



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



Produção Biotecnológica de 2,3-Butanodiol a partir de diferentes fontes de carbono

Autor: Caroline Bertolini Agliardi

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Misturini Rossi

Coorientador: MSc. Paulo Roberto Dall Cortivo

Porto Alegre, janeiro de 2018.

Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 2,3-Butanodiol (2,3-BD)	3
2.2 Processos de obtenção de 2,3-BD	4
2.2.1 Utilização de resíduos lignocelulósicos como substrato	5
2.3 Microrganismos produtores de 2,3-BD e rotas metabólicas	6
2.4 Condições operacionais que influenciam a formação de 2,3-BD	10
2.4.1 Suprimento de oxigênio	10
2.4.2 Potencial hidrogeniônico (pH)	11
2.4.3 Temperatura	12
2.4.4 Substratos utilizados e concentração	13
3 Materiais e Métodos	15
3.1 Microrganismo e manutenção	15
3.2 Meios de cultivo utilizados nos ensaios fermentativos	15
3.3 Inóculo e cinéticas de fermentação	17
3.4 Métodos Analíticos	18
3.4.1 Concentração de açúcares e 2,3-BD	18
3.4.2 Medidas de pH	19
3.4.3 Crescimento celular	19
3.5 Cálculo de parâmetros cinéticos e análise estatística dos dados	19
4 Resultados e Discussão	20
4.1 Ensaios de fermentação	20
4.1.1 Ensaios com arabinose	20
4.1.2 Ensaios com arabinose e xilose	22
4.1.3 Ensaios com arabinose, xilose e glicose	24
4.2 Parâmetros cinéticos	27
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	30
6 Referências	31

Agradecimentos

À família, pela paciência, apoio, carinho e amor incondicional.

Ao meu coorientador, doutorando Paulo Roberto Dall Cortivo, pelo incentivo, pelos ensinamentos, presteza e disponibilidade sempre.

À minha orientadora, Dr^a Daniele Misturini Rossi, pela oportunidade, confiança e dedicação.

Aos amigos de graduação pelo companheirismo e disponibilidade.

A todos os integrantes do laboratório BiotecLab, pelo auxílio sempre que precisei.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) pela disponibilização de equipamentos e recursos que possibilitaram a execução deste trabalho.

À UFRGS pela excelência de ensino e a todos os professores que fizeram parte da minha formação.

Resumo

2,3-butanodiol (2,3-BD) apresenta extensa aplicação industrial, podendo ser destinado tanto para processos industriais, tais como nas indústrias de polímeros, de tintas de impressão, de perfumes, de explosivos e de plastificantes, quanto para a obtenção de outros produtos químicos, como metil-etil-cetona, 1,3-butadieno e diacetil. 2,3-BD é, portanto, um importante produto químico e sua produção por via biológica, utilizando fontes de carbono renováveis como matéria-prima é de grande interesse, tendo em vista os atuais problemas político-econômicos do uso do petróleo, bem como a necessidade de implementação de gestão mais sustentável de resíduos. O presente trabalho teve como objetivo investigar a produção biotecnológica de 2,3-butanodiol (2,3-BD) a partir da combinação de diferentes fontes de carbono, simulando as condições presentes em resíduos agroindustriais utilizando a cepa *K. pneumoniae* BLh-1. A utilização de açúcares provenientes desses resíduos representa uma alternativa sustentável e de baixo custo, embora a fermentação das pentoses represente ainda uma barreira tecnológica, justificando a necessidade de pesquisas nesse âmbito. Neste trabalho foram testadas duas diferentes suplementações, um meio de cultivo sintético (MS) e um meio de cultivo complexo (Meio Luria-Bertani - LB), com diferentes combinações de fonte de carbono (arabinose / arabinose + xilose / arabinose + xilose + glicose), totalizando 6 condições teste. Os experimentos foram realizados a 30 °C, 120 rpm e sem controle de pH. Os resultados indicaram que *K. pneumoniae* BLh-1 pode utilizar os açúcares estudados, na seguinte ordem preferencial: glicose>arabinose>xilose. A máxima produção de 2,3-BD foi de 18,74 g.L⁻¹, em 24 horas, resultando em uma produtividade de 0,78 g.L⁻¹.h⁻¹ e uma taxa de conversão de produto a substrato de 0,53 g.g⁻¹. Ácido acético e etanol também foram produzidos em pequenas quantidades. A partir das fontes de carbono utilizadas, a cepa *K. pneumoniae* BLh-1 mostrou-se promissora para a produção de 2,3-BD.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estereoisômeros do 2,3-butanodiol (2,3-BD)	3
Figura 2 - Derivados de 2,3-BD.....	4
Figura 3. Via de fermentação ácido-mista para a produção de 2,3-BD.....	8
Figura 4. Rotas metabólicas de glicose e xilose para a produção de 2,3-BD	9
Figura 5. O efeito do fornecimento de oxigênio no rendimento de subprodutos da fermentação por <i>P. polymyxa</i>	10
Figura 6. Desenho esquemático dos ensaios de fermentação	16
Figura 7. Teste de fermentação com arabinose em meio sintético	21
Figura 8. Teste de fermentação com arabinose em meio LB	21
Figura 9. Teste de fermentação com arabinose + xilose em meio sintético	23
Figura 10. Teste de fermentação com arabinose + xilose em meio LB	24
Figura 11. Teste de fermentação com arabinose + xilose + glicose em meio sintético	25
Figura 12. Teste de fermentação com arabinose + xilose + glicose em meio LB	25

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Produção de diferentes isômeros de 2,3-butanodiol a partir de diferentes espécies bacterianas	7
Tabela 2. Meio ágar-LB	15
Tabela 3. Meio sintético (MS)	17
Tabela 4. Meio LB	17
Tabela 5. Parâmetros de cinética de crescimento, consumo de açúcar e produtividade .	27
Tabela 6 - Produção de 2,3-BD por diferentes espécies bacterianas	28
Tabela 7 – Composição parcial de diferentes hidrolisados obtidos por hidrólise ácida em sua forma original	29

Lista de Abreviaturas e Siglas

2,3-BD – 2,3-butanodiol

D-(-) – isômero dextrogiro

L-(+) – isômero levogiro

α -ALS – α -acetolactato sintase

α -ALD - α -acetolactato desidrogenase

DAR – diacetil redutase

AR – acetoína redutase

LDH – L-/D-lactato desidrogenase

pH – potencial hidrogeniônico

MS – Meio Sintético

LB – Luria-Bertani

$Y_{P/S}$ – conversão de substrato a 2,3-BD

Q_P – produtividade

O_2 – gás oxigênio

DO – densidade ótica

1 Introdução

2,3-Butanodiol (2,3-BD) é um produto de interesse devido a sua extensa aplicabilidade, visto que pode ser utilizado como intermediário da borracha e de diversos polímeros, empregado como anti-congelante, solvente, além de ser empregado na indústria de alimentos e ser um potencial combustível (SYU, 2001).

Diante da escassez de fontes combustíveis fósseis e aumento dos preços do petróleo, a produção de compostos químicos por via biológica e biorrefinarias está recebendo atenção significativa (HATTI-KAUL et al., 2007; JOHN et al., 2007; KAMM e KAMM, 2004; LOPEZ-CONTRERAS et al., 2000; SAHA, 2003; THOMSEN, 2005; VAN HAVEREN et al., 2008; e WILLKE e VORLOP, 2007). A produção de 2,3-BD pela via biotecnológica é uma alternativa interessante já que este é um produto químico com grande potencial de aplicação. Os primeiros estudos da produção de 2,3-BD por microrganismos foram conduzidos por Harden e Walpole utilizando *Klebsiella pneumoniae* (GARG e JAIN, 1995). Entre os microrganismos produtores de 2,3-BD, pode-se citar também as espécies de *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* e *Enterobacter aerogenes* (FRAZER e MCCASKEY, 1991).

A biomassa proveniente de material lignocelulósico é de grande importância e aplicação para produção biotecnológica de 2,3-BD. Esse material passa por processo de hidrólise (ácida ou enzimática), para ser decomposto liberando açúcares fermentescíveis, tais como glicose, xilose e arabinose. As principais fontes de biomassa lignocelulósica são os resíduos da agricultura, indústrias de alimentos e madeireiras, além de fontes como a beterraba, algas, entre outros (HAZEENA et al., 2016; HUANG et al., 2013). O excesso de biomassa a partir de resíduos agroindustriais representa uma fonte energética de baixo custo, não compete com fontes de alimentação humana e animal e, ainda, garante uma gestão mais sustentável dos resíduos.

Um dos principais obstáculos para a produção de 2,3-BD a partir de biomassa lignocelulósica é a fermentação das pentoses. Poucos são os microrganismos fermentadores que metabolizam pentoses. Em contrapartida, *K. pneumoniae* é capaz de utilizar diferentes fontes de carbono para a fermentação, fazendo com que essa espécie seja uma ótima alternativa para a conversão dos açúcares presentes nos hidrolisados celulósicos (YU e SADDLER, 1983).

Deste modo, o objetivo geral desse trabalho consiste em avaliar a produção biotecnológica de 2,3-BD a partir de diferentes meios de cultura, combinando açúcares de cinco e seis carbonos, simulando as condições presentes em resíduos agroindustriais, por *K. pneumoniae* BLh-1.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- ✓ Avaliar a capacidade de consumo de arabinose, xilose e glicose e a combinação dos mesmos pela bactéria em estudo.
- ✓ Quantificar a produção de 2,3-BD e bioprodutos, bem como monitorar a variação de pH durante o processo fermentativo.
- ✓ Testar dois meios distintos de suplementação, verificando as diferenças de crescimento celular e produção de metabólitos.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 2,3-Butanodiol (2,3-BD)

2,3-BD, também conhecido como 2,3-butilenoglicol, 2,3-hidroxibutano, dimetiletileno-glicol e butano-2,3-diol (nomenclatura IUPAC), é um álcool com peso molecular de 90,121 g.mol⁻¹ e fórmula molecular C₄H₁₀O₂. O 2,3-BD pode existir em três formas isoméricas: D-(-)-, L-(+)- e meso- (Figura 1), sendo que a sua forma de apresentação vai depender do microrganismo produtor (JI et al., 2011).

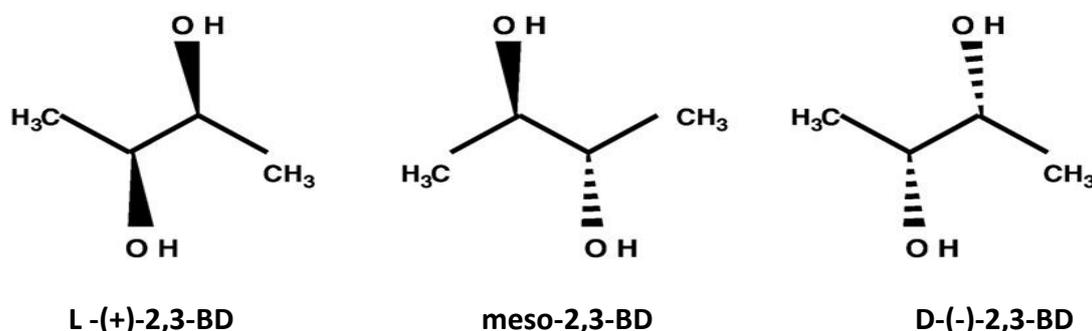


Figura 1 - Estereoisômeros do 2,3-butanodiol (2,3-BD). Adaptado de CELIŃSKA e GRAJEK, 2009.

Os três isômeros possuem altos pontos de ebulição que diferem muito pouco entre si (variando de 177 °C a 182 °C), assim todos são mais elevados que o da água, de modo que uma grande quantidade de água precisa ser evaporada através da destilação para a recuperação do 2,3-BD produzido através de fermentação (VOLOCH et al., 1985). Por outro lado, a forma levoisômero possui baixo ponto de congelamento (-60 °C), possibilitando a empregabilidade como anticongelante (GARG e JAIN, 1995).

2,3-BD é um composto que apresenta a característica de ser biodegradável, tornando-se favorável ao ambiente. Seu calor de combustão de 27198 kJ.kg⁻¹ se compara ao do etanol (29055 kJ.kg⁻¹) e do metanol (22081 kJ.kg⁻¹) (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). A mistura equimolar de etanol e 2,3-BD pode fornecer um valor combinado de aquecimento de 27660 kJ.kg⁻¹, de modo que a presença de etanol não afeta a utilidade de 2,3-BD para esta aplicação (YU e SADDLER, 1982b).

Esse álcool apresenta extensa aplicação industrial, podendo ser destinado para processos industriais, tais como nas indústrias de polímeros, de tintas de impressão, de

perfumes, de explosivos, de plastificantes e como transportadores de fármacos (GARG e JAIN, 1995).

