sebo;

-A concentração inicial de glicerol selecionada foi de $50,0 \text{ g.L}^{-1}$. A escolha foi baseada no custo-benefício do processo, em termos de substrato demandado para a produção de 2,3-BDO. Além disso, por se tratar de um resíduo, a presença de impurezas foi menor nessa condição. A produção alcançada foi de $14,5 \text{ g.L}^{-1}$ de 2,3-BDO, com rendimento de $0,37 \text{ g.g}^{-1}_{\text{substrato}}$, em frascos agitados;

-O efeito do melaço residual de cana-de-açúcar usado como co-substrato foi considerado positivo junto à produção de 2,3-BDO. A concentração de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de melaço foi adotada também com base no custo-benefício do processo. O meio contendo $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol residual e $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de melaço apresentou uma produção de 2,3-BDO e uma assimilação de carbono cerca de 30,0% maior que o meio sem adição do co-substrato: $18,9 \text{ g.L}^{-1}$ de 2,3-BDO foram geradas para um consumo de 97,5% de glicerol;

-Além de 2,3-BDO, os seguintes ácidos orgânicos foram produzidos: succínico, acético, láctico e fórmico, em frascos agitados e em biorreator. Todos esses compostos fazem parte da rota metabólica do glicerol, em que, dependendo da disponibilidade de oxigênio e do pH no meio fermentativo, o carbono pode ser direcionado para uma determinada via de maneira preferencial;

-Os testes preliminares em biorreator usando glicerol residual ajudaram a entender como a disponibilidade de oxigênio e o pH influenciam na produção de 2,3-BDO, bem como na seletividade da forma *levo*, em detrimento da forma *meso* e dos ácidos orgânicos. Com isso, a otimização dos parâmetros fermentativos foi considerada

necessária e crucial para tornar o bioprocesso em questão viável do ponto de vista produtivo e econômico;

-A presença de EPS em quantidades visualmente identificáveis não foi verificada neste estudo, uma vez que se trabalhou com glicerol e melão (majoritariamente formado por sacarose) a 37°C;

-O levantamento tecnológico realizado para o referido processo evidenciou a oportunidade de estudo científico e o nível de inovação deste trabalho, uma vez que não foram encontradas patentes para o processo envolvendo glicerol, *P. polymyxa* e 2,3-BDO. Além disso, revelou o domínio asiático sobre a tecnologia de 2,3-BDO, bem como o “atraso tecnológico brasileiro”, em se tratando do uso de bactérias GRAS para a produção de biomoléculas de interesse industrial;

Portanto, diante do exposto, este trabalho pode ser considerado promissor no contexto produtivo de 2,3-BDO, uma vez que permitiu o conhecimento do metabolismo de um micro-organismo GRAS para a produção satisfatória de 2,3-BDO em frascos agitados usando glicerol e melão residuais como substrato e co-substrato, respectivamente. Além disso, consistiu em uma tecnologia ainda pouco dominada pelo Brasil, o que favorece sua investigação ainda mais acurada, de modo que possa ser desenvolvida, e, conseqüentemente, resulte em vantagens econômicas ao país. Por fim, com a otimização das condições operacionais do sistema (pH, agitação e aeração), será esperada uma produção de 2,3-BDO igualmente eficiente em biorreator, de modo que esse processo possa ser aplicado em escala industrial no futuro.

6.2. Sugestões

Como sugestão para trabalhos futuros, a otimização dos parâmetros fermentativos pH, aeração e agitação, em biorreator, deve ser realizada, a fim de se estabelecer as condições que garantam uma produção eficiente de 2,3-BDO, do ponto de vista econômico e produtivo.

7. ANEXOS

7.1. Anexo I: Curvas-padrão de massa celular seca

As curvas de calibração que correlacionam a DO_{600nm} com a concentração celular de *P. polymyxa* PM 3605, em termos de massa celular seca, dada em $g.L^{-1}$, foram estabelecidas para duas condições: pré-inóculo crescido em glicose e pré-inóculo crescido em glicerol. A Figura 29 ilustra essas curvas, juntamente com as equações de reta que as representam matematicamente.