Além disso, o 2,3-BD é também um importante intermediário químico para a obtenção de outros produtos químicos (Figura 2). O produto da desidrogenação de 2,3-BD, o diacetil, pode ser usado como agente aromatizante, sendo altamente valorizado em produtos alimentares por proporcionar sabor amanteigado (BARTOWSKY e HENSCHKE, 2004). A desidratação deste composto resulta em metil-etil-cetona, utilizada como solvente para resinas e vernizes e também como aditivo de combustíveis. Sua esterificação leva à formação de precursores de espumas de poliuretano para uso em medicamentos, produtos cosméticos, loções, pomadas e antitranspirantes (GARG e JAIN, 1995).

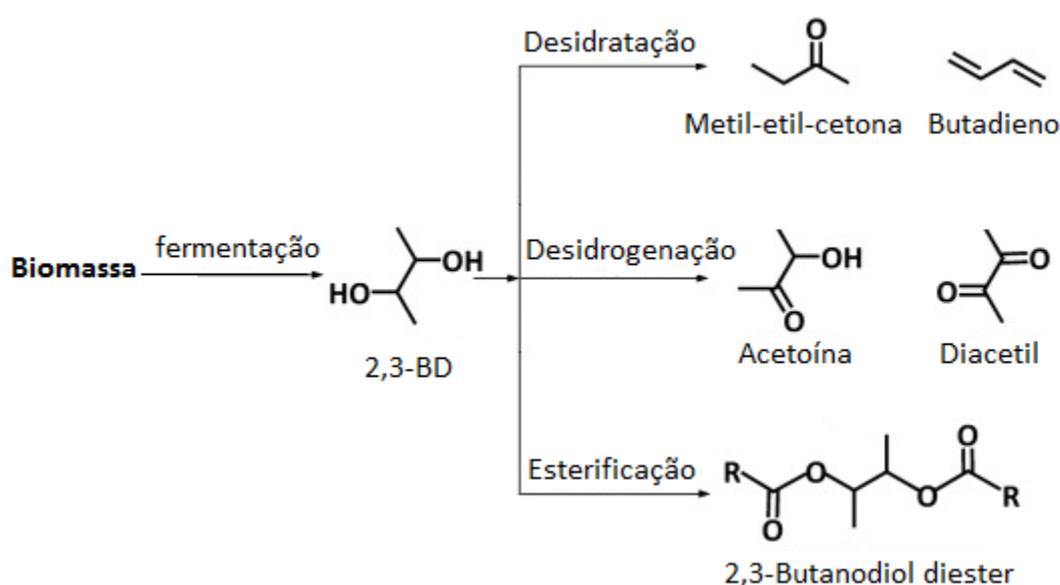


Figura 2 - Derivados de 2,3-BD. Adaptado de JI et al., 2011.

2.2 Processos de obtenção de 2,3-BD

Existem diversas formas de obtenção do diálcool 2,3-BD, seja por síntese química, a partir do petróleo; ou por meio de vias biológicas. Historicamente, tentativas de obtê-lo por síntese microbiana são relatadas desde o início do século passado. Em 1906, Harden e Walpole empregaram *K. pneumoniae* para produzir este composto, seguidos por Harden e Norris em 1912 e por Donker, em 1926, que utilizou *Paenibacillus polymyxa* (KOSARIC, MAGEE e BLASZCZYK, 1992). Em 1933, Fullmer, Christensen e Kendall propuseram a

produção industrial desse álcool. Entretanto, o maior interesse na conversão de biomassa em 2,3-BD remonta aos tempos de guerra, tendo em vista a escassez de matéria-prima para produção de borracha sintética, quando fermentações em escala piloto com *K. oxytoca* e *P. polymyxa* foram realizadas para conversão de 2,3-butanodiol em 1,3-butadieno (BLACKWOOD et al., 1949; LEDINGHAM e NEISH, 1954).

Com as reservas de petróleo cada vez mais escassas, têm aumentado significativamente o interesse por biorrefinarias, que abrangem processos e equipamentos de conversão de biomassa a combustíveis, energia e outros produtos químicos de maneira sustentável (KAMM e KAMM, 2004; RAGAUSKAS et al., 2006). Assim, produtos e processos que, até então, foram conduzidos somente por rotas sintéticas podem ser otimizados e remodelados para bioprocessos utilizando fontes de energias renováveis e de baixo custo (KAMM et al., 2016; SCHOLEY et al., 2016).

Fermentações utilizando o excesso de biomassa proveniente de resíduos agrícolas ou industriais visando à obtenção de produtos químicos tem ganhado considerável atenção, devido às preocupações com a escassez de combustíveis tradicionais e com a gestão mais racional de resíduos (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

2.2.1 Utilização de resíduos lignocelulósicos como substrato

Os materiais lignocelulósicos apresentam uma rede complexa e resistente composta principalmente por lignina (10% a 30%), hemicelulose (15% a 35%) e celulose (30% a 50%), sendo a concentração de cada um desses elementos variável de acordo com o tipo de matéria-prima em questão, idade e estágio vegetativo (JEFFRIESS, 1990; DELMER e AMOR, 1995).

O principal componente dos materiais lignocelulósicos é a celulose, polissacarídeo formado por moléculas de glicose unidas através de ligações β -1,4-glicosídicas. Cadeias de celulose são estabilizadas e ligadas entre si por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, formando as fibrilas elementares. Essas fibrilas são unidas umas às outras através da hemicelulose, o segundo mais abundante componente da lignocelulose, que é um polissacarídeo amorfo, composto por vários açúcares de cinco e seis carbonos, como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose, além de desoxiaçúcares e ácidos

urônicos. Essas estruturas são cobertas pela lignina, um polímero aromático formado por estruturas básicas fenólicas.

Cada uma das porções dos materiais lignocelulósicos pode ser utilizada com uma finalidade. As porções celulósicas e hemicelulósicas da biomassa podem ser hidrolisadas a vários açúcares e então fermentadas (LORA e GLASSER, 2002; KADLA et al., 2002).

Embora os resíduos lignocelulósicos agroindustriais necessitem de um tratamento prévio por meio de hidrólise (ácida ou enzimática) para disponibilizar os açúcares fermentescíveis, destaca-se a importância dessas matérias-primas devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade.

A fermentação dos açúcares redutores obtidos após a hidrólise dos materiais lignocelulósicos é um estágio crítico para atingir um processo técnico e economicamente viável. A hidrólise da hemicelulose fornece pentoses (xilose e arabinose), carboidratos não diretamente fermentescíveis por microrganismos industriais, sendo a biotransformação destas pentoses um dos desafios mais importantes a resolver no âmbito científico e tecnológico. Da hemicelulose também resultam hexoses, tais como: glicose, manose e galactose.

Vale ressaltar que, sendo a fermentação das pentoses uma barreira tecnológica difícil de superar, é de grande importância pesquisas em busca da otimização da bioconversão destes açúcares.

2.3 Microrganismos produtores de 2,3-BD e rotas metabólicas

Os principais gêneros referidos como produtores de 2,3-BD incluem *Klebsiella* (JANSEN, FLICKINGER e TSAO, 1984; RAMACHANDRAN e GOMA, 1987; ROSSI, DE SOUZA e AYUB, 2013; SILVEIRA, SCHMIDELL e BERBERT, 1993), *Enterobacter* (PEREGO et al., 2000; BOTHAST e SAHA, 1999), *Serratia* (RAO et al., 2012) e *Bacillus* (LAUBE, GROLEAU e MARTIN, 1984) (Tabela 1).

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

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

Diferentes microrganismos produzem diferentes isômeros, mas normalmente uma mistura de dois isômeros é formada (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). Espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter* são membros da família Enterobacteriaceae e, geralmente, produzem os isômeros dextrógiros e meso.

O 2,3-BD é sintetizado biologicamente a partir do piruvato, em um processo de fermentação ácido-mista através de diversos compostos intermediários, incluindo α -acetolactato, acetoína e diacetil (CASPI, 2008). Outros produtos finais dessa via são etanol, acetato, lactato, formato e succinato, dependendo do microrganismo e condições aplicadas (SYU, 2001; CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

O piruvato proveniente da glicólise pode ser convertido em lactato, em uma reação que requer NADH catalisada por L/D-lactato-desidrogenase (LDH), ou em α -acetolactato através de descarboxilação catalisada por α -acetolactatosintase (α -ALS), que em condições aeróbicas é rápida e irreversivelmente inativada, impedindo a síntese de 2,3-BD (KOSARIC, MAGEE e BLASZCZYK, 1992). O α -acetolactato é preferencialmente produzido em condições de baixa disponibilidade de NADH. α -acetolactato em condições anaeróbicas pode ser convertido a acetoína pela enzima α -acetolactato descarboxilase (α -ALD) e, em condições aeróbicas pode sofrer descarboxilação espontânea, originando o

diacetil. Diacetil redutase (DAR) converte o diacetil em acetoína e, na sequência, butanodiol desidrogenase reduz a acetoína a 2,3-butanodiol (HENRIKSEN e NILSSON, 2001). A conversão metabólica de acetoína a 2,3-BD é reversível e ocorre pela ação da enzima acetoína redutase (AR) (Figura 3).

A rota metabólica pode ser tanto pela glicólise ou pela rota das pentoses (Figura 4).

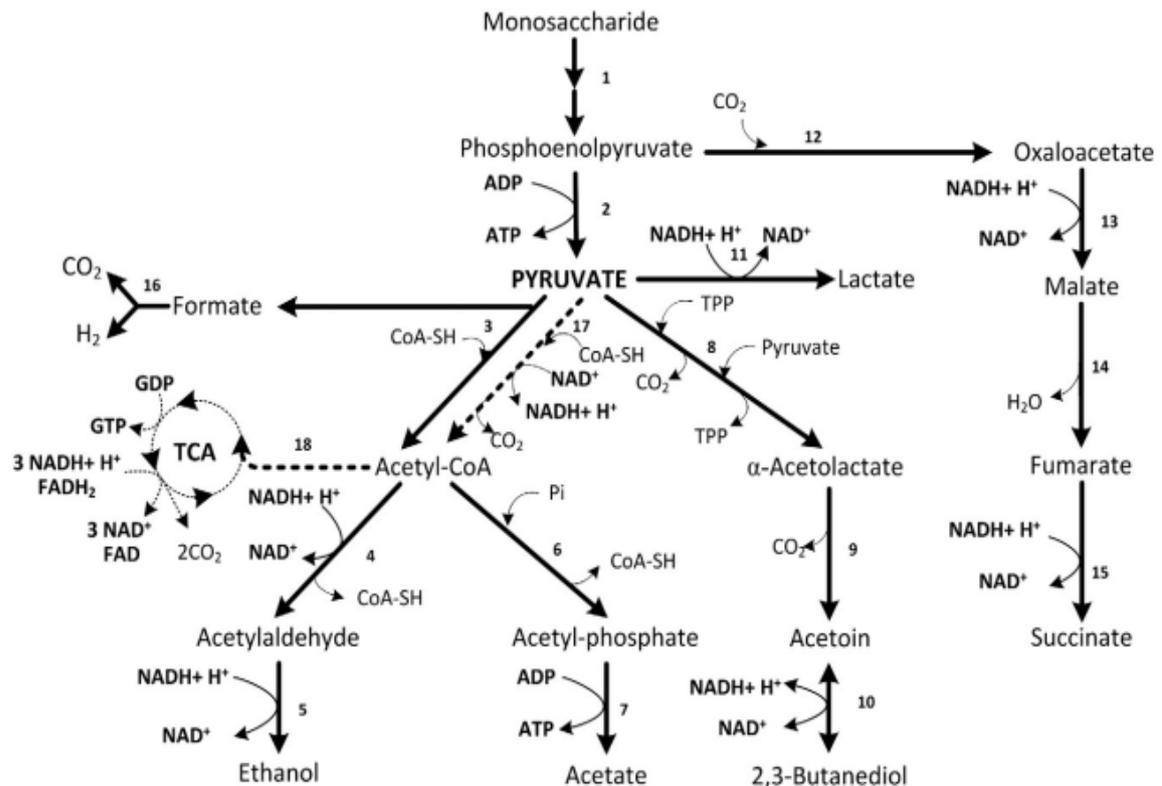


Figura 3. Via de fermentação ácido-mista para a produção de 2,3-BD. Linhas pontilhadas representam as vias que apenas estão ativas sob condições aeróbicas. Sob condições anaeróbicas ou de limitação de oxigênio, o piruvato é convertido a α -acetolactato que, em condições anaeróbicas é convertido a acetoína.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

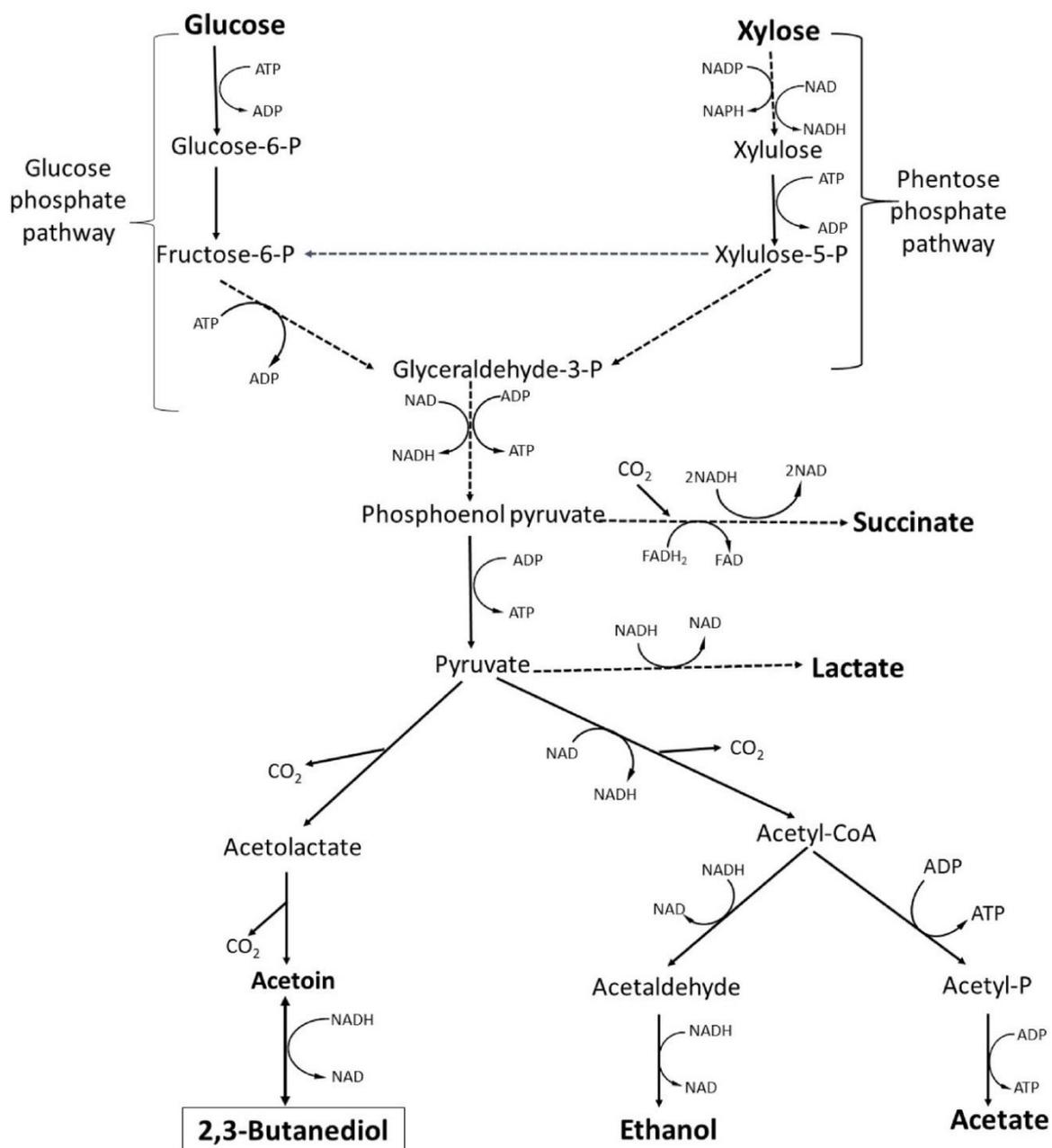


Figura 4. Rotas metabólicas de glicose e xilose para a produção de 2,3-BD (GURAGAIN e VADLANI, 2017).

K. pneumoniae é utilizada como agente fermentador na maioria das pesquisas sobre a fermentação butileno-glicólica (WANG et al., 2010; SABLAYROLLES e GOMA, 1982; PRATA, 1997; FRAZER e MCCASKEY, 1989). Essa bactéria apresenta estabilidade genética, evitando problemas de degeneração por sucessivas repicagens, flexibilidade quanto ao uso de substratos para a fermentação, sendo capaz de metabolizar grande parte das pentoses, hexoses e dissacarídeos, e ausência de problemas de inibição pelo produto formado.

Trata-se de uma bactéria anaeróbia facultativa que tem necessidades nutricionais simples, cresce rapidamente quando cultivada e pode utilizar um amplo espectro de substratos, além de estar amplamente distribuída na natureza e ser estável para uma série de condições ambientais (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009; GARG e JAIN, 1995).

2.4 Condições operacionais que influenciam a formação de 2,3-BD

2.4.1 Suprimento de oxigênio

A aeração é um fator crítico que afeta o rendimento, a produtividade e a formação de subprodutos. Apesar de 2,3-BD ser um produto de metabolismo anaeróbico, foi demonstrado que a aeração aumenta a produção desse álcool por *K. pneumoniae* (LEDINGHAM e NEISH, 1954). Porém, o aumento excessivo do fornecimento de oxigênio favorece a produção de massa celular e gás carbônico (JANSET et al, 1984). Logo, 2,3-BD é produzido sob limitação de oxigênio, sendo um exemplo clássico de fermentação microaeróbia (CONVERTI et al., 2003). A aeração é necessária para a formação de massa celular, enquanto a queda de oxigênio dissolvido é fundamental para a síntese do 2,3-BD (PIRT, 1957).

Outro ponto importante resultante da oferta de gás oxigênio é o controle das proporções dos metabólitos produzidos (Figura 5). Dessa forma, é necessário estabelecer uma estratégia eficaz de controle de fornecimento de oxigênio para garantir o rendimento de 2,3-BD (VOLOCH et al., 1985).

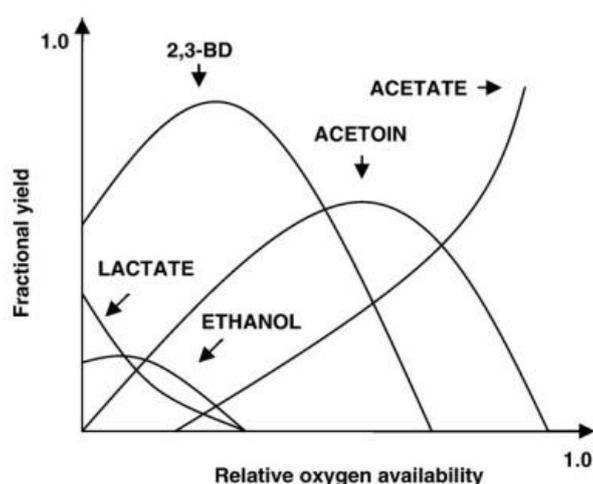


Figura 5. O efeito do fornecimento de oxigênio no rendimento de subprodutos da fermentação por *P. polymyxa* (CELIŃSKA E GRAJEK, 2009).

VOLOCH et al. (1985) explicam que grande parte dos estudos empregam bactérias das espécies *Klebsiella* e *Bacillus*, que são bactérias anaeróbicas facultativas e, portanto, podem obter energia por duas vias: respiração e fermentação. Quando há limitação de oxigênio, ambas as vias são expressas simultaneamente, de modo que o rendimento de 2,3-BD depende das atividades relativas de cada via, podendo ser maximizado através da diminuição do suprimento de oxigênio, porque isso limita a respiração. No entanto, devido à diminuição do fornecimento de oxigênio, também ocorre a diminuição da biomassa celular e, por conseguinte, menos 2,3-BD é produzido.

A mudança no metabolismo de produção de biomassa para a produção de ácidos mistos se deve a manutenção do equilíbrio NAD^+/NADH . Em condições aeróbias, o NADH proveniente da glicólise é regenerado através da respiração. Sob condições anaeróbias, como a respiração não ocorre, a via de 2,3-BD e outras vias da fermentação servem para o mesmo propósito. Na ausência de oxigênio, etanol e 2,3-BD são normalmente produzidos em quantidades equimolares (VOLOCH et al., 1985), mas também há a formação de acetato, lactato e acetoína, de forma que somente com controle do suprimento de oxigênio se pode maximizar a conversão do substrato em 2,3-BD (MADDOX, 1996; ZENG BIEBL e DECKWER, 1990), diminuindo possíveis efeitos de inibição por subprodutos e facilitando a recuperação do 2,3-BD.

2.4.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH é um parâmetro fundamental na regulação do metabolismo microbiano, afetando a produção de biomassa e as vias metabólicas (GARG e JAIN, 1995). Pode-se considerar que as condições alcalinas favorecem a formação de ácidos orgânicos e as condições ácidas estimulam a produção de 2,3-BD. A faixa de pH ideal varia conforme o substrato utilizado, com valores variando entre 5 e 6. Nesta faixa, a enzima acetolactato descarboxilase, que descarboxiliza o α -acetolactato em acetoína, atua no seu pH ótimo (KIM et al., 2013).

A maioria dos processos de fermentação anaeróbica está associada com a formação de ácidos orgânicos. Dessa forma, no decorrer da fermentação, ocorre a acidificação do meio e a concentração da forma tóxica não dissociada dos ácidos aumenta até um patamar em que o crescimento de biomassa celular cessa e a cultura é inativada por seus próprios produtos (BIEBL et al., 1998). Certos microrganismos desenvolveram

estratégias de defesa, tais como alterar o metabolismo para a síntese de compostos menos tóxicos, como álcoois e glicóis (HOUDT et al., 2007). MADDOX (1996) propôs que a indução da via de produção de 2,3-BD é devida ao acúmulo de produtos ácidos no meio de fermentação, que alteram o pH interno do microrganismo. O gradiente de pH transmembrana resultante provoca o acúmulo de acetato, que é o indutor de enzimas envolvidas na síntese de 2,3-BD. Assim, a redução do pH da cultura provoca um aumento no gradiente de pH e a produção de 2,3-BD ocorre antes que o pH externo seja demasiado ácido e a cultura seja inativada (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

De acordo com VOLOCH et al. (1985) o valor de pH ideal para a produção de 2,3-BD por *K. oxytoca* situa-se na faixa de pH de 5 a 6. Para *E. aerogenes*, CONVERTI et al. (2003) sugeriram o pH 6 como ideal. Perego et al. (2000) utilizaram cultivos de *E. aerogenes* e avaliaram faixas de pH de 4,0 a 8,0, destacando que o intervalo de pH favorável para o crescimento bacteriano foi de 5,5 a 6,5.

2.4.3 Temperatura

A eficiência de um processo biológico é estritamente dependente da temperatura devido a forte dependência da atividade enzimática e manutenção celular com esse parâmetro. Como a produção de 2,3-BD geralmente ocorre associada ao crescimento, a condição para a produção máxima de produto tem que ser semelhante que a do rendimento máximo de biomassa (GARG e JAIN, 1995). Acima da temperatura ideal, a degradação celular provavelmente torna-se dominante em relação ao crescimento, em contrapartida, abaixo da temperatura ideal, a regulação e a taxa de metabolismo podem falhar (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009).

De acordo com CELIŃSKA e GRAJEK (2009), a faixa de temperatura de 30 °C a 35 °C deverá ser ótima para a produção de 2,3-BD a partir da fermentação bacteriana, já que esta é a faixa de rendimento máximo de biomassa. Trabalhando nessa faixa de temperatura, produtos fermentativos, ao invés de biomassa, serão obtidos passando da condição aeróbia para a de microaerofilia (CELIŃSKA E GRAJEK, 2009).

Segundo BIEBL et al. (1998), em culturas de *K. pneumoniae*, a redução da temperatura de 35 °C para 30 °C resultou numa redução substancial da síntese de etanol em favor da formação do 2,3-BD.

2.4.4 Substratos utilizados e concentração

Uma grande variedade de carboidratos pode ser usada para produzir 2,3-BD. Este pode ser produzido por fermentação microbiana, particularmente utilizando bactérias, usando como substrato hexoses ou pentoses. Como ocorre nas fermentações em geral, glicose é a fonte de carbono frequentemente empregada (MOES et al., 1995; DE MAS et al., 1988).

As concentrações iniciais de açúcar mais frequentemente aplicadas estão na faixa de 5-10% (GARG e JAIN, 1995). Estas concentrações, bastante baixas (ou mesmo mais baixas), são empregadas principalmente devido ao acompanhamento de substâncias tóxicas presentes em matérias-primas (especialmente em hidrolisados de madeira), cuja concentração aumenta em conjunto com a concentração da fonte de carbono. FRAZER e MCCASKEY (1991) estudaram o efeito de compostos potencialmente tóxicos de madeira hidrolisada com ácido na produção de 2,3-BD por *K. pneumoniae*. Eles descobriram que a concentração de sulfato de até 0,2% (wt.vol⁻¹) reduziu o rendimento 2,3-BD em 30%, embora não tenha afetado o crescimento. Resultados similares foram obtidos para furfural, mas nesse caso os rendimentos 2,3-BD foram ligeiramente superiores. Os compostos fenólicos (*syringaldehyde* e *vanillin*) foram inibitórios para a produção de 2,3-BD (0,05% (wt.vol⁻¹)) e crescimento (0,1% (wt.vol⁻¹)). Foi observado que uma alta concentração de açúcar, superior a 50 g.L⁻¹, inibe a formação de 2,3-BD e o consumo de açúcares (YU e SADDLER, 1983).