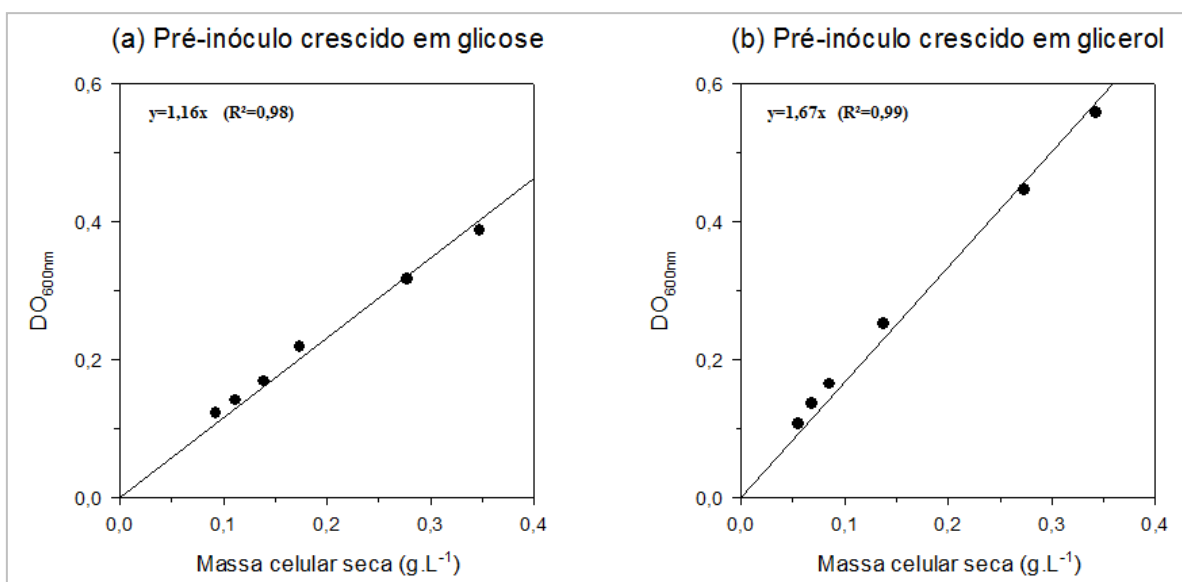


Figura 29: Curvas-padrão de massa celular seca ($g.L^{-1}$) de *P. polymyxa* PM 3605, a $37^{\circ}C$ e 200 rpm: (a) meio YPD com $20,0 g.L^{-1}$ de glicose comercial – meio de pré-inóculo para ensaios em frascos agitados; (b) meio base da literatura com $20,0 g.L^{-1}$ de glicerol residual – meio de pré-inóculo para ensaios em biorreator.

Para a determinação das curvas acima, os experimentos foram conduzidos em duplicata biológica. Os pontos experimentais apresentados correspondem às médias encontradas a partir da duplicata. O desvio-padrão não foi representado nestas curvas.

7.2. Anexo II: Composição do melaço residual

A composição do melaço residual, usado como co-substrato neste estudo, em termos de seus açúcares componentes, foi representada na Tabela 12 abaixo.

Tabela 12: Composição do melaço de cana-de-açúcar usado neste trabalho, em termos de açúcares componentes.

Açúcar	%
Sacarose	75,5
Glicose	12,9
Frutose	11,6

O melaço de cana-de-açúcar é formado majoritariamente por sacarose, um açúcar fermentescível bastante utilizado em processos biológicos de síntese de biomoléculas de interesse industrial, em razão de sua relativa facilidade de assimilação microbiana e sua disponibilidade na natureza.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLAKHA, N.; YAZDANI, S. S. **Efficient production of (R,R)-2,3-butanediol from cellulosic hydrolysate using *Paenibacillus polymyxa* ICGEB2008.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 42, p. 21–28, 2015.

AFSCHAR, A. S.; BELLGARDT, K. H.; VAZ ROSSELL, C. E.; CZOK, A.; SCHALLER, K. **The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 34, p. 582-585, 1991.

AGUIRRE-BASTOS, C.; GUPTA, P. M. **Science, Technology and Innovation Policies in Latin America: Do They Work?** Interciência, Caracas, v. 34, n. 12, p. 865-872, 2009.

ALVES, F. **Modelagem e simulação de biorreator operando com fungos *Trametes versicolor* para produção de enzima lacase.** Dissertação de mestrado. São Caetano do Sul, 2010.

AMANULLAH, A.; BUCKLAND, B. C.; NIENOW, A.W. **Mixing in the fermentation and cell culture industries.** In: Paul, E.L., Atiemo-Obeng, V.A., Kresta, S.M. (Eds.), Handbook of Industrial Mixing. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, p. 1071– 1170, 2004.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia.** São Paulo: Fermentec, p.448, 2005.

ANITHA, M.; KAMARUDIN, S. K.; KOFLI, N. T. **The potential of glycerol as a value-added commodity.** Chemical Engineering Journal, v. 295, p. 119-130, 2016.

ANVARI, M.; PAHLAVANZADEH, H.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; KHAYATI, G. **In situ recovery of 2,3- butanediol from fermentation by liquid–liquid extraction.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.36, p.313–317, 2009.

ANVARI, M.; MOTLAGH, M. R. S. **Enhancement of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* PTCC 1402.** Journal of Biomedicine and Biotechnology, v.2011, p. 1-7, 2011.

ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, R.; MAUGERI FILHO, F.; **Fermentação Alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de parâmetros.** Livro de Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000.

BARBOSA, A. M.; DA CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; DA SILVA, M. L. C. **Production and Applications of Fungal Exopolysaccharides.** Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42, jan./jun. 2004.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. **The 'buttery' attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond.** International Journal of Food Microbiology v.96, p.235–252, 2004.

BERBERT-MOLINA, M. A. **Avaliação de caldo de cana-de-açúcar para obtenção de 2,3-butanodiol.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 1995.

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, p.200, 2016.

BIEBL, H.; MARTEN, S. **Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol: use of cosubstrates.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.44, p. 15–19, 1995.

BLOMQVIST, K.; NIKKOLA, M.; LEHTOVAARA, P.; SUIHKO, M. L.; AIRAKSINEN, U.; STRABY, K. B. *et al.* **Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*.** Journal of Bacteriology, v.175, p.1392–1404, 1993.

BROCK, T. D.; Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. **Biology of microorganisms.** New Jersey: Prentice Hall, Inc., 7. Ed. 1994.

BRYN, K.; ULSTRUP, J. C.; STORMER, F. C. **Effect of acetate upon the formation of acetoin in *Klebsiella* and *Enterobacter* and its possible practical application in a rapid Voges- Proskauer test.** Applied Microbiology, v.25, p.511–512, 1973.

CALLOW, D. S.; PIRT, S. J. **Developments in apparatus for the culture of microorganisms: design features of a laboratory two stage continuous flow culture apparatus.** Journal Applied of Microbiology, v.5, p. 12-22, 1961.

CAO, N. G.; XIA, Y. K.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. **Production of 2,3-butanediol from pretreated corn cob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of fungal cellulose.** Applied of Biochemistry and Biotechnology, v.63/65, p.129–139, 1997.

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

CHANDEL, A. K.; SINGH, O. V.; VENKATESWAR RAO, L. **Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: state-of-the-art.** In: Singh OV, Harvey SP, editors. Sustainable biotechnology. Amsterdam: Springer Netherlands; p. 63–81, 2010.

CHOI, S.; YOON, J.; KIM, K.; LEE, J. Y.; KIM, C.-H. **SAO network analysis of patents for technology trends identification: a case study of polymer electrolyte membrane technology in proton exchange membrane fuel cells.** Scientometrics, v. 88, p. 863–883, 2011.

COLIN, T.; BORIES, A.; LAVIGNE, C.; MOULIN, G. **Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*.** Current Microbiology, v. 43, p. 238–243, 2001.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; DA SILVA, R. **Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas.** Semana: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, 2007.

DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. **Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology.** Biotechnology Advances, v. 27, p. 30–39, 2009.