No entanto, uma situação contrária é verificada em meios sintéticos suplementados com açúcares puros, como a glicose. Neste caso, não existem compostos inibitórios, portanto, concentrações iniciais de açúcares de até 200 g.L⁻¹ podem ser fermentadas, o que leva a uma melhora no rendimento 2,3-BD. É importante notar que, concentrações superiores a 20 g.L⁻¹ acarretam em diminuição da taxa de crescimento específico, provavelmente devido à queda na atividade de água. Uma vez que a redução da atividade da água é função da molaridade, a lactose (dissacarídeo) é menos inibitório do que a glicose (monossacárido) (CONVERTI e PEREGO, 2002).

DE MAS et al. (1988), trabalhando com *B. polymyxa*, relataram inibição do crescimento em concentrações de substrato superiores a 150 g.L⁻¹. Os resultados obtidos com *E. aerogenes* em relação à concentração de glicose não mostraram influência significativa da concentração inicial de glicose (na faixa de 9 a 72 g.L⁻¹) na produção molar

de 2,3-BD (CONVERTI e PEREGO, 2002).

BIEBL et al. (1998) relataram que em qualquer uma das condições testadas, o excesso de glicerol na cultura aumentou a produtividade 2,3-BD. *K. pneumoniae* cresceu em cultura contínua com 60 g.L⁻¹ de glicerol. A estirpe utilizada foi capaz de fermentar 9,2 g.L⁻¹ de glicerol em 12 h, após o crescimento e a conversão do substrato cessaram.

PEREGO et al. (2000), em seus estudos sobre bioconversão de resíduos da indústria de alimentos em 2,3-BD por *E. aerogenes*, testaram diferentes concentrações iniciais de açúcar (20-100 g.L⁻¹). Eles demonstraram que o tempo de fermentação cresceu gradualmente e os rendimentos de conversão diminuíram com o aumento da concentração inicial de açúcar.

A influência da concentração de xilose em 2,3-BD parece ser característica de cada espécie, uma vez que dados contraditórios foram relatados (GARG E JAIN, 1995). Em geral, a influência do tipo de substrato e a concentração na produção de 2,3-BD são dependentes das espécies em estudo.

3 Materiais e Métodos

3.1 Microrganismo e manutenção

Os ensaios fermentativos foram realizados com a bactéria *K. pneumoniae* BLh-1, que foi identificada por Rossi et al. (2011), sendo proveniente de um consórcio microbiano ambiental e que atualmente faz parte do estoque de culturas do laboratório BiotechLab, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA-UFRGS). O microrganismo encontra-se mantido em meio Luria-Bertani (LB) em 50% de glicerol a -80 °C (em ultrafreezer).

Células viáveis do microrganismo foram crescidas em meio LB líquido a 37 °C e 150 rpm em incubadora de agitação orbital por 24 h, seguido de esgotamento em placa contendo meio ágar-LB. Posteriormente, as placas foram mantidas sob refrigeração a 4 °C. As colônias isoladas foram utilizadas para o preparo dos inóculos para os ensaios de fermentação, garantindo assim a pureza dos mesmos.

Tabela 2. Meio ágar-LB.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Extrato de levedura	5
Triptona	10
NaCl	10
Glicose	20
Ágar-ágar	15

3.2 Meios de cultivo utilizados nos ensaios fermentativos

Três soluções com diferentes combinações de açúcares foram testadas como fonte de carbono para o processo fermentativo, conforme esquematizado na Figura 6.

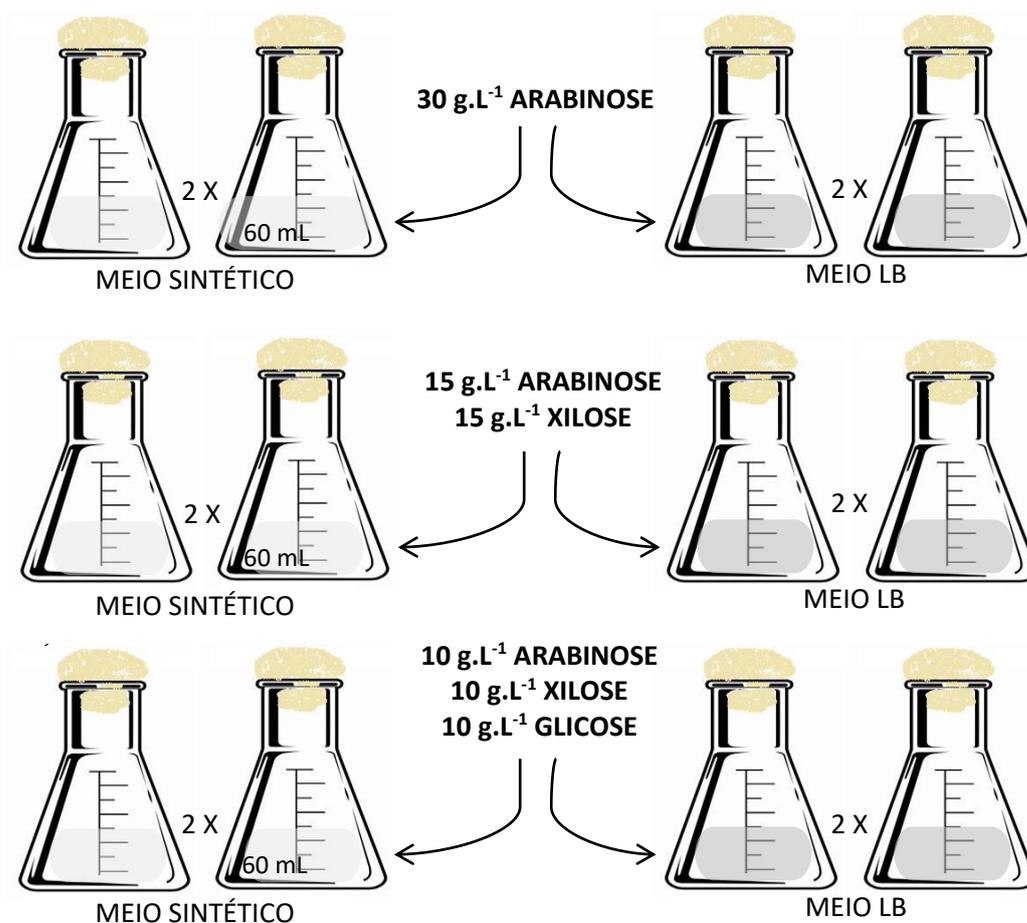


Figura 6. Desenho esquemático dos ensaios de fermentação.

Os experimentos foram realizados em duplicata, sempre mantendo a concentração final dos açúcares em 30 g.L⁻¹, variando da seguinte forma:

- ✓ Experimento 1: Foram utilizadas 30 g.L⁻¹ de arabinose apenas.
- ✓ Experimento 2: Foram utilizadas 15 g.L⁻¹ de arabinose e 15 g.L⁻¹ de xilose.
- ✓ Experimento 3: Foram utilizadas 10 g.L⁻¹ de arabinose, 10 g.L⁻¹ de xilose e 10 g.L⁻¹ de glicose.

Duas diferentes suplementações foram testadas, suplementação 1 (Tabela 3) e suplementação 2 (Tabela 4) objetivando avaliar se ocorrem diferenças significativas de rendimento e produtividade de 2,3-BD. Os meios foram esterilizados em autoclave a 1,0 atm e 120°C durante 15 minutos. Vale ressaltar que os açúcares foram autoclavados separadamente dos demais componentes do meio, como sugerido por YU e SADDLER (1983), que, em seus experimentos, obtiveram valores superiores de 2,3-BD quando a xilose foi esterilizada separadamente antes de ser adicionada ao meio autoclavado.

Tabela 3. Meio sintético (MS). Adaptado de FRAZER e MCCASKEY, 1989.

Componente	Fórmula molecular	Concentração (g.L ⁻¹)
Fosfato dibásico de Amônio	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4
Fosfato monobásico de Potássio	KH ₂ PO ₄	1
Cloreto de Sódio	NaCl	1
Fosfato dibásico de sódio	Na ₂ HPO ₄	1
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄	0,2
Sulfato de Ferro	FeSO ₄	0,02
Sulfato de Zinco	ZnSO ₄	0,01
Extrato de Levedura	-	1,5
FONTE DE CARBONO		30

Tabela 4. Meio Luria Bertani (LB). Adaptado de BOTHAST, 1994.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Extrato de levedura	5
Tryptona	10
NaCl	10
FONTE DE CARBONO	30

Os meios sintéticos, ou quimicamente definidos, são compostos de produtos químicos de identidades e concentrações conhecidas. (HUANG et al., 2012). Isso garante reprodutibilidade, já que a composição é conhecida; torna-se vantajoso para estudo das vias metabólicas das células e necessidades nutricionais para crescimento e formação do produto de interesse; permite controle individual dos componentes e; oferece simplicidade para aumento de escala (BALTZ et al., 2010).

Já os meios complexos, como o LB, são bastante utilizados na indústria porque eles oferecem flexibilidade, são mais baratos, e são ricos em aminoácidos e nutrientes de fácil assimilação, o que proporciona velocidade máxima específica de crescimento e elevado rendimento de biomassa, ou seja, resulta em maior produtividade e menor estresse metabólico (GOYAL et al., 2009).

3.3 Inóculo e cinéticas de fermentação

Para os pré-inóculos, as células foram crescidas *overnight* e, após, o meio foi centrifugado a 3000 g e 4° C por 15 minutos para a separação das células do meio líquido

que possivelmente continha produtos de fermentação. As células foram ressuspensas no meio estéril e o inóculo foi ajustado para densidade óptica igual a 1 e adicionado aos meios de fermentação. Utilizou-se um volume de inóculo de 5 % com relação ao volume inicial.

Os ensaios de fermentação foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL com volume de meio de cultura de 60 mL, vedados com bucha de algodão permeável ao oxigênio simulando condição de microaerofilia, com agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C. O processo fermentativo foi monitorado pela retirada de uma alíquota de 3 mL a cada três horas nas 12 horas iniciais de biorreação e, por fim, uma alíquota ao completar 24 horas de fermentação. Dessa forma, foi possível monitorar a biomassa celular, o pH, consumo de açúcares e produção de 2,3-BD e de outros metabólitos ao longo do processo fermentativo.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Concentração de açúcares e 2,3-BD

A concentração dos açúcares e de 2,3-BD foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando o equipamento da marca Shimadzu equipado com detector de índice de refração (RID-10A). A coluna utilizada foi Aminex HPX-87H (300×7,8 mm, Bio-Rad, EUA) e como fase móvel uma solução H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹. Para a quantificação do consumo de açúcares utilizou-se as condições de 45 °C e fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, já para a quantificação dos produtos utilizou-se temperatura de 65 °C e fluxo de 0,8 mL.min⁻¹.

As amostras coletadas do meio de fermentação foram preparadas para cromatografia por centrifugação a 3000 × g por 15 min a fim de precipitar as células em suspensão, procedendo-se então a filtração da porção sobrenadante em membranas de acetato de celulose (tamanho de poro de 0,22 µm; Sartorius, Alemanha). Para todas as análises por HPLC, padrões de 2,3-BD, etanol, ácido acético, glicose, xilose e arabinose, com grau de pureza de cromatografia (superior a 99,5 %) foram utilizados.

3.4.2 Medidas de pH

O pH de cada alíquota coletada foi medido em pHmetro (Kasvi), previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

3.4.3 Crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado a partir de leituras de densidade óptica em espectrofotômetro (Amersham Biosciences, modelo Ultrospec 3100 pro). As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 600 nm até a densidade óptica próxima a 1 e, após o meio ter atingido concentração celular extrapolando esse valor, os meios foram diluídos conforme necessário e os resultados multiplicados pelo fator de diluição visando manter a linearidade da resposta.

3.5 Cálculo de parâmetros cinéticos e análise estatística dos dados

Os valores de conversão de substrato a produtos ($Y_{P/S}$) ao longo dos experimentos foram obtidos pela divisão da concentração acumulada do produto até o tempo considerado pelo valor calculado do consumo de substrato até este mesmo tempo. Esse valor corresponde ao coeficiente angular da reta obtida através da regressão linear ao plotar-se a variação de concentração de 2,3-BD contra o consumo de açúcar.

Os valores de produtividades (Q_p) foram obtidos dividindo-se a máxima concentração total de produto formado pelo tempo necessário para obtê-lo.