DAI, J-J.; CHENG, J-S.; LIANG, Y-Q; JIANG, T.; YUAN, Y-J. **Regulation of extracellular oxireduction potential enhanced (R,R)-2,3-butanediol production by *Paenibacillus polymyxa* CJX518.** Bioresource Technology, v. 167, p. 433-440, 2014

DE MAS C.; JANSEN, N. B.; TSAO, G. T. **Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*.** Biotechnology and Bioengineering, v. 31, p.366–377, 1988.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. **Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering.** Biotechnology and Bioengineering, v. 94, p. 821–829, 2006.

ĐURIŠIĆ-MLADENOVIĆ, N.; ŠKRBIĆ, B. D.; ZABANIOTOU, A. **Chemometric interpretation of different biomass gasification processes based on the syngas quality: assessment of crude glycerol co-gasification with lignocellulosic biomass.** Renew Sustain Energy Rev v. 59, p. 649–661, 2016.

ERNST, H. **Patent applications and subsequent changes of performance: evidence from time-series cross-section analyses on the firm level.** Research Policy, v.30, p. 143–157, 2001.

ERNST, H. **Patent information for strategic technology management.** World Patent Information, v.25, p. 233–242, 2003.

EXAME, 2016. **Economia: 15 países que mais investem em pesquisa (e o Brasil em 36°).** Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/economia/15-paises-que-mais-investem-em-pesquisa-e-o-brasil-em-36o/>>. Acessado em 13 de agosto de 2017.

FACCIOTTI, M. C. R. **Fermentação Contínua.** In: *Schmidell et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.* São Paulo: Edgard Blücher, p.223-246, 2001.

FAVERI, D. D.; TORRE, P.; MOLINARI, F.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. **Carbon material balances and bioenergetics of 2,3-butanediol bio-oxidation by *Acetobacter hansenii*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 708–719, 2003.

FERNANDES, A. P. F. V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-ATPase da membrana plasmática.** Dissertação de Doutorado, Lisboa, 2008.

FERREIRA, R. J. A. **Tecnologia de produção de álcool: fermentação alcoólica.** Rio de Janeiro, p.73 (apostila), 2008.

FLICKINGER, M. C. **Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates into liquid fuels: how far have we come?** *Biotechnology and Bioengineering*, v.22, p.27–48, 1980.

FULMER, E. I.; CHRISTENSEN, L. M.; KENDALL, A. R. **Production of 2,3-butylene glycol by fermentation.** *Industrial and Engineering Chemistry*, v.25, p.798–800, 1933.

GAO, J.; XU, H.; LI, Q.; FENG, X.; LI, S. **Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce R, R-2,3-butanediol.** *Bioresource Technology*, v.101, p.7076–7082, 2010.

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

GARCIA, A. D. **Produção fermentativa de 2,3-butanodiol a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.** Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena, 2006.

GEUM, Y.; JEON, J.; SEOL, H. **Identifying technological opportunities using the novelty detection technique: a case of laser technology in semiconductor manufacturing.** *Technology Analysis and Strategic Management*, v.25 (1), p.1–22, 2013.

GRAND VIEW RESEARCH. **Global glycerol market from biodiesel, fatty acids, fatty alcohols for personal care, alkyd resins, polyether polyols applications, downstream opportunities is expected to reach USD 2.52 billion By 2020**, Inc., n.d. Disponível em <<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-glycerol-market>>. Acessado em 04 de abril de 2017.

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

HÄBLER, T.; SCHIEDER, D.; PFALLER, R.; FAULSTICH, M.; SIEBER, V. **Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365.** *Bioresource Technology*, v. 124, p. 237–244, 2012.

HE, Q. S.; McNUTT, J.; YANG, J. **Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 71, p. 63–76, 2017.

HEDTKE, D. **Glycerine processing.** In Y.H. Hui (Ed.), *Bailey's industrial oil & fat products*, v. 5: Industrial and consumer nonedible products from oils and fats, (p. 275–308). New York: Wiley, 1996.

HUANG, C. F.; JIANG, Y. F.; GUO, G. L.; HWANG, W. S. **Method of 2,3-butanediol production from glycerol and acid-pretreated rice straw hydrolysate by**

newly isolated strains: pre-evaluation as an integrated biorefinery process. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 446–453, 2013.

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

JIMÉNEZ, A. M.; BORJA, R.; MARTÍN, A. **A comparative kinetic evaluation of the anaerobic digestion of untreated molasses and molasses previously fermented with *Penicillium decumbens* in batch reactors.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 18(2), p. 121–132, 2004.

JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. **The glycerin glut: options for the value-added conversion of grude glycerol resulting from biodiesel production.** *Environmental Progress - Wiley InterScience*, v.26, n. 4, 2007.

JOUNG, J.; KIM, K. **Detecting technological opportunities using technical keywords from patents: a case of electrochemical glucose biosensor.** *Proceedings of 12th ICMIT International Conference*, Singapore, 2015.

JOUNG, J.; KIM, K. **Monitoring emerging technologies for technology planning using technical keyword based analysis from patent data.** *Technological Forecasting & Social Change* 114, p. 281–292, 2017.

JUNG, M. Y.; PARK, B. S.; LEE, J.; OH, M. K. **Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production.** *Bioresource Technology*. v. 139, p. 21-27, 2013.

KIM, Y. G.; SUH, J.H., PARK, S.C. **Visualization of patent analysis for emerging technology.** *Expert Systems with Applications*, v.34, p. 1804–1812, 2008.

KIM, D-K.; PARK, J. M.; SONG, H.; CHANG, Y. K. **Kinetic modeling of substrate and product inhibition for 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 114, p. 94-100, 2016.

KÖPKE, M. et al. **2,3-Butanediol Production By Acetogenic Bacteria, an Alternative Route To Chemical Synthesis, Using Industrial Waste Gas.** *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 15, p. 5467–5475, 2011.

KOUTINAS, A.A.; VLYSIDIS, A.; PLEISSNER, D.; KOPSAHELIS, N.; GARCIA, I.; KOOKOS, I.; PAPANIKOLAOU, S.; KWAN, T. H.; LIN, C. S. K. **Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers.** *Chemical Society Reviews*, v. 43, p. 2587–2627, 2014.

LAUBE, V. M.; GROLEAU, D.; MARTIN, S. M. **2,3-Butanediol production from xylose and other hemicellulosic components by *Bacillus polymyxa*.** *Biotechnology Letters*, v.6, p.257–262, 1984.

LEE, I. Y.; SEO, W. T.; KIM, G. J.; KIM, M. K.; AHN, S. G.; KWON, G. S.; PARK, Y. H. **Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 16, p. 71–75, 1997.

- LEE, P. C.; LEE, W. G.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. **Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 72, p.41–48, 2001.
- LEE, C.; JEON, J.; PARK, Y. **Monitoring trends of technological changes based on the dynamic patent lattice: a modified formal concept analysis approach.** *Technological Forecasting and Social Change*, v.78 (4), p. 690–702, 2011.
- LI, Z. J.; JIAN, J.; WEI, X. X.; SHEN, X. W.; CHEN, G. Q. **Microbial production of meso-2,3-butanediol by metabolically engineered *Escherichia coli* under low oxygen condition.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.87, p.2001-2009, 2010.
- LI, Y.; ZHU J.; WU, Y. *et al.* **Reactive extraction of 2,3-butanediol from fermentation broth.** *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 30, p.154–259, 2013.
- LI, L.; WANG, Y.; WANG, K.; LI, K.; MA, C.; XU, P. **Genome sequence of thermophilic *Bacillus licheniformis* strain 3F-3, an efficient pentose-utilization producer of 2,3-butanediol.** *Genome Announcements* 2, v.2(3), p. 614-615, 2014.
- LONG, S. K.; PATRICK, R. **The present status of the 2,3-butylene glycol fermentation.** *Advances in Applied Microbiology*, v.5, p.135–155, 1963.
- LOURENCO, W. C. F.; MACRET, R.; CIELO, J. E. **Process for the purification of crude glycerol.** Google Patents, 2011.
- MA, C.; WANG, A.; QIN, J. *et al.* **Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.82(1), p.49–57, 2009.
- MADDOX, I. S. **Microbial production of 2,3-butanediol.** In: Rehm HJ, Reed G, Pühler A, Stadler P, editors. *Biotechnology*. 2nd Edition. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, p. 269–291, 1996.
- MACEDO, M. G.; LACROIX, C.; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. **Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate.** *International Dairy Journal*, v. 12, p. 419-426, 2002.
- MAGEE, R. L.; KOSARIC, N. **The microbial production of 2,3-butanediol.** *Advances in Applied Microbiology*, v.32, p.89-161, 1987.
- MALLONEE, D. H.; SPECKMAN, R. A. **Development of a Mutant Strain of *Bacillus polymyxa* Showing Enhanced Production of 2,3-Butanediol.** *Applied and environmental microbiology*, v. 54, n. 1, p. 168–171, 1988.
- MARTINEZ, A. M. R.; MANZANO, S. S.; PAES, A. M.; SERRA, M. T.; VIDAL, D. R.; MAZORRA, V. E. S.; GALAN, M. L.; SORIA, F. G-O.; MORALES, V. R.; MARTÍN, A. R. **Method for producing 2,3-butanediol using improved strains of *raoultella planticola*.** Patente EP2876155 A2, 2015.