Os dados foram avaliados levando em consideração o desvio padrão, isto é, a medida de um conjunto de dados em torno da média. Um alto desvio padrão significa que os dados são mais dispersos da média, e, um desvio padrão baixo sinaliza que mais dados se alinham com a média.

4 Resultados e Discussão

Os experimentos consistiram em testar dois meios de fermentação distintos (Meio Sintético e Meio LB) variando a fonte de carbono com diferentes combinações (arabinose / arabinose + xilose / arabinose + xilose + glicose) totalizando 6 condições teste, todas realizadas em duplicata.

Para cada condição foi avaliada a produção de 2,3-BD, etanol e ácido acético, bem como a cinética de consumo da(s) fonte(s) de carbono utilizada(s), crescimento celular e a variação do pH durante 24 horas de fermentação.

Em função dos açúcares terem sido autoclavados separadamente dos demais componentes do meio, valores iniciais aproximados ao desejado (30 g.L^{-1}) foram obtidos, considerando possível erro de repetitividade na pesagem e degradação durante a esterilização.

4.1 Ensaios de fermentação

4.1.1 *Ensaios com arabinose*

Os resultados dos experimentos utilizando somente arabinose, em meio sintético e meio LB, estão apresentados nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

A concentração de arabinose no meio decaiu ao longo do tempo, indicando o consumo total da mesma no meio sintético e uma quantidade de açúcar residual no meio LB. Da mesma forma, a produção de 2,3-BD foi superior no meio sintético. Etanol e ácido acético, bioprodutos também analisados, foram produzidos em pequena quantidade e, de igual maneira, a formação foi superior no meio sintético.

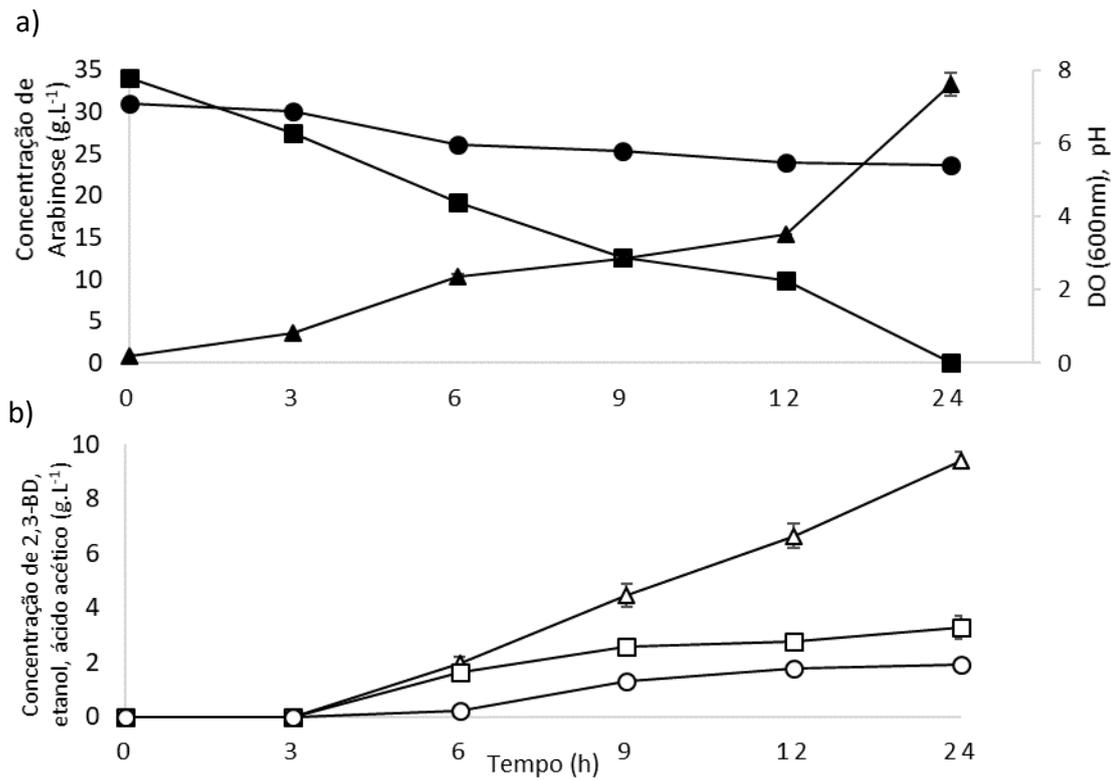


Figura 7. Teste de fermentação com arabinose em meio sintético. a) consumo de arabinose, variação do pH e DO. b) produção de 2,3-BD, etanol e ácido acético, em 24 horas. (-■-) arabinose, (-●-) pH, (-▲-) DO, (-□-) etanol, (-○-) ácido acético e (-Δ-) 2,3-BD.

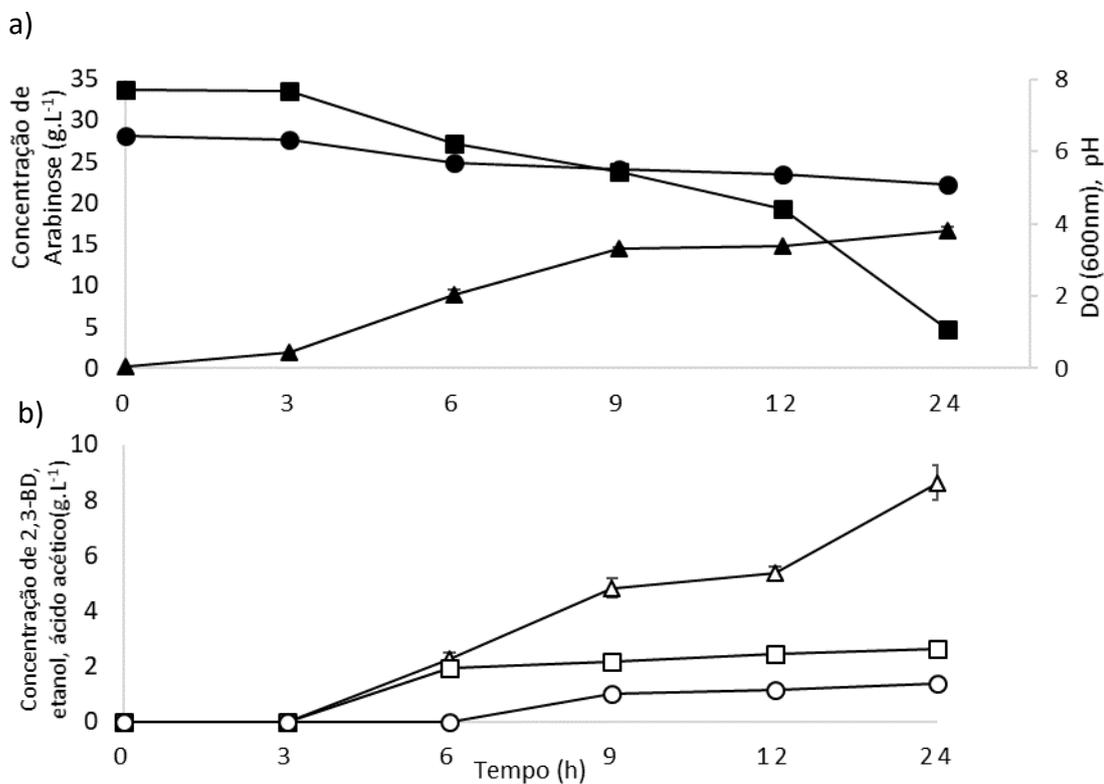


Figura 8. Teste de fermentação com arabinose em meio LB. a) consumo de arabinose, variação do pH e DO. b) produção de 2,3-BD, etanol e ácido acético, em 24 horas. (-■-) arabinose, (-●-) pH, (-▲-) DO, (-□-) etanol, (-○-) ácido acético e (-Δ-) 2,3-BD.

Com relação à obtenção de 2,3-BD, a maior produção ocorreu acompanhando a cinética celular (Figuras 7 e 8), podendo-se inferir que este seja um metabólito associado ao crescimento. MALONEE e SPECKMAN (1988) explicam que todas as enzimas e componentes produzidos na rota de formação de 2,3-BD são normalmente produzidos durante as fases do crescimento. A rota fermentativa do 2,3-BD, como em outras rotas fermentativas, tem a função de regular a razão de NADH/NAD⁺ nas células. A síntese de 2,3-BD também está associada a reservas de energia e carbono (XIAO e XU, 2007). Desta forma, 2,3-BD pode ser reutilizado durante a fase estacionária quando as fontes de carbono e energia são escassas.

Pelo comportamento dos dados da cinética de crescimento celular, sugere-se que, durante as 24 horas de fermentação, a fase de crescimento exponencial não foi completa, não atingindo assim a fase de estacionária.

O pH inicial do cultivo foi de aproximadamente 7,0 para o meio sintético e 6,5 para o meio LB. Conforme o progresso da fermentação e reprodução do microrganismo, ocorreu redução do pH, atingindo valores ligeiramente acima de 5,0, para ambos os casos. Essa acidificação do meio é característica dos processos de fermentação devido à formação de ácidos orgânicos. A redução do pH está intimamente ligada à produção de 2,3-BD, visto que essa rota metabólica possa ser uma estratégia de defesa de alguns microrganismos para elevar o pH do meio sob condições ácidas que podem comprometer o crescimento bacteriano (BIEBL et al., 1998). Foi demonstrado que a produção de 2,3-BD é induzida sob condições ácidas (NAKASHIMADA et al., 2000) e, por 2,3-BD ser um metabólito de pH neutro, indica que essa via colabore para a diminuição da alta acidificação.

Os valores em duplicata obtidos para a produção dos metabólitos, o consumo de arabinose, pH e densidade ótica encontram-se no apêndice A.

4.1.2 *Ensaio com arabinose e xilose*

Os resultados dos experimentos envolvendo a combinação de arabinose e xilose, em meio sintético e meio LB, respectivamente, estão apresentados nas Figuras 9 e 10.

A concentração de arabinose e xilose no meio decaíram ao longo do tempo, sendo arabinose preferencialmente metabolizada. Verificou-se maior consumo dos açúcares no

meio sintético, sendo a arabinose consumida integralmente nesse caso. Analogamente, a produção de 2,3-BD foi superior no meio sintético. Etanol e ácido acético foram produzidos em pequenas quantidades nos diferentes meios testados.

Com relação ao consumo de arabinose preferencialmente à xilose, KANG e colaboradores (1998) observaram que os genes envolvidos na via metabólica da xilose foram reprimidos quando as células foram cultivadas em uma mistura de arabinose e xilose. HERNANDEZ-MONTALVO et al. (2001) também observaram que *E. coli* utiliza arabinose antes da xilose. Embora existam algumas estratégias para quebrar a repressão mediada pela glicose do metabolismo de arabinose e xilose, não existe para quebrar a repressão mediada por arabinose do metabolismo xilose. Além disso, pouco se sabe sobre essa repressão além das observações feitas por esses pesquisadores.

De forma geral, a partir das Figuras 9 e 10, verifica-se que a formação de 2,3-BD é majoritária na fase de crescimento celular, confirmando o já proposto anteriormente nos testes com arabinose somente. Tempos superiores seriam necessários para avaliar a produção de 2,3-BD na fase estacionária, visto que a cinética celular não atingiu esse estágio.