MARWOTO B.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. **Enhancement of (R, R)-2,3-butanediol production from xylose by *Paenibacillus polymyxa* at elevated temperatures.** *Biotechnology Letters*, v. 24, p.109–114, 2002.

McCALL, K B.; GEORGI, C. E. **The production of 2,3-butanediol by fermentation of sugar beet molasses.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.2, p.355–359, 1954.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil.** São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p.141-178, 1980.

METSOVITI, M.; PARASKEVAIDI, K.; KOUTINAS, A.; ZENG, A. P.; PAPANIKOLAOU, S. **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, p. 1872–1882, 2012a.

METSOVITI, M.; PARAMITHIOTIS, S.; DROSINOS, E. H.; PANAYOTOU, M. G.; NYCHAS, G. J.; ZENG, G. A. P.; PAPANIKOLOU, S. **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, p. 57–68, 2012b.

MOTIWANI, M.; SETH, R.; DAGINAWALA, H. F.; KHANNA, P. **Microbial production of 2,3-butanediol from water hyacinth.** *Bioresource Technology*, v.44, p.187–195, 1993.

MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D. J.; WANG, W.; XIU, Z. L. **Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations.** *Biotechnology Letters*, v.28, p.1755–1759, 2006.

NAKASHIMADA, Y.; MARWOTO, B.; KAKIZONO, T. *et al.* **Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.90, p.661–664,2000.

NAN, H.; SEO, S. O.; OH, E. J. *et al.* **2,3-Butanediol production from cellobiose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, p.5757–5764, 2014.

NILEGAONKAR, S. S.; BHOSALE, S. B.; DANDAGE, C. N.; KAPADI, A. H. **Potential of *Bacillus licheniformis* for the production of 2,3-butanediol.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 82, n. 4, p. 408-410, 1996.

NOH, H.; JO, Y.; LEE, S. **Keyword selection and processing strategy for applying text mining to patent analysis.** *Expert Systems with Applications*, v.42, p. 4348–4360, 2015.

NUNES, D. S. S; COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L. **Principles aspects of 1,3-butadiene polymerization.** *Polímeros*, v.15, nº4. São Carlos, 2005.

OLIVEIRA, R. R.; NICHOLSON, W. L. **Synthetic operon for (R,R)-2,3- butanediol production in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, p.719–728, 2016.

OKONKWO , C. C.; UJOR, V.; EZEJI, T. C. **Investigation of relationship between 2,3-butanediol toxicity and production during growth of *Paenibacillus polymyxa*.** New Biotechnology, v. 34, p. 23-32, 2017

PAGLIARO, M.; CIRIMINNA, R.; KIMURA, H.; ROSSI, M.; PINA, C. D. **From Glycerol to Value-Added Products.** Angewandte Chemie International Edition, v. 46, p. 4434 – 4440, 2007.

PEREGO, P.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, A.; CANEPA, P. **2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues.** Bioprocess Engineering, v.23, p.613–620, 2000.

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

PETRINI, P.; DE PONTI, S.; FAREA, S.; TANZI, M. C. **Polyurethane-maleamides for cardiovascular applications: synthesis and properties.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 10, p. 711–714, 1999.

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

PETROV, K.; PETROVA, P. **Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 87, p. 943–9, 2010.

PIRT, S. J. **Principles of microbe and cell cultivation.** AIChE Journal, v. 22, issue 3, 1975.

PRIYA, A.; DUREJA, P.; TALUKDAR, P.; RATHI, R.; LAL, B.; SARMA, P. M. **Microbiol 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.

QIN, J. Y.; XIAO, Z. J.; MA, C. Q.; XIE, N. Z.; LIU, P. H.; XU, P. **Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate.** Chinese Journal Chemical Engineer, v. 14, p. 132–136, 2006.

QURESHI, N.; MEAGHER, M. M.; HUTKINS, R. W. **Recovery of 2,3-butanediol by vacuum membrane distillation.** Separation Science and Technology, v. 29, p. 1733–1748, 1994.

RADOŠ, D.; CARVALHO, A. L.; WIESCHALKA, S. *et al.* **Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of 2,3-butanediol.** *Microbial Cell Factories*, v. 14, p. 171, 2015.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A. *et al.* **The path forward for biofuels and biomaterials.** *Science*, v. 311, p. 484–498, 2006.

RAMACHANDRAN, K. B.; HASHIM, M. A.; FERNANDEZ, A. A. **Kinetic study of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 70, p. 235–240, 1990.

RIPOLL, V.; DE VICENTE, G.; MORÁN, B.; ROJAS, A.; SEGARRA, S.; MONTESINOS, A.; TORTAJADA, M.; RAMÓN, D.; LADERO, M.; SANTOS, V. E. **Novel biocatalysts for glycerol conversion into 2,3-butanediol.** *Process Biochemistry*, v. 51, p. 740-748, 2016.

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

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. **Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 52, p. 321–326, 1999.

SANTOS, A. F. **Prospecção e produção de proteases bacterianas por fermentação em estado sólido.** Tese de Doutorado da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Rio de Janeiro, 2014a.

SANTOS, F. L. **O Papel das ICT no Desenvolvimento Tecnológico do Brasil.** In: SANTOS, F. L. (Org.). *Desenvolvimento e Perspectivas da Propriedade Intelectual no Brasil.* Cruz das Almas: EDUFRB, p. 233-254, 2014b.

SIVAKUMAR, A.; SWAMINATHAN, T.; BARADARAJAN, A. **Effect of urea on the production of 2,3-butanediol by *Klebsiella oxytoca*.** *Bioprocess Biosystem Engineer*, v 13, p. 49–50, 1995.

SHAO P.; KUMAR, A. **Recovery of 2,3-butanediol from water by a solvent extraction and pervaporation separation scheme.** *Journal of Membrane Science*, v.329, p.160–168, 2009.

SRIVASTAVA, A. K. **Fed-Batch Microbial Cultivation.** iitd.vlab.co.in,, 2011. Disponível em: <iitd.vlab.co.in/?sub=63&brch=177&sim=649&cnt=1>. Acessado em: 06 de abril de 2017.

STELMACHOWSKI, M.; MARCHWICKA, M.; GRABOWSKA, E.; DIAK, M.; ZALESKA, A. **The photocatalytic conversion of (biodiesel derived) glycerol to hydrogen – a short review and preliminary experimental results Part 1: a review.** *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, v. 17, p. 167–178, 2014.

SUTHERLAND, I. W. **Novel and established applications of microbial polysaccharides.** Trends in Biotechnology, Limerick, v.16, p.41-46, 1998.

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

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

UI, S.; MATSUYAMA, N.; MASUDA, H.; MURAKI, H. **Mechanism for the formation of 2,3- butanediol stereoisomers in *Klebsiella pneumoniae*.** Journal of Fermentation Technology, v. 62, p. 551–559, 1984.

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

VAN HAVEREN, J.; SCOTT, E. L.; SANDERS, J. **Bulk chemicals from biomass.** Biofuels, Bioproducts and Biorefining, v. 2, p. 41–57, 2008.

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

VENKATARAMANAN, K. P.; BOATMAN, J. J.; KURNIAWAN, Y.; TACONI, K. A.; BOTHUN, G. D.; SCHOLZ, C. **Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 93, p. 1325-1335, 2012.