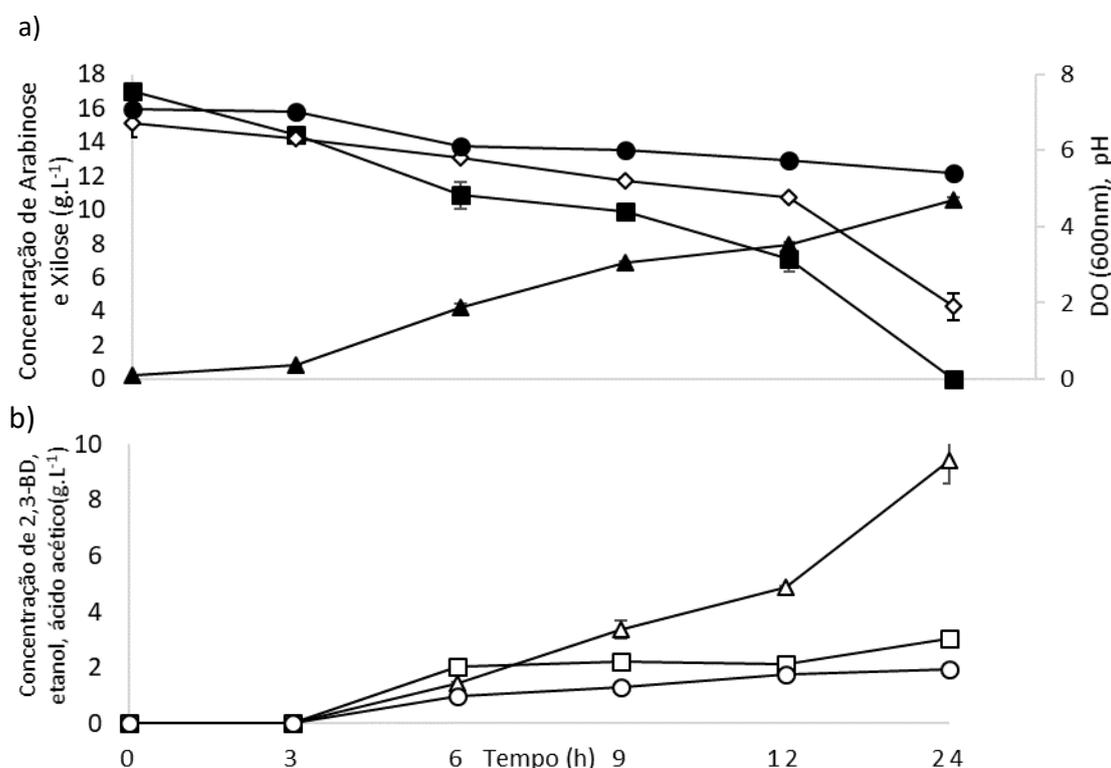


Figura 9. Teste de fermentação de arabinose + xilose em meio sintético. a) consumo de arabinose, xilose, variação do pH e DO. b) produção de 2,3-BD, etanol e ácido acético, em 24 horas. (-■-) arabinose, (-◇-) xilose, (-●-) pH, (-▲-) DO, (-□-) etanol, (-○-) ácido acético e (-△-) 2,3-BD.

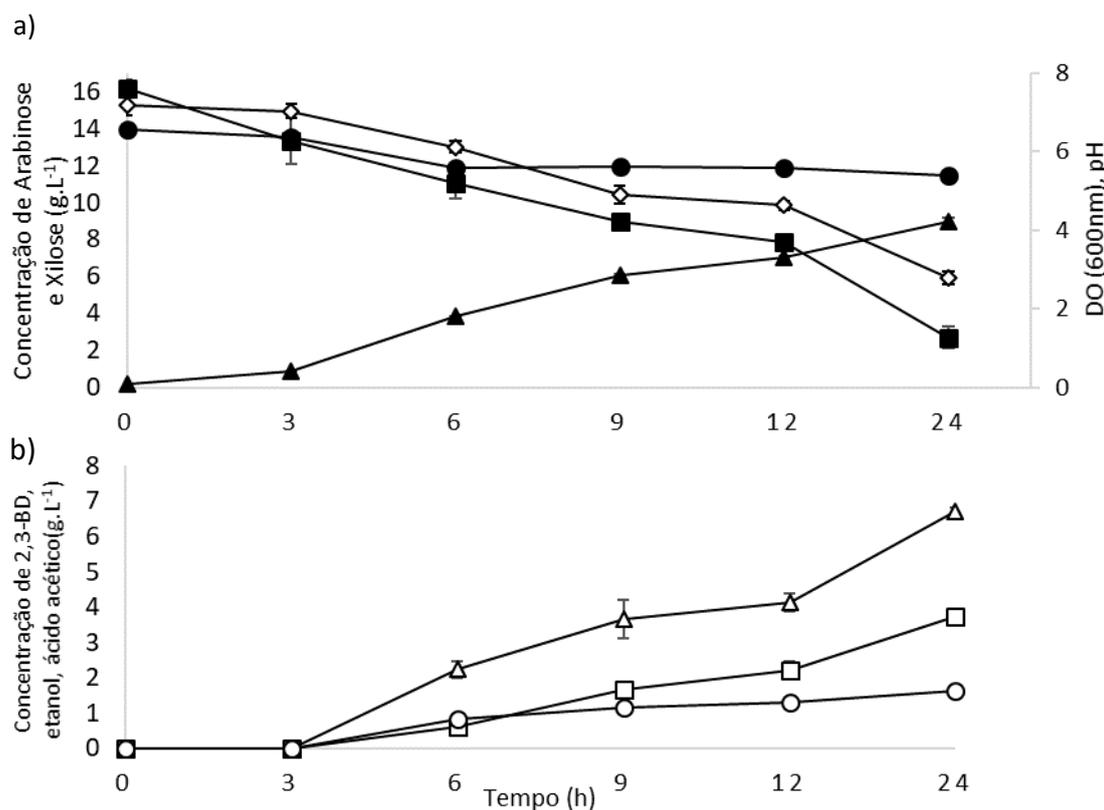


Figura 10. Teste de fermentação de arabinose + xilose em meio LB. a) consumo de arabinose, xilose, variação do pH e DO. b) produção de 2,3-BD, etanol e ácido acético, em 24 horas. (-■-) arabinose, (◇-) xilose, (-●-) pH, (-▲-) DO, (-□-) etanol, (-○-) ácido acético e (-Δ-) 2,3-BD.

O pH inicial do cultivo foi de aproximadamente 7,0 para o meio sintético e 6,5 para o meio LB e, no decorrer da fermentação, ocorreu redução do pH atingindo valores próximo a 5,0. Conforme discutido anteriormente, esse valor é dependente do substrato e do microrganismo envolvido, variando normalmente entre 5,0 e 6,0 para a produção de 2,3-BD (CELIŃSKA e GRAJEK, 2009). Nessa faixa, a enzima acetolactato-descarboxilase atua em seu pH ótimo e controla a fermentação (KIM et al., 2013). Já foi observado que, em condições de baixo pH, o acetato é um indutor eficiente dessas 3 enzimas envolvidas nas rotas de fermentação do 2,3- BD (BRYN et al.,1973).

Os valores em duplicata obtidos para a produção dos metabólitos, o consumo de arabinose e xilose, pH e densidade ótica encontram-se no apêndice B.

4.1.3 Ensaio com arabinose, xilose e glicose

Os resultados dos experimentos envolvendo a combinação de arabinose, xilose e glicose, em meio sintético e meio LB, respectivamente, estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

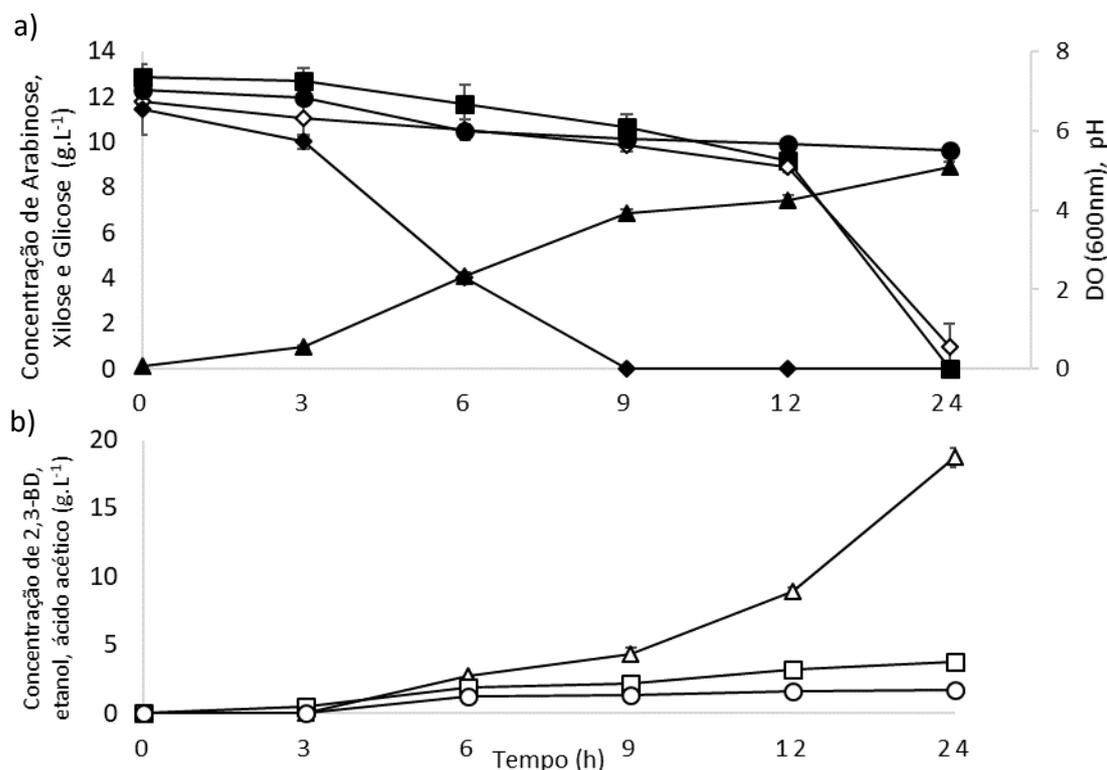


Figura 11. Teste de fermentação com arabinose + xilose + glicose em meio sintético. a) consumo de arabinose, xilose, glicose, variação do pH e DO. b) produção de 2,3-BD, etanol e ácido acético, em 24 horas. (-■-) arabinose, (-◇-) xilose, (-◆-) glicose, (-●-) pH, (-▲-) DO, (-□-) etanol, (-○-) ácido acético e (-△-) 2,3-BD.

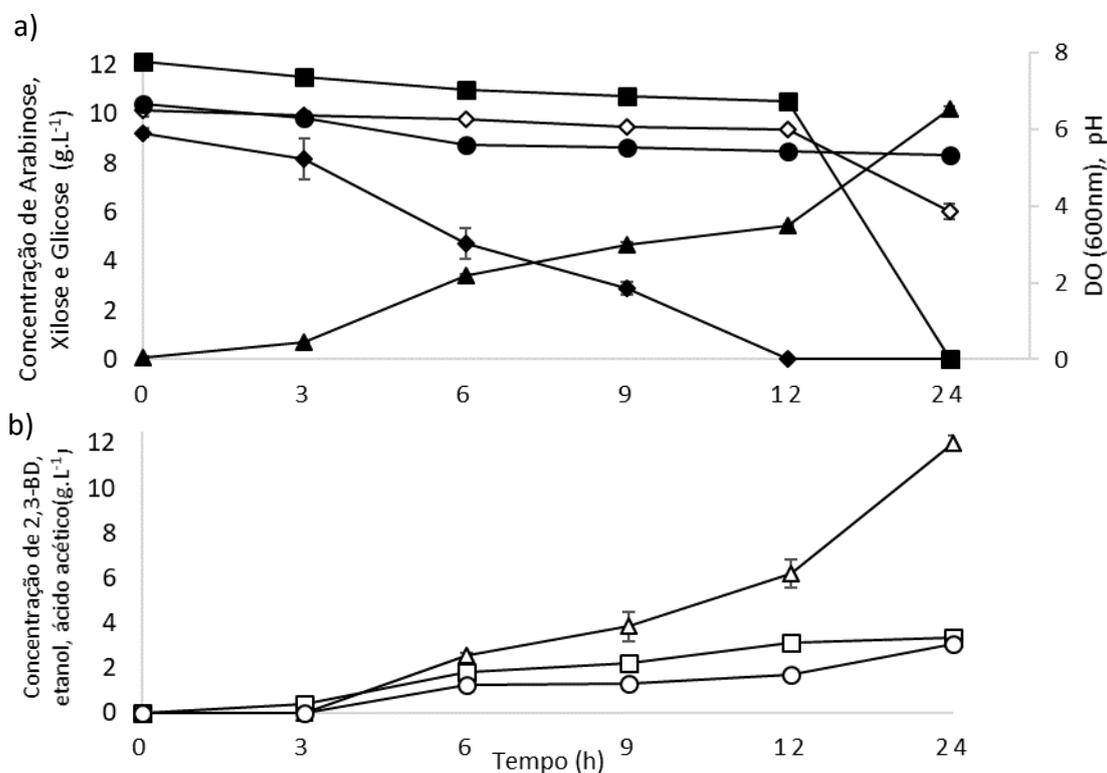


Figura 12. Teste de fermentação com arabinose + xilose + glicose em meio LB. a) consumo de arabinose, xilose, glicose, variação do pH e DO. b) produção de 2,3-BD, etanol e ácido acético, em 24 horas. (-■-) arabinose, (-◇-) xilose, (-◆-) glicose, (-●-) pH, (-▲-) DO, (-□-) etanol, (-○-) ácido acético e (-△-) 2,3-BD.

A concentração dos açúcares no meio decaiu ao longo do tempo, sendo glicose preferencialmente metabolizada, seguido de arabinose e xilose. Arabinose e glicose foram consumidas integralmente em ambos os meios de suplementação, já a xilose não foi totalmente consumida em nenhum dos casos, porém os valores residuais foram superiores no meio LB. Utilizando a combinação de arabinose, xilose e glicose como fonte de carbono também se obteve uma produção de 2,3-BD superior no meio sintético em relação ao meio LB. Etanol e ácido acético foram produzidos em pequenas quantidades nos diferentes meios testados.