VIOTTI, E. B. **Brasil: de Política de C&T para Política de Inovação? Evolução e Desafios das Políticas Brasileiras de Ciência, Tecnologia e Inovação.** In: BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. CENTRO DE GESTÃO DE ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Avaliação de Políticas de Ciência, Tecnologia e Inovação: Diálogo entre Experiências Internacionais e Brasileiras.** Brasília: CGEE, p. 137-173, 2008.

VOLOCH, M.; JANSEN, N. B.; LADISH, M. R.; TSAO, G. T.; NARAYAN, R.; RODWELL, V. W. **2,3-Butanediol.** In: Blanch HW, Drew S, Wang DIC, editors. Comprehensive biotechnology; the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. Oxford: Pergamon/ Elsevier; p. 933–944, 1985.

WANG, Z. X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. **Glycerol production by microbial fermentation: a review.** Biotechnol Advances, v.19, p.201–223, 2001.

WANG, X.; WANG, X. W.; YIN, M. X.; XIAO, Z. J.; MA, C. Q.; LIN, Z. X.; WANG, P. G.; XU, P. **Production of uridine 50-monophosphate by *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 using a statistically improved biocatalytic process.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 76, p. 321–328, 2007.

WANG, Y.; LI, L.; MA, C.; GAO, C.; TAO, F.; XU, P. **Engineering of cofactor regeneration enhances (2S,3S)-2,3-butanediol production from diacetyl.** Scientific Reports, v. 3, p. 2643, 2013.

WANG, X.; QIU, P.; ZHU, D.; MITKOVA, L.; LEI, M.; PORTER, A.L. **Identification of technology development trends based on subject–action–object analysis: the case of dyesensitized solar cells.** Technological Forecasting and Social Change, v. 98, p. 24–46, 2015.

WEN, Z. **New Uses for Crude Glycerin From Biodiesel Production.** Iowa State University, Center for Crops Utilization Research, 2012.

WERPY, T., PETERSEN, G., ADEN, A., BOZELL, J., HOLLADAY, J., WHITE, J., & MANHEIM, A. **Top value added chemicals from biomass, Volume I: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas.** United States Department of Energy, Energy Efficiency and Renewable Energy, 2004. Disponível em: <<http://www.osti.gov/bridge/purl.cover.jsp?purl=/15008859-s6ri0N/native/>>. Acessado em: 02 de abril de 2017.

WONG, C. L.; HUANG, C. C.; LU, W. B.; CHEN, W. M.; CHANG, J. S. **Producing 2,3-Butanediol from agricultural waste using an indigenous *Klebsiella* sp. Zmd30 strain.** Biochemical Engineering Journal, v. 69, p. 32–40, 2012.

WONG, C. H.; YEN, H. W.; LIN, C. L.; CHANG, J. S. **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.

XIU Z, L.; ZENG, A. P. **Present state and pererspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.78(6), p.917–926, 2008.

YANG, T.; ZHANG, X.; RAO, Z.; GU, S.; XIA, H.; XU, Z. **Optimization and scale-up of 2,3-butanediol production by *Bacillus amyloliquefaciens* B10-127.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, p. 1563-1574, 2012.

YANG, T-W.; RAO, Z-M.; ZHANG, X.; XU, M-J.; XU, Z-H.; YANG, S-T. **Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of co-substrates on 2,3-butanediol production.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, p. 7651–7658, 2013.

Y, B.; SUN, J.; BOMMAREDDY, R. R.; SONG, L.; ZENG, A. P. **Novel (2R, 3R)-2,3-butanediol dehydrogenase from an industrially potential strain *Paenibacillus polymyxa* ATCC 12321.** Applied and Environmental Microbiology, v. 77, p. 4230-4323, 2011.

YU, E. K.; SADDLER, J. N. **Enhanced production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumonia* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid.** Applied and Environmental Microbiology, v.44, p.777–784, 1982.

ZENG, A. P.; BIEBL, H.; DECKWER, W. D. **Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 33, p. 485–489, 1990.

ZHANG, L.; SUN, J. A.; HAO, Y.; ZHU, J.; CHU, J.; WEI, D.; SHEN, Y. **Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.37, p.857–862, 2010.