Uma possível hipótese para o melhor desempenho do microrganismo no meio sintético, em todos os experimentos realizados independente da fonte de carbono, remete ao fato que este supriu melhor os nutrientes requeridos nas vias metabólicas utilizadas por *K. pneumoniae*. Além disso, o meio LB é normalmente utilizado como meio de crescimento, logo, a produção de biomassa é facilitada nesse meio, podendo ter prejudicado a rota de síntese de 2,3-BD.

Em comparação aos experimentos envolvendo somente pentoses, observa-se que a cinética de crescimento é mais rápida quando *K. pneumoniae* está em um meio com glicose disponível. Isto se deve, provavelmente, por este açúcar ser uma fonte de carbono de fácil catálise, ficando disponível para as células desempenharem suas funções. Logo, a glicose é o primeiro açúcar metabolizado e, quando este se esgota, ocorre o consumo da arabinose e, por fim, da xilose. Uma possível explicação para este fato seria a possível repressão catabólica da glicose sobre as pentoses, o que torna a rota metabólica mais lenta. Segundo PERLMAN (1944), *K. pneumoniae* tem uma tendência para metabolizar preferencialmente glicose e em seguida, manose, entre as fontes de carbono presentes no hidrolisado lignocelulósico. Xilose, arabinose e galactose são consumidos em taxas mais lentas.

Com relação ao pH, este foi reduzido de aproximadamente 7,0 para o meio sintético e 6,7 para o meio LB para valores próximos a 5,0 ao final, analogamente aos casos anteriormente discutidos.

Os valores em duplicata obtidos para a produção dos metabólitos, o consumo de açúcares, pH e densidade óptica encontram-se no apêndice C.

4.2 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos para os ensaios realizados com os diferentes meios estão apresentados na Tabela 5. Pode-se observar que a maior produção 2,3-BD correspondeu a 18,74 g.L⁻¹ quando a condição utilizada foi meio sintético e com a combinação dos três açúcares. A produtividade e Y_{P/S} também foram superiores nesse caso, 0,53 g.g⁻¹ e 0,78 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Logo, glicose apresenta melhor rendimento para produção de 2,3-BD. Quando quantidades similares de xilose e arabinose foram metabolizadas, o rendimento foi inferior; 0,28 g.g⁻¹ utilizando somente arabinose e 0,34 g.g⁻¹ utilizando a combinação de arabinose e xilose.

Tabela 5. Parâmetros de cinética de crescimento, consumo de açúcar e produtividade.

	Concentração 2,3 BD (g.L ⁻¹)	Consumo Arabinose (g.L ⁻¹)	Consumo Xilose (g.L ⁻¹)	Consumo Glicose (g.L ⁻¹)	Consumo Total (g.L ⁻¹)	Y _{ps} (g.g ⁻¹)	Q _p (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
MEIO SINTÉTICO	9,44 ± 0,31	34,04 ± 0,33	-	-	34,04 ± 0,33	0,28	0,39
MEIO SINTÉTICO	9,39 ± 0,80	17,03 ± 0,41	10,83 ± 0,03	-	27,86 ± 0,44	0,34	0,39
MEIO SINTÉTICO	18,73 ± 0,69	12,85 ± 0,57	10,77 ± 1,44	11,45 ± 1,12	35,08 ± 3,13	0,53	0,78
MEIO LB	8,61 ± 0,62	29,09 ± 0,92	-	-	29,09 ± 0,92	0,30	0,36
MEIO LB	6,71 ± 0,09	13,44 ± 0,11	9,37 ± 0,25	-	22,81 ± 0,36	0,29	0,28
MEIO LB	12,00 ± 0,34	12,10 ± 0,30	4,12 ± 0,05	9,22 ± 0,18	25,44 ± 0,53	0,47	0,50

Ao comparar o rendimento e a produtividade obtidas por *K. pneumoniae* através das condições testadas com os valores encontrados na literatura, a estratégia adotada foi eficaz. Na Tabela 6 estão apresentados alguns estudos envolvendo a utilização de pentoses e hexoses, bem como sua combinação, para diferentes espécies bacterianas.

Tabela 6 - Produção de 2,3-BD por diferentes espécies bacterianas.

Espécie	Substrato	Método	Produtividade (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Rendimento (g·g ⁻¹)	Referência
<i>Enterobacter cloacae</i>	Arabinose	Batelada	0,48 ^{b)}	0,38	SAHA et al., (1999)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Xilose	Batelada	1,35 ^{b)}	0,29	JANSEN et al., (1984)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Xilose	Batelada alimentada	0,82 ^{a)}	0,44	ZHANG et al., (2016)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Glicose	Batelada	0,65 ^{b)}	0,39	JUNG et al., (2014)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Glicose	Batelada	0,44 ^{b)}	0,38	SONG et al. (2012)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hidrolisado de madeira	Batelada	0,28 ^{a)}	0,29	GROVER et al. (1990)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Melaço de milho	Batelada alimentada	1,35 ^{a)}	0,41	WANG et al. (2010)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Hidrolisado de milho	Batelada alimentada	0,59 ^{b)}	0,50	CHENG et al. (2010)

a): 2,3-BD + acetoína.

b): 2,3-BD.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, de forma geral, o rendimento utilizando glicose ou substratos contendo esse açúcar são superiores, indicando que a rota glicolítica é preferencial, mais rápida e eficiente. No entanto, os resultados encontrados utilizando xilose e arabinose são promissores, considerando a possibilidade de utilização de resíduos lignocelulósicos para obtenção de produtos de interesse econômico, como é o caso do 2,3-BD.

A utilização de batelada alimentada ou processo contínuo também são estratégias que auxiliam a produção de 2,3-BD, uma vez que garantem a concentração de fonte de carbono no meio, aumentando a produtividade.

Cabe ressaltar que este trabalho é precursor no que diz respeito a fermentação de arabinose. Poucos estudos envolvem a fermentação deste açúcar, presente em quantidade significativa em grande parte dos hidrolisados lignocelulósicos. A arabinose é, por exemplo, o segundo açúcar majoritário no hidrolisado de eucalipto e de bagaço de cana-de-açúcar e o terceiro no hidrolisado de palha de arroz. Na casca de soja a concentração de arabinose é ainda mais significativa (Tabela 7).

Tabela 7 – Composição parcial de diferentes hidrolisados obtidos por hidrólise ácida em sua forma original.

Hidrolisado	Xilose (g.L⁻¹)	Glicose (g.L⁻¹)	Arabinose (g.L⁻¹)	Referência
Eucalipto	39,55	1,99	2,53	SANTOS e PRATA, (2004)
Palha de arroz	16,40	3,70	2,60	ROBERTO e MUSSATO, (2004)
Bagaço de cana-de-açúcar	12,00	0,41	0,99	FONSECA, (2009)
Casca de soja	6,3	1,5	4,5	CASSALES (2010)

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

A partir das fontes de carbono utilizadas, a cepa *K. pneumoniae* BLh-1 mostrou-se promissora para a produção de 2,3-BD. Valores de conversão de substrato a produto e produtividade eficazes foram obtidos.

A maior produção de 2,3-BD ocorreu em meio sintético utilizando a combinação de arabinose, xilose e glicose. Isso confirma a preferência do microrganismo pela glicose, açúcar de fácil assimilação. Além disso, arabinose e xilose também foram metabolizadas, indicando a flexibilidade de *K. pneumoniae* BLh-1.

A ordem preferencial de consumo de açúcares pela bactéria foi: glicose>arabinose>xilose. As enzimas essenciais para a conversão de xilose em 2,3-BD podem ter sido ligeiramente inibidas pela presença de glicose e arabinose no meio de cultura. A otimização dos componentes médios e outros parâmetros do processo, como o controle do pH e a aeração, podem melhorar a produção de 2,3-BD.

Como *K. pneumoniae* BLh-1 foi capaz de converter de maneira eficaz arabinose, xilose e glicose, logo, é um potencial microrganismo para futuros estudos utilizando hidrolisado de resíduos agrícolas. Igualmente, sugere-se a realização dos experimentos em biorreatores, onde é possível executar um melhor ajuste dos parâmetros de controle.

6 Referências

BALTZ, R. H.; DAVIES, J. E.; DEMAINE, A. L.; Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (3rd edition). [s.l.] Washington: ASM, 2010.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. The 'buttery' attribute of wine—diacetyl— desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, v. 96, n. 3, p. 235-252, 2004.

BIEBL, H.; ZENG, A. P.; MENZEL, K.; DECKWER, W. D. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 50, n. 1, p. 24-29, 1998.

BLACKWOOD, A. C.; SIMPSON, F. J.; WHEAT, J. A.; LESLIE, J. D.; LEDINGHAM, G. A. Production and properties of 2,3-butanediol: XXXI. Pilot plant studies on the fermentation of wheat by *Aerobacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Research*, v. 27F, n. 4, p. 199-210, 1949.

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

BOTHAST, R. J.; SAHA, B. C.; FLOSENZIER, V.; INGRAM, L. O. Fermentation of L-arabinose, D-xylose and D-glucose by ethanologenic recombinant *Klebsiella oxytoca* strain P2. *Biotechnology Letters*, v. 16, n. 4, p. 401-406, 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 and Biotechnology*, v. 25, p. 511-512, 1973.

CASSALES, A. R. Otimização da hidrólise da casca de soja (Glycine Max) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

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

CHENG, K. K.; LIU, Q.; ZHANG, J. A.; LI, J. P.; XU, J. M.; WANG, G. H. Improved 2,3-butanediol production from corn cob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 4, p. 613-616, 2010.

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

DELMER, D. P.; AMOR, Y. Cellulose biosynthesis. *The Plant cell*, v. 7, n. 7, p. 987-1000, 1995.

FONSECA, B. G. Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2009.

FRAZER, F. R.; MCCASKEY, T. A. Effect of selected components of acid-hydrolysed hardwood on conversion of D-xylose to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, n. 2, p. 110-115, 1991.

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

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

GOYAL, D.; SAHNI, G.; SAHOO, D. K. Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 19, p. 4468-4474, 2009.

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

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

HATTI-KAUL, R.; TORNVALL, U.; GUSTAFSSON, L.; BORJESSON, P. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals—a cradle-to-grave perspective. *Trends in Biotechnology*, v. 25, n. 3, p. 119-124, 2007.

HAZEENA, S. H.; PANDEY, A.; BINOD, P. Evaluation of Oil Palm Fruit Hydrolysate as a Novel Substrate for 2,3-Butanediol Production Using a Novel Isolate *Enterobacter Cloacae* SG1. *Renewable Energy*, v. 98, p. 216-220, 2016.

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

HERNÁNDEZ-MONTALVO, V.; LIN, H.; BOLIVAR, F.; GOSSET, G. Characterization of sugar mixtures utilization by *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, n. 1-2, p. 186-191, 2001.

HUANG, C. J.; LIN, H.; YANG, X. M. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 3, p. 383-399, 2012.

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, n. 10, p. 446-453, 2013.

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

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation*, v. 1, n. 2-3, p. 163-176, 1990.

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

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 3, p. 524-534, 2007.

JUNG, M. Y.; SUMAN, M.; SANG, H. S.; KAP-SEOK, Y.; JINWON, L.; MIN-KYU, O. Improvement of 2,3-Butanediol Yield in *Klebsiella pneumoniae* by Deletion of the Pyruvate Formate-Lyase Gene. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 19, p. 6195-6203, 2014.

KADLA, J. K.; KUBO, S.; VENDITTI, R.A.; GILBERT, R. D.; COMPERE, A. L.; GRIFFITH, W. Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications. *Carbon*, v. 40, n. 15, p. 2913-2920, 2002.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, n. 2, p. 137-145, 2004.

KAMM, B.; SCHÖNICKE, P.; HILLE, C. Green biorefinery – Industrial implementation. *Food Chemistry*, v. 197, Part B, p. 1341-1345, 2016.

KANG, H. Y.; SONG, S.; PARK, C. Priority of pentose utilization at the level of transcription: arabinose, xylose, and ribose operons. *Molecules and Cells*, v. 8, n. 3, p. 318-323, 1998.

KIM, D. K.; RATHNASING, C.; SONG, H.; LEE, H. J.; SEUNG, D.; CHANG, Y. K. Metabolic engineering of a novel *Klebsiella oxytoca* strain for enhanced 2,3-butanediol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 116, n. 2, p. 186-192, 2013.

KOSARIC, N.; MAGEE, R. J.; BLASZCZYK, R. Redox potential measurement for monitoring glucose and xylose conversion by *K. pneumoniae*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 6, n. 3, p. 145-151, 1992.

LAUBE, V. M.; GROLEAU, D.; MARTIN, S. M. 2,3-Butanediol production from xylose and other hemicellulosic components by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnology Letters*, v. 6, n. 4, p. 257-262.

LEDINGHAM, G. A.; NEISH, A. C. Fermentative production of 2,3-butanediol. In: Underkofler LA, Hickey RJ, editors. *Industrial fermentations*. New York, Chemical Publishing Company, v. 2, p. 27-93, 1954.

LÓPEZ-CONTRERAS, A. M.; CLAASSEN, P. A. M.; MOOIBROCK, H.; DE VOS, W. M. Utilization of saccharides in extruded domestic organic wastes by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for production of acetone, butanol and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 54, p. 162-167, 2000.

LORA, J. S.; GLASSER, W. G. Recent Industrial applications of lignin: A sustainable alternative to Nonrenewable materials. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 10, n. 1-2, p. 39-48, 2002.

MA, C. Q.; WANG, A. L.; QIN, J. Y.; LI, L. X.; AI, X. L.; JIANG, T. Y.; TANG, H. Z.; XU, P. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, n. 1, p. 49-57, 2009.

MADDOX, I. S. Microbial production of 2,3-butanediol. *Biotechnology*, v. 6, p. 269-291, 1996.

MALLONEE, D. H.; SPECKMAN, R. A. Development of a Mutant Strain of *Bacillus polymyxa* Showing Enhanced Production of 2,3-Butanediol. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 168-171, 1988.

DE MAS, C.; JANSEN, N. B.; TSAO, G. T. Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 31, n. 4, p. 366-377, 1988.

MOES, J.; GRIOT, M.; KELLER, J.; HEINZLE, E.; DUNN, I. J.; BOURNE, J. R. A microbial culture with oxygen sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, n. 4, p. 482-489, 1985.

NAKASHIMADA, Y., MARWOTOM, B., KASHIWAMURA, T., KAKIZONO, T., NISHIO, N. Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 90, n. 6, p. 661-664, 2000.

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 and Biosystems Engineering*, v. 23, n. 6, p. 613-620, 2000.

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

PIRT, S. J. The oxygen requirement of growing cultures of an *Aerobacter* species determined by means of the continuous culture technique. *Journal of General Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 59-75, 1957.

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

RAGAUSKAS, A. J.; DAVISON, B. H.; LIOTTA, C. L.; JONATHAN, R.; TEMPLER, R. H.; TSCHAPLINSKI, T. J. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

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

RAO, B.; ZHANG, L. Y.; SUN, J.; SU, G.; WEI, D.; CHU, J.; ZHU, J.; SHEN, Y. Characterization and regulation of the 2,3-butanediol pathway in *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 5, p. 2147-2159, 2012.

RAO, B.; ZHANG, L. Y.; SUN, J.; SU, G.; WEI, D.; CHU, J.; ZHU, J.; SHEN, Y. Characterization and regulation of the 2,3-butanediol pathway in *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 5, p. 2147-2159, 2012.

ROBERTO, I. C.; MUSSATO, S. I. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xylitol. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, v. 24, n. 1, p. 94-100, 2004.

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

SABLAYROLLES, J. M.; GOMA, G. Butanediol production by *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: effects of initial substrate concentration and aeration agitation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 26, n. 2, p. 148-155, 1984.

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

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.

SANTOS, R. DA S.; PRATA, A. M. R. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto para produção fermentativa de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. In: ICTR – Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável. 2004, Florianópolis, SC.

SCHOLEY, D. V.; BURTON, E. J.; WILLIAMS, P. E. V. The bio refinery; producing feed and fuel from grain. *Food Chemistry*, v. 197, Part A, p. 937-942, 2016.

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

SONG, Y.; QIANG, L.; XUEBING, Z.; SUN, Y.; DEHUA, L. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* from enzymatic hydrolyzate of sugarcane bagasse. *BioResources*, v. 7, n. 4, p. 4517-4530, 2012.

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

THOMSEN, M. H. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 68, n. 5, p. 598-606, 2005.

VAN HAVEREN J.; SCOTT, E. L.; SANDERS, J. Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 2, n. 1, p. 41-57, 2008.

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

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

XIAO, Z.; XU, P. Acetoin metabolism in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 33. N. 2, p. 127-140, 2007.

WANG, A.; WANG, Y.; JIANG, T.; LI, L.; MA, C. Production of 2,3-butanediol corncob molasses, a waste by-product in xylitol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, n. 6, p. 965-970, 2010.

WILLKE, T.; VORLOP, K. D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, n. 2, p. 131-142, 2007.

YU, E. K.; SADDLER, J. N. Fed-batch approach to production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate concentrations. *Applied Environmental Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 630-635, 1983.

YU, E. K.; SADDLER, J. N. Power of solvent production by *Klebsiella pneumoniae* grown on sugars present in wood hemicellulose. *Biotechnology Letters*, v. 4, n. 2, p. 121-126, 1982b.

ZHANG, C.; LI, W.; WANG, D.; GUO, X.; MA, L.; XIAO, D. Production of 2,3-butanediol by *Enterobacter cloacae* from corncob-derived xylose. *Turkish Journal of Biology*, v. 40, p. 856-865, 2016.

APÊNDICE A – Dados da cinética com meio utilizando arabinose apenas

As tabelas abaixo exibem os valores de densidade ótica, pH, concentrações de 2,3-BD, etanol e ácido acético e concentração de arabinose para cada alíquota coletada.

Número 1 e 2 fazem referência ao meio de fermentação empregado. Número 1 corresponde ao meio sintético e número 2 ao meio LB.

Os índices a e b indicam que os dados foram coletados em duplicata e correspondem ao mesmo meio de fermentação.

Tabela 1 – Densidade ótica (600 nm)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,213	0,807	2,420	2,810	3,513	7,927
1b	0,206	0,833	2,308	2,890	3,510	7,280
2a	0,063	0,405	1,876	3,253	3,350	3,716
2b	0,066	0,442	2,162	3,350	3,389	3,923

Tabela 2 – pH

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	7,08	6,90	5,98	5,78	5,53	5,46
1b	7,07	6,82	5,98	5,77	5,39	5,38
2a	6,41	6,36	5,70	5,50	5,36	5,08
2b	6,47	6,32	5,66	5,54	5,41	5,12

Tabela 3 – Concentração de 2,3-BD (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,00	0,00	1,71	4,91	7,10	9,74
1b	0,00	0,00	2,23	4,06	6,21	9,13
2a	0,00	0,00	2,01	4,48	5,11	7,99
2b	0,00	0,00	2,49	5,16	5,59	9,23

Tabela 4 – Concentração de arabinose (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	33,71	28,12	20,00	12,11	9,91	0,00
1b	34,37	26,70	18,50	13,20	-	0,00
2a	33,17	33,26	26,16	23,12	20,10	5,00
2b	34,30	33,90	28,10	24,60	18,60	4,30

Tabela 5 – Concentração de etanol (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,00	0,00	1,65	2,49	2,79	2,88
1b	0,00	0,00	1,65	2,71	2,79	3,72
2a	0,00	0,00	2,05	2,14	2,39	2,73
2b	0,00	0,00	1,80	2,21	2,46	2,54

Tabela 6 – Concentração de ácido acético (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,00	0,00	0,29	1,54	1,77	1,89
1b	0,00	0,00	0,21	1,32	1,78	1,92
2a	0,00	0,00	0,00	1,05	1,12	1,33
2b	0,00	0,00	0,00	1,01	1,17	1,42

APÊNDICE B – Dados da cinética com meio utilizando arabinose + xilose

As tabelas abaixo exibem os valores de densidade ótica, pH, concentrações de 2,3-BD, etanol e ácido acético e concentrações de arabinose e xilose para cada alíquota coletada.

Número 1 e 2 fazem referência ao meio de fermentação empregado. Número 1 corresponde ao meio sintético e número 2 ao meio LB.

Os índices a e b indicam que os dados foram coletados em duplicata e correspondem ao mesmo meio de fermentação.

Tabela 1 – Densidade ótica (600 nm)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,089	0,373	1,992	3,084	3,596	4,625
1b	0,086	0,372	1,790	3,027	3,456	4,761
2a	0,090	0,426	1,802	2,870	3,270	4,320
2b	0,063	0,404	1,812	2,817	3,332	4,125

Tabela 2 – pH

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	7,09	7,02	6,11	5,99	5,75	5,40
1b	7,08	7,01	6,10	6,02	5,73	5,38
2a	6,55	6,37	5,58	5,60	5,52	5,33
2b	6,56	6,36	5,61	5,61	5,66	5,43

Tabela 3 – Concentração de 2,3-BD (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,00	0,00	1,37	3,06	4,82	8,59
1b	0,00	0,00	1,48	3,70	4,93	10,19
2a	0,00	0,00	1,99	3,10	4,40	6,80
2b	0,00	0,00	2,47	4,20	3,89	6,62

Tabela 4 – Concentração de arabinose (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	17,44	13,90	11,67	9,90	6,31	0,00
1b	16,62	14,89	10,01	-	7,86	0,00
2a	15,66	12,10	10,21	8,77	8,01	2,11
2b	16,62	14,54	11,90	9,10	7,70	3,29

Tabela 5 – Concentração de xilose (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	14,29	14,10	12,90	11,89	10,89	3,49
1b	15,92	14,26	13,21	11,53	10,53	5,06
2a	15,88	15,33	12,69	10,90	10,10	6,26
2b	14,69	14,55	13,29	9,96	9,57	5,57

Tabela 6 – Concentração de etanol (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,00	0,00	1,99	1,96	2,21	3,18
1b	0,00	0,00	2,06	2,50	2,01	2,90
2a	0,00	0,00	0,89	1,71	2,45	3,55
2b	0,00	0,00	0,36	1,64	1,98	3,92

Tabela 7 – Concentração de ácido acético (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,00	0,00	1,01	1,36	1,39	1,55
1b	0,00	0,00	0,95	1,40	1,44	1,21
2a	0,00	0,00	0,89	1,28	1,36	1,59
2b	0,00	0,00	0,78	1,01	1,23	1,66

APÊNDICE C – Dados da cinética com meio utilizando arabinose + xilose + glicose

As tabelas abaixo exibem os valores de densidade ótica, pH, concentrações de 2,3-BD, etanol e ácido acético e concentrações de arabinose, xilose e glicose para cada alíquota coletada.

Número 1 e 2 fazem referência ao meio de fermentação empregado. Número 1 corresponde ao meio sintético e número 2 ao meio LB.

Os índices a e b indicam que os dados foram coletados em duplicata e correspondem ao mesmo meio de fermentação.

Tabela 1 – Densidade ótica (600 nm)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,086	0,575	2,344	4,008	4,364	5,225
1b	0,088	0,537	2,332	3,852	4,123	4,923
2a	0,059	0,457	2,202	2,897	3,457	6,601
2b	0,070	0,447	2,192	3,050	3,523	6,452

Tabela 2 – pH

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	7,03	6,84	6,01	5,78	5,62	5,40
1b	7,02	6,81	5,99	5,82	5,71	5,58
2a	6,68	6,30	5,58	5,56	5,46	5,32
2b	6,66	6,31	5,61	5,48	5,40	5,31

Tabela 3 – Concentração de 2,3-BD (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,00	0,00	2,75	3,89	8,62	19,42
1b	0,00	0,00	2,64	4,79	9,18	18,04
2a	0,00	0,00	2,45	3,18	5,56	12,34
2b	0,00	0,00	2,64	4,48	6,82	11,66

Tabela 4 – Concentração de arabinose (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	12,28	12,12	10,79	10,10	9,51	0,00
1b	13,42	13,24	12,50	11,23	8,84	0,00
2a	11,80	11,19	10,90	10,57	10,58	0,00
2b	12,40	11,80	11,00	10,89	10,46	0,00

Tabela 5 – Concentração de xilose (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	12,21	11,85	11,00	10,12	9,12	0,00
1b	11,30	10,25	10,10	9,55	8,67	1,97
2a	9,90	9,79	9,86	9,54	9,26	5,73
2b	10,40	10,10	9,71	9,36	9,46	6,33

Tabela 6 – Concentração de glicose (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	10,33	9,69	3,80	0,00	0,00	0,00
1b	12,57	10,31	4,23	0,00	0,00	0,00
2a	9,04	7,33	4,10	2,64	0,00	0,00
2b	9,39	9,01	5,33	3,13	0,00	0,00

Tabela 7 – Concentração de etanol (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,00	0,52	1,73	2,05	3,53	3,55
1b	0,00	0,53	2,13	2,22	2,92	4,05
2a	0,00	0,28	1,59	1,96	3,31	3,59
2b	0,00	0,48	1,99	2,50	2,91	3,07

Tabela 8 – Concentração de ácido acético (g.L⁻¹)

Amostras	Tempo					
	0	3	6	9	12	24
1a	0,00	0,00	1,16	1,32	1,59	1,61
1b	0,00	0,00	1,23	1,41	1,66	1,74
2a	0,00	0,00	1,17	1,05	1,76	2,96
2b	0,00	0,00	1,32	1,48	1,59	3,11